

Pamiętaj! W prenumeracie taniej!

# PRENUMERATA '99 To się opłaca!

## KLINIKA OCZNA

ACTA OPHTHALMOLOGICA POLONICA

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA OKULISTYCZNEGO



1999 DWUMIESIĘCZNIK ROK 101



57,00 zł  
dla odbiorców  
indywidualnych

78,00 zł  
dla instytucji

Cena egzemplarza  
poza prenumeratę  
13,00 zł  
(6 numerów 78,00 zł)

POLSKI WYDAWCA CZASOPISM I KSIĄŻEK MEDYCZNYCH  
51-423 WROCŁAW, ul. OLSZTYŃSKA 3  
TEL./FAX (+4871) 325-42-01  
Dział sprzedaży – tel. 325-35-58

Konto: Gospodarczy Bank Południowo-Zachodni S.A. we Wrocławiu  
nr 19301073-20428-27001-1

VOLUMED

Trzymaj rękę na pulsie!

### Prace oryginalne

Klinika Oczna 1998, 100 (6): 355-358  
ISSN 0023-2157 Indeks 362 646

#### Charakterystyka morfologiczna linii komórkowej RtCE wyprowadzonej z przedniego nabłonka rogówki szczura Morphological characteristics of epithelial cell line from rat cornea

Piotr Skopiński<sup>1,3</sup>, Jarosław Józwiak<sup>2</sup>, Jan Lamprecht<sup>2</sup>, Ewa Dróbecka-Brydak<sup>3</sup>,  
Jacek Malejczyk<sup>2</sup>

**Purpose:** Morphological characteristics of established cell line (RtCE) derived from rat anterior corneal epithelium.  
**Material and methods:** Morphology of cultured RtCE cells was evaluated by light and electron microscopy. Anterior corneal epithelium of rat served as control.  
**Results:** Both in light and electron microscope we observed morphological similarity with anterior corneal epithelium (several layers of cells, numerous desmosomal connections). Moreover, similar morphological changes were observed in relation to the control material, i.e. degeneration and flattening of cells in superficial layers.  
**Conclusions:** The morphological analysis of RtCE cell line proves its usefulness for further cytomorphological, cytogenetical and functional analyses, as well as for evaluation of influence of different physico-chemical and biological factors on growth and regeneration of corneal epithelium *in vitro*.

**Słowa kluczowe:** nabłonek rogówki, linia ustalona, morfologia, ultrastruktura

**Key words:** corneal epithelium, established line, morphology, ultrastructure

Prawidłowa funkcja rogówki zależy między innymi od strukturalnej integralności i niezakłóconego metabolizmu nabłonka przedniego. Nabłonek rogówki jest jedną z nielicznych populacji komórkowych organizmu mających zdolność do dynamicznej, fizjologicznej odnowy oraz zdolność pełnej regeneracji (6). Upośledzoną regenerację obserwuje się w licznych schorzeniach narządu wzroku oraz przypadkach oparzeń chemicz-

nych. Badania zdolności do wzrostu i funkcji tego nabłonka mają więc duże znaczenie praktyczne. Jedną z metod badań są techniki wykorzystujące hodowlę *in vitro* (2, 3). Mogą one być narzędziem badawczym pozwalającym ocenić wpływ różnych leków oraz czynników, np. czynników wzrostu, na funkcję i regenerację tego nabłonka (1, 5).

Izolacja i hodowla komórek nabłonka rogówki przysparza wiele kłopotów natury technicznej. Łatwiejsze jest prowadzenie badań na ustalonych liniach komórkowych. Spontaniczne linie komórek nabłonka rogówki nie zostały dotychczas wyprowadzone i scharakteryzowane. Prace wykonane w Zakładzie Histologii i Embriologii AM w Warszawie pozwoliły na wyprowadzenie takiej linii z pierwotnej hodowli nabłonka przedniego rogówki szczura. Linii nadano nazwę RtCE.

Celem niniejszej pracy była ultrastrukturalna ocena morfologii komórek linii RtCE w hodowli, pozwalająca ocenić stopień jej podobieństwa do nabłonka przedniego rogówki *in situ* i potencjalną przydatność tej linii do dalszych badań *in vitro* nad proliferacją oraz regeneracją komórek rogówki.

<sup>1</sup>Z Zakładu Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biostruktury AM w Warszawie  
Kierownik: prof. dr hab. Wanda Barańska

<sup>2</sup>Z Zakładu Histologii i Embriologii Instytutu Biostruktury AM w Warszawie  
Kierownik: prof. dr hab. Stanisław Moskalewski

<sup>3</sup>Z Kliniki Okulistyki AM w Warszawie  
Kierownik: prof. dr hab. Tadeusz Kępcik

Praca finansowana z grantu KBN: 6P207 031 06

Adres do korespondencji (Reprint requests to):  
Dr med. Piotr Skopiński  
Zakład Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biostruktury AM  
ul. Chatubińskiego 5  
02-004 Warszawa

## Materiał i metodyka

### Hodowla komórek

Materiał do hodowli pochodził z komórek nabłonka przedniego rogówek pięciu (6-tygodniowych) szczurów, samców szczepu wsobnego (WAG). Rogówki wycinano okrężnym cięciem w rąbku i inkubowano w dispace II (Boeinger Mannheim, Germany) w PBS bez  $Ca^{++}$  i  $Mg^{++}$  (Gibco BRL Life Technologies Ltd., Paisley, UK). Następnie mechanicznie oddzielano nabłonek od reszty rogówki, a uzyskaną zawiesinę komórek inkubowano z kolei w roztworze trypsyny z EDTA (Gibco BRL Life Technologies Ltd., Paisley, UK) i zakładano pierwotną hodowlę. Zastosowano zmodyfikowaną pożywkę do hodowli nabłonka rogówki królika (1). Po tygodniu trypsynizowano komórki i umieszczano w butelkach 25  $cm^2$ , zmieniając pożywkę hodowlaną co 3-4 dni. Podczas kolejnych pasaży oddzielono fibroblasty od komórek nabłonkowych przez krótką, wstępną 5-minutową trypsynizację. Poniżej opisany eksperyment przeprowadzono po 40 pasażach (od około 20. pasażu morfologia komórek oceniana przyżyciowo w mikroskopie kontrastowo fazowym nie zmieniła się).

Warstwową hodowlę komórek przeprowadzono w studzienkach hodowlanych – 6,5 mm średnicy (Corning Incorporated, Corning NY, USA). Komórki wysiewano na umieszczone w nich uprzednio porowate błony hodowlane – Transwell (Costar Corp. Cambridge MA, USA) w liczbie 500 000 na studzienkę. Hodowlę prowadzono przez tydzień zmieniając pożywkę co dwa dni.

### Mikroskopia świetlna i elektronowa

Błony hodowlane wraz z komórkami utrwalano w 3-proc. glutaraldehydzie w 0,1 M buforze kaksodylowym, (pH 7,4) przez 30 min. Następnie płukano 3-krotnie w 0,1 M buforze kaksodylowym (pH 7,4) przez 10 min w temperaturze pokojowej i utrwalano w 1-proc.  $OsO_4$  w 0,1 M buforze kaksodylowym (pH 7,4) w 4°C przez 30 min. Po odwodnieniu we wzrastających stężeniach alkoholu i tlenku propylenu materiał zatapiono w żywicy epoksydowej (8). Preparaty do mikroskopii świetlnej otrzymano krojąc część bloczków na skrawki 1  $\mu$  i barwiąc je błękitem toluidyną. Obserwacje przeprowadzono pod około tysiącrotnym powiększeniem końcowym.

Ultracienkie skrawki otrzymano krojąc materiał przy użyciu ultramikrotomu (Reichert OmU3). Skrawki kontrastowano octanem uranylu (10) i cytrynianem ołowiu (9). Dokumentację fotograficzną ultracienkich skrawków wykonano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym Jeol 100C (pow. 2000-70 000 $\times$ ). Kontrolę stanowił prawidłowy nabłonek przedni pobrany bezpośrednio z rogówki szczura.

### Wyniki

Analiza morfologiczna 7-dniowej hodowli komórek RtCE w mikroskopie świetlnym wykazała obecność 4-6 warstw komórek, leżących na jednorodnej błonie. W odniesieniu do kontrolnego obrazu rogówki obserwowano bardziej nieregularny układ komórek oraz różną grubość warstw komórkowych w poszczególnych badanych polach. Komórki warstwy podstawnej były mniejsze i morfologicznie stanowiły bardziej jednorodną populację o zbliżonych do siebie wymiarach w porównaniu 356



Ryc. 1A. Wielowarstwowy układ komórek nabłonkowych, liczne włókienka leżące w cytoplazmie, widoczna błona hodowlana z porami, które są penetrowane przez wypustki komórek warstwy podstawnej. EM. Powiększenie końcowe ok. 7000 $\times$

Fig. 1A. Multi-layered arrangement of epithelial cells, numerous filaments in cytoplasm, culture membrane with pores penetrated by the extensions of basal layer cells. Final magnification approx 7000 $\times$

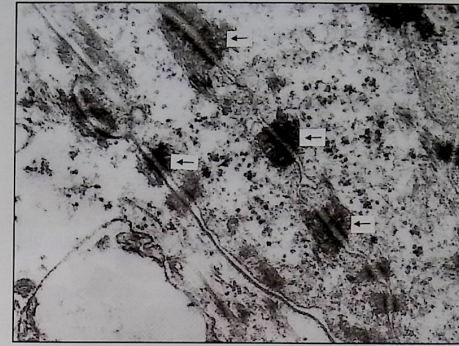
Ryc. 1B. Powiększenie fragmentu jądra komórki nabłonka rogówki z (ryc. 1A), przedstawiające strukturę ciałek jądrowych typu I i III. Powiększenie końcowe ok. 35 000 $\times$

Fig. 1B. Magnification of a fragment of corneal epithelium cell nucleus showing the structure of nuclear bodies of type I and III. Final magnification approx 35 000 $\times$

z większymi, niekiedy spłaszczonymi komórkami warstw powierzchniowych.

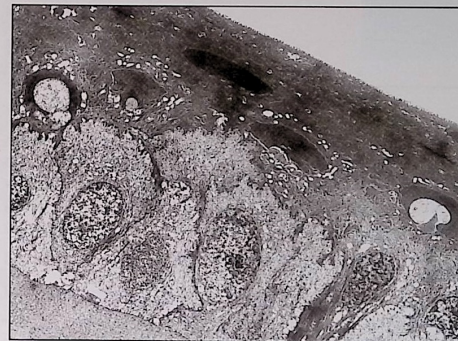
W transmisyjnym mikroskopie elektronowym, na przekrojach poprzecznych hodowli linii RtCE obserwowano wielowarstwowy układ komórek (ryc. 1A). Pomiędzy nimi w warstwach podstawnych występowały przestrzenie wypełnione wypustkami sąsiednich komórek. Ich wypustki penetrowały pory w błonie, na której prowadzono hodowlę. Komórki warstw powierzchniowych miały cechy degeneracji cytoplazmy (mniejszą gęstość elektronową, wakuolizację, luźny układ włókienek). Na wszystkich przekrojach komórek warstw podstawnych obserwowano mitochondria, rybosomy oraz różne formy lizosomalne i wakuole. Występowały ponadto liczne włókienka układające się w zbite pęczki w warstwach podstawnych i mające układ luźniejszy w warstwach powierzchniowych (ryc. 1A). Jądra niektórych komórek leżących głębiej obok typowych składników zawierały ciała jądrowe (I i III typ) (7) (ryc. 1B).

Obserwowano liczne połączenia międzykomórkowe (desmosomy), będące w kontakcie z włókienkami cytoskieletu penetrującymi do cytoplazmy (ryc. 2).



Ryc. 2. Liczne połączenia międzykomórkowe (desmosomy), charakterystyczne dla komórek nabłonkowych. Widoczne filamenty cytoskieletu komórki w kontakcie z wewnętrzną komórkową częścią desmosomu. EM. Powiększenie końcowe ok. 70 000 $\times$

Fig. 2. Numerous connections between cells (desmosomes) characteristic of epithelial cells. Noticeable cytoskeleton filaments in contact with internal part of desmosomes. Final magnification approx 70 000 $\times$



Ryc. 3. Kontrolny nabłonek rogówki szczura. EM. Powiększenie końcowe ok. 7500 $\times$

Fig. 3. Control rat corneal epithelium. Final magnification approx 7500 $\times$

Powyższy opis morfologiczny (hodowla *in vitro*) odpowiada obrazom z materiału kontrolnego rogówki szczura. Obserwowano w nim kilka warstw komórek leżących na błonie kolagenowej (Bowmana) i głębiej leżącej istocie właściwej rogówki, zbudowanej z uporządkowanego układu włókien kolagenowych. Komórki warstw podstawnych miały owalny kształt, prawidłowo wykształcone jądra i organelle cytoplazmatyczne. Leżące wyżej były bardziej płaskie z cechami degeneracji cytoplazmy (wakuolizacja, luźniejsze utkanie włókienek, niewielka liczba organelli cytoplazmatycznych), jak i jądra komórkowego, w którym centralnie obserwowano wakuole, a obwodowo gęstą elektronowo chromatynę. Zauważono liczne połączenia desmosomalne pomiędzy komórkami (ryc. 3), w warstwach podstawnych występowały w większej liczbie. W warstwach powierzchniowych pomiędzy komórkami znajdowały się liczne wakuole elektronowo wypełnione rzadkim materiałem.

Cytoplazma komórek warstw powierzchniowych była homogenna o wysokiej gęstości elektronowej i wykazywała cechy keratynizacji.

### Omówienie

Jakościowa analiza badanego materiału w mikroskopie świetlnym i elektronowym wykazała, że oceniane przez nas hodowle komórek RtCE w warunkach *in vitro* odpowiadają morfologicznie nabłonkowi przedniemu rogówki. Szczegółowa ultrastrukturalna analiza morfologiczna komórek RtCE poszczególnych warstw pozwala stwierdzić, że mają one charakter nabłonkowy. Świadczy o tym występowanie licznych połączeń międzykomórkowych (desmosomów), obecność sieci włókienek w cytoplazmie i liczne mikrokosmki na powierzchni komórek. Cechy te stwierdzano również w materiale kontrolnym, który stanowiły obrazy preparatów normalnego nabłonka przedniego rogówki szczura.

W komórkach (RtCE) obserwowaliśmy obrazy morfologiczne polegające na degeneracji i spłaszczeniu komórek w warstwach powierzchniowych nabłonka. Zjawisko to może być związane z przechodzeniem komórek z warstwy podstawnej (rozrodzonej) do warstw wyższych, gdzie zachodzi ich złuszczenie (martwe, skeratynizowane komórki). Powyższa dynamika zmian, obserwowana przez nas (w warunkach *in vitro*), jest charakterystyczna dla komórek nabłonków wielowarstwowych. Podobne zjawiska zauważono w nabłonku prawidłowej rogówki szczura.

Nasze spostrzeżenia są zbliżone z doniesieniami innych autorów opisujących morfologię hodowli komórek nabłonka przedniego rogówki królika na błonach kolagenowych (4) lub hodowanych na tzw. *feeder layer* – warstwie komórek mających za zadanie odżywiać rosnący nabłonek (1).

### Wnioski

Obraz morfologiczny izolowanych i hodowanych na błonie kolagenowej przez 7 dni komórek nabłonka przedniego rogówki szczura przypomina morfologicznie nabłonek przedni rogówki *in vivo*. Mogą świadczyć o tym cechy charakterystyczne dla komórek nabłonkowych, desmosomy, warstwowość układu komórek oraz obecność włókienek w cytoplazmie komórek.

Przeprowadzona wstępna analiza morfologiczna komórek RtCE potwierdza ich przydatność dla dalszych badań cytomorfologicznych, cytogenetycznych i funkcjonalnych.

Badania te są obecnie prowadzone w naszym laboratorium w celu ustalenia stabilności linii. Obejmują one określenie czasu podwojenia populacji, kariotypu komórek, profilu cytokeratynowego oraz produkcji wybranych cytokin przez stymulowane i niestymulowane komórki. Jeżeli powyższe badania pozwolą stwierdzić, iż wyhodowana przez nas linia jest stabilna, będzie ona dostępna w ofercie dla zainteresowanych laboratoriów.

Hodowle tych komórek mogą także służyć jako model do oceny wpływu różnych leków oraz czynników fizykochemicznych i biologicznych na wzrost i regenerację rogówki.

## Piśmiennictwo

1. Castro-Munedo F.: *Development of a spontaneous permanent cell line of rabbit corneal epithelial cells that undergoes sequential stages of differentiation in cell culture.* J. Cell Science, 1994, 107, 2343-2351.
2. Chan K.Y., Haschke R.H.: *Epithelial-stromal interactions: specific stimulation of corneal epithelial cell growth in vitro by a factor from cultured stromal fibroblasts.* Exp. Eye Res., 1983, 36, 231-246.
3. Ebato B., Friend J., Thoft R.: *Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture.* Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1987, 28, 1450-1456.
4. Geggel H.S., Friend J., Thoft R.A.: *Collagen gel for ocular surface.* Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1985, 26, 901-905.
5. Jumblatt M.M., Neufeld A.H.: *A tissue culture assay of corneal epithelial wound closure.* Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1986, 27, 8-13.

6. Lamprecht J.: *Symmetric and asymmetric cell division in rat corneal epithelium.* J. Cell. Tiss. Kin., 1990, 23, 303-308.
7. Skopiński P., Żmijewski M., Portacha L., Zamłyńska A., Przyłuski J.: *Ultrastructural observations of nuclear bodies in the epithelial cells of human conjunctiva.* Folia Histochem. Cytobiol., 1993, 4, 201-205.
8. Spurr A.R.: *A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.* J. Ultrastruct. Res., 1969, 26, 31-43.
9. Vanable J., Coggeshall R.: *A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy.* J. Cell Biol., 1965, 25, 407-408.
10. Watson H.L.: *Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals.* J. Biophys. Biochem. Cytol., 1958, 4, 475-478.

Praca wpłynęła do Redakcji 1 kwietnia 1998 r. (666)

## Prace oryginalne

Klinika Oczna 1998, 100 (6): 359-362  
ISSN 0023-2157 Indeks 362 646

## Badania nad wpływem środków hamujących aktywność i powstawanie wolnych rodników tlenowych na gojenie się doświadczalnego owrzodzenia rogówki

Streszczenie pracy doktorskiej

Evaluation of the effect of substances inhibiting the activity and generation of free oxygen radicals on the healing of experimental corneal ulceration

Doctor's thesis summary

Piotr Kawa

**Abstract:** The purpose of this study was to evaluate healing of experimental corneal ulceration induced by thermal injury after applying dimethylsulfoxide (DMSO) and sodium citrate. 48 rabbits after corneal ulceration were divided into 4 groups treated with: 50% DMSO, 10% sodium citrate, both and saline as control. Healing of the corneal ulcer was evaluated by clinical observation, planimetry of the corneal ulcers and the chemiluminescence of the corneas. Faster healing, smaller surface of the ulceration in groups treated with DMSO, sodium citrate comparing to control was observed on the 3rd and 6th day after injury.

**Słowa kluczowe:** oparzenie termiczne, rogówka, antyoksydanty, chemiluminescencja

**Key words:** thermal injury, cornea, antioxidants, chemiluminescence

Wolne rodniki, od dawna znane w chemii, uzyskały w ostatnim czasie istotne znaczenie w biologii i w medycynie. Stało się to z jednej strony z uwagi na zastosowanie wielu nowych metod ich wykrywania, z drugiej zaś z powodu poznania ich roli i działania w zdrowych i chorych organizmach. Nadmierna produkcja wolnych rodników tlenowych lub obniżenie aktywności mechanizmów zabezpieczających przed ich szkodliwym działaniem może prowadzić do uszkodzenia tkanki (8). Ostatnio ukazały się doniesienia na temat udziału reaktywnych form tlenu (RFT) w uszkodzeniu rogówki (1-6). W procesach zapalnych rogówki, niezależnie czy czynnikiem uszkadzającym jest zakażenie bakteryjne, uraz termiczny czy chemiczny dochodzi do migracji komórek żer-

nich – granulocytów obojętnochłonnych, makrofagów, które uwalniają wolne rodniki tlenowe w procesie tzw. „wybuchu oddechowego”. Stwierdzono, że nadmiar wolnych rodników tlenowych może prowadzić do degradacji włókien kolagenowych, co klinicznie może odpowiadać owrzodzeniu rogówki. Zmiany te polegają na powstawaniu krzyżowych wiązań włókien kolagenowych, co jest związane z przejściem frakcji kolagenu rozpuszczalnego w wodzie w kolagen nierozpuszczalny. Zaobserwowano, że zarówno komórki nabłonka, jak i śródbłonna wyizolowanej rogówki o wiele dłużej zachowują swoją żywotność w obecności zmiataczy wolnych rodników (5, 15, 16). Wyniki badań sugerują negatywny wpływ wolnych rodników tlenowych na komórki śródbłonna rogówki oraz pozostałych struktur tej tkanki oka. Skłoniły one do poszukiwania sposobów leczenia owrzodzenia rogówki z zastosowaniem przeciwutleniaczy i środków hamujących powstawanie wolnych rodników (1-4, 12, 13).

### Materiał i metodyka

Do badań doświadczalnych użyto 48 królików białych o wadze 2,5-3,5 kg. Znieczulane były miejscowo

Z I Kliniki Okulistyki AM w Lublinie  
Kierownik: prof. dr hab. Zbigniew Zagórski

Adres do korespondencji (Reprint requests to):  
Dr med. Piotr Kawa  
Katedra i Klinika Chorób Oczu AM  
ul. Chmielna 1  
20-079 Lublin

## Komunikat

Uprzejmie przypominamy, że

**XXIV Sympozjum Retinologiczne**, odbędzie się  
w **Poznaniu w dniach 8-10 kwietnia 1999 r.**

Termin zgłoszeń upływa 31 grudnia 1998 r.

Zgłoszenia prosimy przesyłać na adres:

**Komitet Organizacyjny**  
Katedra i Klinika Okulistyki  
ul. Długa 1/2  
61-848 Poznań