



Odlar mini-tarmar av stamceller från hästens blindtarm

Karaktärisering av genuttryck och morfologi hos
ekvina caecaloider odlade i labbmiljö på SLU

Agnes Söderqvist

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet
Uppsala 2025



Odla mini-tarmar av stamceller från hästens blindtarm – Karaktärisering av genuttryck och morfologi hos ekvina caecaloider odlade i labbmiljö på SLU

Cultivation of intestinal organoids from the equine caecum – Characterization of gene expression and morphology of equine caecaloids cultivated in lab environment at SLU

Agnes Söderqvist

Handledare:	Eva Tydén, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens biovetenskaper
Bitr. handledare:	Fredrik Södersten, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens biovetenskaper
Bitr. handledare:	Julia Andersson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens biovetenskaper
Examinator:	Magnus Åbrink, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens biovetenskaper
Omfattning:	30 hp
Nivå och fördjupning:	Avancerad nivå, A2E
Kurstitel:	Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod:	EX1003
Program/utbildning:	Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.:	Institutionen för kliniska vetenskaper
Utgivningsort:	Uppsala
Utgivningsår:	2025
Upphovsrätt:	Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.
Nyckelord:	organoid, caecaloid, intestinala kryptstamceller, modell, in vitro, epitel, caecum

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Sammanfattning

En nutida teknik inom stamcellsodling har möjliggjort att odla fram organoider i labb-miljö som ska efterlikna ursprungsvävnaden och kan således fungera som en djuretisk försöksmodell i linje med de 3R som syftar till att ersätta, reducera och förfinas experimentella studier där djur ingår.

Syftet med denna studie var att odla organoider från hästens blindtarm (caecaloider), vilket aldrig har beskrivits i litteraturen. Stamceller isolerades från blindtarmsvävnad efter avlivning av hästen. Caecaloiderna odlades genom tillsatser av tillväxtfaktorer som stimulerar proliferation och differentiering av olika epitelcelltyper. Vid undersökning av genuttryck med Reverse-Transcriptase qPCR sågs uttryck från cellmarkörer som representerar epitelceller (EPCAM), bägarceller (MUC2) och stamceller (PCNA och SOX9) i caecaloiderna, vilket jämfördes med ursprungsvävnaden. Histologisk undersökning av caecaloiderna visade på rikligt med bägarceller, vilket ytterligare är tecken på differentiering.

Slutligen kunde vi med resultaten från denna studie konstatera att det går att odla och biobanka organoider från hästens caecum, något som hittills inte gjorts. Caecaloiderna hade genetiska och morfologiska egenskaper som efterliknade tarmepitelet i blindtarmen. Detta är en viktig pusselbit i att skapa en *in vitro*-modell för blindtarm på häst som kan användas för experimentella studier av värd-parasitinteraktioner och caecums barriärfunktion samt vid andra patologiska experiment, utan att hästar behöver utsättas för onödigt lidande i försöken.

Nyckelord: organoid, caecaloid, intestinala kryptstamceller, modell, *in vitro*, epitel, caecum

Abstract

A contemporary technique in stem cell cultivation has made it possible to grow organoids in laboratory environments that mimic the original tissue. These organoids can thus serve as an ethical alternative to animal models in experimental studies, in accordance with the 3Rs principle, which aims to Replace, Reduce, and Refine the use of animals in research. Organoids derived from the horse's caecum (caecaloids) have never been described to be cultivated in the literature. The aim of this study was to cultivate caecaloids.

The stem cells were isolated from intestinal tissue taken from the horse's caecum after euthanasia. The caecaloids were cultivated by adding growth factors that stimulate the proliferation and differentiation of various epithelial cell types. Investigation of gene expression using Reverse-Transcriptase qPCR revealed the expression of gene markers representing epithelial cells (EPCAM), goblet cells (MUC2), and stem cells (PCNA and SOX9) in the caecaloids, which were compared to the original tissue. Histological examination shows a rich presence of goblet cells, further indicating differentiation.

Finally, based on the results of this study, we could conclude that it was possible to culture organoids from the horse's caecum, something that has not been done previously. The caecaloids exhibited genetic and morphological features that resembled the cecal epithelium. This represents a key step in creating an *in vitro* model for the horse caecum, which can be used for experiments on host-parasite interactions as well as other pathological studies without subjecting horses to unnecessary suffering in trials.

Keywords: organoid, caecaloid, intestinal crypt stem cell, model, *in vitro*, epithel, caecum

Innehållsförteckning

Förkortningar	8
1. Inledning	9
2. Litteraturoversikt.....	10
2.1 Epitelets uppbyggnad	10
2.2 Organoider som ny in vitro-modell på häst	12
2.2.1 Intestinala organoider	13
2.2.2 Potentiellt användningsområde för organoider inom parasit-forskning	14
2.2.3 Odling av caecaloider från mus	15
2.2.4 Odling av caecaloider från kanin	16
2.2.5 Genuttryck i tarmepitel	16
3. Metod.....	18
3.1 Kryptisolering	19
3.2 Kultivering av kryptor	19
3.3 RNA-rening och RT-qPCR.....	20
3.3.1 RT-qPCR	20
3.3.2 Gelelektrofores	22
3.4 Histologi	22
3.4.1 Morfologisk analys	22
3.5 Statistisk analys	22
4. Resultat	24
4.1 Odling av caecaloider	24
4.2 Genuttryck caecum och caecaloider.....	26
4.2.1 Genuttryck caecumvävnad och caecaloid	28
4.2.2 Genuttryck i caecaloid vs caecumvävnad	30
4.3 Morfologisk analys	31
4.3.1 Bägarceller och mitoser	32
5. Diskussion	34
5.1 Odling av caecaloider	34
5.1.1 Karaktärisering av organoider.....	34
5.2 Histologisk undersökning	37
5.3 Slutsats	37
Referenser.....	39
Populärvetenskaplig sammanfattning	41
Tack	42
Bilaga 1 Samtliga protokoll från metoddelen	43

Förkortningar

Förkortning	Betydelse
3R	Replace, Reduce and Refine
CHGA	Chromogranin A
DCLK1	Doublecortin-like kinase 1
EPCAM	Epithelial cell adhesion molecule
LGR5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
LYZ	Lysozym
MUC2	Mucin 2
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PBS	Phosphate-buffered saline
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
SOX9	SRY-Box Transcription Factor 9
SVA	Statens veterinärmedicinska anstalt
Wnt	Wingless-related integration site

1. Inledning

Organoider är en tredimensionell modell av ett organ, ibland kallat för ett miniorgan. En nutida teknik inom stamcellsodling har möjliggjort odling av organoider i labb-miljö som ska efterlikna ursprungsvävnaden (Date & Sato 2015). Genom att isolera stamceller från olika vävnader och odla dem i media med en matrixblandning kan forskare tillåta cellerna att tillväxa och differentiera till en organoid med hjälp av tillsatta tillväxtfaktorer. Intestinala organoider bildas från intestinala stamceller i epitelets kryptor som kan organisera sig, föröka sig och differentiera till olika epiteliala celler för att få en liknande cellkomposition som epitel i verklig tarmvävnad (Date & Sato 2015). Stamcellerna som sitter organiserade i epitelets kryptor separeras från övrig vävnad och tillsätts sedan i ett geléartat medium som tillåter organoiden att tillväxa tredimensionellt. En matrixblandning behövs också som innehåller proteiner och byggstenar för cellproliferation och organoidtillväxt. Korrekt differentiering och cellväxt styrs av tillväxtfaktorer som slutligen tillsätts i mediet (Mussard *et al.* 2020; Hellman 2021).

Sjukdom i mage och tarm hos häst kallas i veterinärmedicinska termer för kolik och är en vanlig orsak till hästars lidande och att hästägare uppsöker veterinärvård (Tinker *et al.* 1997). Kolik orsakas av flera typer av underliggande patologier, där några av de vanligaste är fellägen, tarmvred och mag-tarmparasiter. Idag pågår mycket forskning på olika behandlingar av skador som uppstått i tarmepitelet efter kolik (Windhaber *et al.* 2024). Experimentella *in vivo* studier har en del praktiska och etiska begränsningar. För att möjliggöra experimentella studier *in vitro* har forskare tagit fram intestinala organoider som en ny modell för att kunna studera tarmepitelets funktion hos häst. Organoider har tidigare odlats från jejunum och colon hos häst, såväl som mus, gris och idisslare (Beaumont *et al.* 2021).

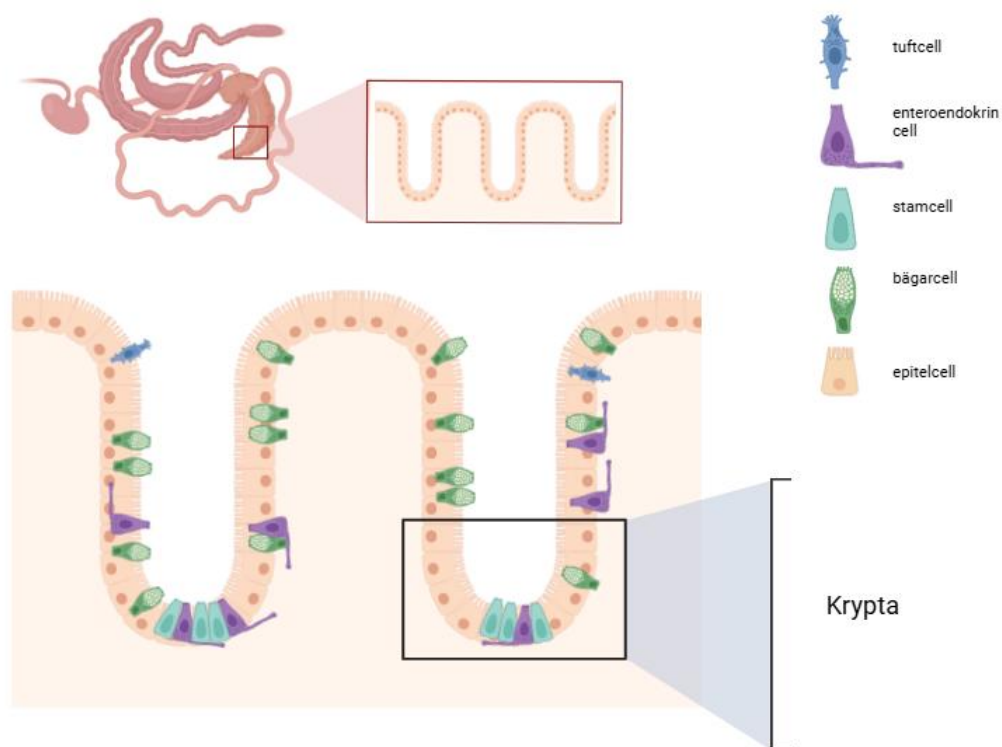
Caecum har en betydande roll för hästens matsmältning och mikrobiota, då hästen likt kaninen är en grovtarmjäsare, även kallade enkelmagade herbivor (Sjaastad *et al.* 2016, ss. 718–722). Hästens caecum är ett predilektionsställe för infektion av bandmask och lilla blodmasken, vilket sekundärt till infektionen kan orsaka invagination och kolik (Reed *et al.* 2010). Det finns därför ett värde i att ta fram en organoid-modell för hästens caecum. Det skulle möjliggöra patologiska och immunologiska experimentella *in vitro* försök, med hög efterliknad till caecums epitel *in vivo*.

Syftet med denna studie var att utveckla en odlingsmetod och odla organoider från stamceller från hästens blindtarm, samt undersöka om dessa organoider (caecaloider) i gnuttryck och morfologi efterliknar caecumvävnad.

2. Litteraturöversikt

2.1 Epitelets uppbyggnad

Hästens blindtarm har en viktig funktion i matspjälkningen och mikrobiota. Här bryts cellulosa ner till sockerarter genom fermentering med hjälp av bakterier och andra kommensala mikroorganismer. Blindtarmens celluppbyggnad i epitelet skiljer sig från tunntarmen. Blindtarmen har inte villi, då funktionen i huvudsak inte är absorption. Likt tjocktarmen har blindtarmen rikligt med bägarceller vars funktion är att utsöndra mukus. I övrigt består epitelet likt tunntarmen i stor del av ett enkelt cylinderepitel som vilar på ett basalmembran och formar en barriär, transporterar näringsämnen och genomgår självförnyelse. Odifferentierade stamceller finns längst ner i kryptorna och i närheten av dessa finns progenitorceller vars uppgift är att förnya epitelet var 5:e dag. (Gonzalez *et al.* 2015; Pawlina & Ross 2020; Sjaastad *et al.* 2016)



Figur 1. Schematisk bild av epitel i hästens blindtarm. Enkelt cylinderepitel med stamceller belägna i kryptorna. Differentierade celltyper (tuftceller, enteroendokrina celler och bägarceller) utspridda i epitelet. Bild skapad i BioRender av författaren.

Tarmepitelets stamceller är belägna i kryptorna (figur 1) omgivna av progenitorceller som har i uppgift att dela sig och differentiera till olika celltyper för att förnya epitelet, något som är en ständigt pågående process. I den så kallade epiteliala hissen förflyttas cellerna under processens gång upp från kryptorna, längs epitelets toppar för att så småningom lossna i tarmens lumen. (Pawlina & Ross 2020)

Till skillnad mot tunntarm saknar grovtarm, caecum och colon panetceller (Pawlina & Ross 2020; Gonzalez *et al.* 2015). Panetcellers granula färgas in med HE såväl som PAS-färgning och har vid histologiska studier inte kunnat upptäckas i hästens grovtarm (Cui *et al.* 2023). Colon misstänks dock ha celler som liknar dessa, så kallade panetliknande celler, som en del av tarmepitelets immunförsvaret (Date & Sato 2015). Studier på förekomsten av dessa panetliknande celler i caecumvävnad hos häst saknas. Panetliknande celler och panetceller urspringer båda från intestinala stamceller, till skillnad från andra immunceller som urspringer från blod-stamceller i benmärgen (Pawlina & Ross 2020). En annan celltyp som finns i tarmepitelet är tuftceller som är viktiga signaleringsceller och har en ännu inte helt känd roll i immunförsvaret (Cui *et al.* 2023).

Det finns få studier beskrivna i litteraturen som undersökt hästens intestinala epitel på cellnivå. Gonzalez *et al.* (2015) studerade hästens tarmepitel i tunntarm och colon och dess olika cellinjer med hjälp av histokemi, immunofluorescens, proteinbiomarkörer och elektronmikroskop. De kunde identifiera olika celltyper i epitelet och även mäta genuttryck hos stamceller, progenitorceller och mitotiska celler såväl som genuttryck hos differentierade celltyper (epitelceller, enteroendokrina celler, bägarceller och tuftceller). Forskarna hoppas att resultaten i framtiden kan vara relevanta för studier på regeneration av intestinalt epitel och genom ny kunskap om tarmepitelets beskaffenhet öka överlevnaden hos hästar drabbade av kolik. Stamceller och progenitorceller identifierades djupt i kryptorna baserade på antikroppar mot SOX9 och de kunde även se genuttryck av SOX9. Identifiering av celler som genomgår proliferation gjordes med markören PCNA och identifierades främst längs med kryptorna och var den markör för proliferation som var den mest spridda inom kryptorna. De använde även en markör för cellcykeln (MCM2) som representerar G1 i cellcykeln och fann att celler i kryptorna färgades in. Infärgning av MUC2 (mucin 2) visade att grovtarmen hade uttryck av MUC2 i rikligt med bägarceller men också djupt i kryptorna där bägarcellerna sällan är placerade. Sekretoriska enteroendokrina celler identifierades med immunofluorescence av CHGA (chromogranin A) i ett fåtal celler utspridda i epitelet.

2.2 Organoider som ny in vitro-modell på häst

Det finns idag inga etablerade cellinjer för häst som används inom forskningen (Windhaber *et al.* 2024). De cellinjer som finns är humana cellinjer och cellinjer från mus. De är ofta grundade på cancerceller, vilket inte representerar epitelets cellpopulation *in vivo*. Intestinala cellinjer uppges vara svaga och kortlivade, vilket gör att de inte uppnår den komplexitet som behövs för fysiologisk relevans (Windhaber *et al.* 2024).

Det finns ett behov av en *in vitro*-modell som efterliknar epitelet *in vivo* som passar för långtidsstudier (Windhaber *et al.* 2024). Bland annat den etiska aspekten, där forskning på hästens tarmepitel inte är möjlig *in vivo* av en djurvälståndspåsekt. Grundat på 3R principen (replace, reduce, refine) som syftar till att ersätta, reducera och förfinas experimentella studier där djur ingår, är en organoid som infektionsmodell så nära riktigt tarmepitel vi kommer i dagens forskningsläge. Det går att argumentera för att fler studier skulle behövas för att ytterligare utveckla en redan etablerad metod att odla organoider från hästens tarmvävnad (Windhaber *et al.* 2024). Hästens olika tarmavsnitt (jejunum, colon och caecum) skiljer sig till utseende och funktion och även i vilka infektioner som drabbar respektive del (Pawlina & Ross 2020; Osterman-Lind *et al.* 2023). Det kan också innebära att metoddelen för odling av organoider behöver justeras efter respektive tarm-del.

Sato *et al.* (2009) var först att beskriva odling av intestinala organoider från friska patienters tunntarm, då från mus. De beskrev kryptorna i epitelet som självorganiserade strukturer som kan byggas upp från en enda enskild stamcell, även i avsaknad av omgivande mesenkym. De fann att en signal från panetceller som kallas Wingless-related integration site (Wnt) behövs för kryptoproliferation och bör därför finnas i mediet. Två andra signalfaktorer som behöver finnas i mediet för att stamcellerna ska kunna fortsätta att växa i stamlikt stadie är R-spondin som inducerar krypthyperplasi *in vivo* och Noggin som inducerar expansion av kryptorna. LGR5 är en gen (Wnt target) som är specifik för kryptor som regenereras. LGR5 räknas således som en krypt-stamcellsmarkör. Kryptstamceller genomgår programmerad självdöd om de inte har en kontext att tillväxa i som består utav omgivande vävnadsstruktur och celler. Tillväxtfaktorn Y27 tillsätts för att hindra programmerad celldöd av stamcellerna. Matrigelen som kryptorna tillsätts i är en geléliknande substans som utvinns från extracellulär matrix i sarkom hos möss. Matrigelen bör enligt Sato *et al.* (2009) innehålla proteiner som kan stimulera celltillväxt (s.k. cellsignaler) och simulera de mekaniska egenskaper ett basalmembran ger för att ge kryptstamcellerna de fysiska stöd de behöver för att kunna tillväxa med struktur som liknar ursprungsorganet. De såg även att musorganoiderna hade ett lumen som fylldes av apoptotiska celler. Organoiderna var till en början sfäriska men kryptliknande utskott kunde bildas (engelskans budding) efter några dagar. (Sato *et al.* 2009)

I skrivande stund har ingen isolerat stamceller från hästens blindtarm (caecum). Metoden för att isolera stamceller från tarmepitel är beprövad på hästens tunntarm (jejunum) i Hellman (2021) och grovtarm (colon) Windhaber *et al.* (2024). Organoiderna (hädanefter kallade för enteroider respektive colonoider) förväntas i framtiden att användas som modell för vidare patologiska studier på hästens tarmepitel.

Windhaber *et al.* (2024) jämförde olika medium för organoidodling med varandra. De kom fram till att mediet bör för bästa resultat anpassas till vilket djurslag och vilket segment av tarmen som vävnaden tas från. Det finns olika medium beskrivna i litteraturen för organoidodling. Stamcells företag har producerat egna medium som standardiserats för människa och mus, däribland Intesticult (från företaget StemCell) som kommer att användas i denna studie. Utöver detta medium används det även ett medium från Hellman (2021) och tillhörande protokoll (hädanefter kallat Hellman medium).

2.2.1 Intestinala organoider

Organoider som odlas från intestinala stamceller ger forskare fler möjligheter att studera patologier i tarmepitelet på cellnivå. *Ex vivo* modellen kan simulera ett encelligt tarmepitel i 3D-struktur eller bredas ut på ett plant underlag i 2D (ett s.k. monolager). Monolager innebär att tarmepitelets apikala yta är blottad och epitelets infektionsmekanismer kan studeras tydligare. Bland annat har patogen-värd-interaktioner kunnat studeras med denna metod (Duque-Correa *et al.* 2020; Duque-Correa *et al.* 2022; Dutta & Clevers 2017; Hellman *et al.* 2024; Nash *et al.* 2021).

Hellman *et al.* (2024) som studerat interaktion mellan enteroid och nematoder hos häst visade att en stimulering med cytokinerna IL-4 och IL-13 ökade uttrycket av bägarceller och epitelceller i enteroiden. När enteroiderna exponeras för nematoder förändrades morfologin hos tarmepitelets cell-lager även utan tillförande av cytokiner. De såg även att enteroider i 2D-monolager hade ett genuttryck som var snarlikt de enteroider i 3D de ursprungligen kom ifrån, och att genuttrycket förblev stabilt i 2D-monolager över 6 passager. En passage innebär att organoiden delas i mindre beståndsdelar, vilket stimulerar stamcellerna till delning, tillväxt och differentiering. Powell & Behnke (2018) odlade organoider från hästens jejunum och colon i upp till 46 passager, totalt 168 dagar.

Både stamceller och differentierade celler kan studeras med hjälp av organoidmodellen (Hellman 2021) och användas för att studera intestinal vävnadsutveckling och sjukdom (Powell & Behnke 2018). Allvarlig skada på tarmens epitel har ofta en dålig prognos. Idag går det att identifiera olika celltyper i epitelet och forskare menar att det med hjälp av organoider som modeller för epitel kommer att finnas nya möjligheter för att utveckla terapeutiska metoder för återuppbyggnad av skadat epitel (Gonzalez *et al.* 2015).

Steward *et al.* (2022) argumenterar i sin forskning för att organoider även kan användas som modell för att ta fram en ny behandling med stamceller för att behandla tarmepitel som har utsatts för syrebrist. Även transplantation av stamceller från tarmepitel är en behandling som Steward *et al.* (2022) menar kan finnas i framtiden. I organoidmodellerna har forskare sett att det går att aktivera epitelets stamceller som därmed kan förnya epitelet och möjliggör att läka stora skador i tarmepitel på häst (Steward *et al.* 2022). Det behövs enligt författarna mer forskning inom detta område.

2.2.2 Potentiellt användningsområde för organoider inom parasit-forskning

Ett annat område som har använt sig av organoider tidigare är veterinärmedicinsk parasitologi. Som nämnts tidigare finns det en del studier som använt organoider för att studera interaktioner mellan värd och patogen (Dutta & Clevers 2017; Nash *et al.* 2021), däribland parasiter (Duque-Correa *et al.* 2020; Duque-Correa *et al.* 2022; Hellman 2021). Två vanligt förekommande parasiter hos häst med caecum som predilektionsställe, är bandmasken *Anoplocephala perfoliata* (*A. perfoliata*) och små blodmaskar *Cyathostominae* spp. (Matthews *et al.* 2004; Back *et al.* 2013). Båda dessa arter kan förekomma och orsaka sjukdom i blindtarmen.

Predilektionsstället för bandmaskinfektion är i blindtarmens övergång till ileum som kallas det ileocecal ostiet. Analys av bandmask ingår inte i den vanliga mask-analysen som hästägare gör på våren, utan måste specifikt frågas efter vid beställning av träck-analys hos de vanliga labb-företagen i Sverige (SVA, Vidilab). Den vanliga ägg-räkningsmetoden med McMaster är inte lika känslig för bandmask som för nematoder (Back *et al.* 2013). Det går att utföra IgG ELISA för att detektera patienter med bandmask. Det är en hög prevalens i Sverige, så hög som 61 % enligt Osterman-Lind *et al.* (2023). Massinfektion av *A. perfoliata* kan leda till ulcerationer av epitelet, tillsammans med bildandet av pseudomembran och lokal inflammation som även kan involvera det serosa cellagret (Reinemeyer & Nielsen 2009). Detta kan i sin tur öka risken för ileocecal intussusception och ruptur. Det finns även kopplingar mellan ökad förekomst av bandmask och spasmolytisk kolik (Back *et al.* 2013).

Små blodmaskar (*Cyathostominae* spp.) har en mycket hög prevalens i Sverige idag, nära 100 % då de beräknas finnas hos alla betande hästar (Lind *et al.* 2003; Bellaw & Nielsen 2020). Individer som avmaskats kan fortfarande bära farliga doser av små blodmaskar i larvstadie. Det behövs mer forskning för att kunna fastställa exakt vad som händer i larvens epitel-stadie (Matthews *et al.* 2004), vilket är något som tidigare inte kunnat studeras närmare på häst då det saknats en infektionsmodell.

Vanliga avmaskningsmedel i Sverige skrivs ut på recept av veterinär efter träckanalys, då riskerna för resistens mot avmaskningsmedel anses stor. Ett vaccin

mot maskinfektion skulle minska användandet av avmaskningsmedel. Tyvärr finns det inget godkänt vaccin på marknaden idag. En stor anledning är att det praktiskt och etiskt är svårt att genomföra experimentella studier på maskinfektioner hos häst. En organoid-modell av epitelet från hästens blindtarm skulle kunna möjliggöra experimentella studier *in vitro* med hög efterliknad till tarmens epitel *in vivo*. I denna modell, vilket är så nära man kommer en riktig tarm, kan man sedan utföra immunologiska forskningsförsök som inte innefattar levande hästar och på så sätt genomföra immunologisk forskning *in vitro*.

En modell för caecum (hädanefter kallad caecaloid) skulle kunna möjliggöra studier på hästens blindtarm vad gäller värd-patogeninteraktioner. Caecaloider har endast odlats fram från kanin och mus tidigare (Beaumont 2021; Duque-Correa *et al.* 2020; Mussard *et al.* 2020). Nedan följer en summering av tidigare forskning på odling och karaktärisering av caecaloider från respektive djurslag.

2.2.3 Odling av caecaloider från mus

Duque-Correa *et al.* (2020) som odlat caecaloider från mus beskriver att signalfaktorn Wnt behövs för att caecaloiden ska bilda kryptliknande strukturer, kunna tillväxa och knoppa sig (engelskans budding). Wnt-signalen är som högst i kryptorna och blir lägre mot lumen. Det gör att en lägre koncentration av Wnt inducerar en terminal differentiering av celler som förflyttat sig bort från kryptorna mot lumen, likt resultaten från enteroider odlade av Sato *et al.* (2009). Eftersom caecum saknar panetceller som tillverkar Wnt, har Duque-Correa *et al.* (2020) tillsatt en Wnt ligand (Wnt3A) i sitt medium för kultivering av organoider från caecum. En högre koncentration av Wnt3A gav sfäriska och mindre knoppade (icke-sfäriska) caecaloider. Duque-Correa *et al.* (2020) kunde se att genuttrycket i mus-caecaloider påverkades av koncentrationen Wnt i mediet. Caecaloider som tillväxte i medium med lägre koncentration av Wnt hade ett högre genuttryck av cellmarkörer för differentiering (MUC2 för bägarceller och LYZ för panetceller). LGR5 uttrycktes lägre i media med låg koncentration av Wnt vilket tyder på att det finns mindre stamceller i dessa caecaloider. Cellmarkören för enteroendokrina celler (CHGA) verkar inte påverkas av koncentrationen Wnt.

Duque-Correa *et al.* 2020 har studerat mus-caecaloider med flödescytometer (image stream) där de kunde se en stor likhet mellan cellerna i caecaloiderna och celler från ursprungsvävnaden. Med en flödescytometer kan epitelceller, bägarceller, enteroendokrina celler och panetceller sorteras. De kunde dock inte se några panetceller med denna metod i caecaloiderna. Trots det hade de ett uppmätt genuttryck av LYZ som kodar för lysozym och representerar panetceller i caecaloiderna.

2.2.4 Odling av caecaloider från kanin

Mussard *et al.* (2020) såg att caecaloider från kanin också hade olika morfologiska former. De fann att de sfäriska caecaloiderna hade en större diameter, hög proliferationsgrad men låg differentieringsgrad. Icke-sfäriska caecaloider hade en hög differentieringsgrad och en mer diversifierad morfologi som även beskrivs som multilobulerad. Dessa fanns endast efter 5-7 dagars odling. Genuuttrycket skilde sig mellan sfäriska och icke-sfäriska caecaloider. Cellmarkörer för proliferation (LGR5 och SOX9) var högt i sfäriska odifferentierade caecaloider. Uttryck av LGR5 var dock högre i de epiteliala kryptorna än i caecaloiderna. Resultat från genuuttryck visade även på att stamcellerna i caecaloiderna differentierat då viktiga celltyper i epitelbarriären finns med (absorberande epitelceller, enteroendokrina celler och bägarceller).

Mussard *et al.* (2020) visade även på att andra viktiga komponenter i epitelbarriären, t.ex. lysozym som är en sorts antimikrobiell peptid fanns med och har troligen en funktion *in vitro*. PCNA som är en cellmarkör för proliferation var reducerad i de icke-sfäriska caecaloiderna. Cellmarkörer för differentierade celltyper (MUC2 för bägarceller och CHGA för enteroendokrina celler) var högre i de icke-sfäriska caecaloiderna. Uttrycket av cellmarkören LYZ var ca 10 gånger högre i icke-sfäriska caecaloider i jämförelse med sfäriska och högre än kryptorna (dock ej signifikant). Glyn *et al.* (2024) har studerat cellmarkören LYZ på humanpatienter och sett en koppling mellan minskat uttryck av LYZ och coloncancer. De drog slutsatsen att lysozym har en inhiberande påverkan på neoplasiomvandling, och samtidigt har en viktig funktion i mikrobiotan och immunförsvaret.

2.2.5 Genuuttryck i tarmepitel

Cellmarkörerna som används på häst och andra djurslag representerar olika celltyper men de är inte specifika för enskilda celltyperna som de representerar, utan generna kan uttryckas i andra celler också. Ett exempel på detta är DCLK1 som är en cellmarkör för det mikrotubuli-länkade proteinkinas (Double cortin-like kinase 1) som finns i tuftceller, men har på mus även hittats i enteroendokrina celler och i stamceller (Gerbe *et al.* 2012). Cui *et al.* (2023) beskriver att MUC2 kan användas för att markera både bägarceller och panetceller på häst, liksom att SOX9 även markerar panetceller.

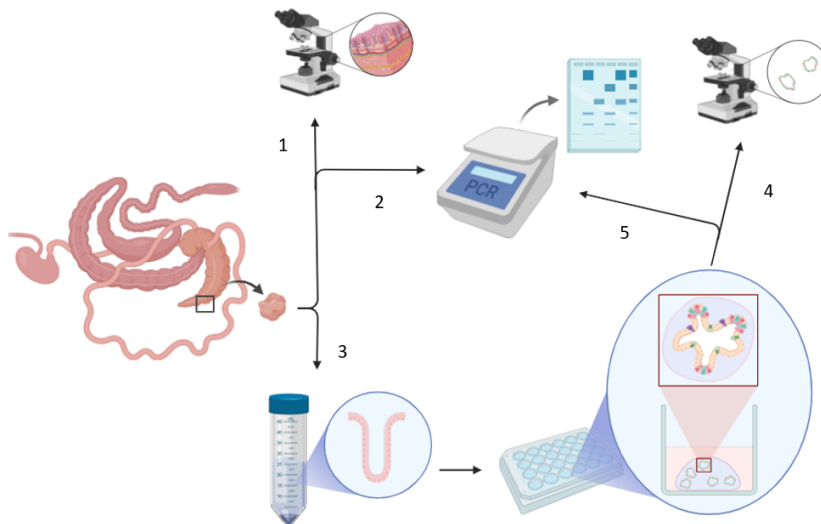
Hellman (2021) har undersökt genuuttryck för hästens jejunum och jämfört med enteroider. Cellmarkörerna som undersöktes representerade olika celltyper i tarmen. Hellman (2021) har publicerat dessa cellmarkörer och respektive primers som användes för quantitative Polymerase Chain reaction (qPCR) för gener som representerar epitelceller (EPCAM), proliferativa celler (PCNA och SOX9), stamceller (LGR5 och SOX9), panetceller (LYZ), enteroendokrina celler (CHGA), bägarceller (MUC2) och tuftceller (DCLK1). Det finns beskrivet att samtliga gener utom LGR5 hade genuuttryck i jejunal vävnad såväl som

enteroiderna. Uttrycket för EPCAM var högst i enteroiderna. Genuttrycket i enteroiderna var stabilt i alla 6 passager som redovisades. SOX9, LYZ och PCNA hade generellt lika stort uttryck som referensgenerna medan CHGA, MUC2 och DCLK1 hade lägre relativt uttryck.

Windhaber *et al.* (2024) gjorde sedan en likande studie där de jämförde genuttrycket och morfologin hos enteroider och colonoider med dess ursprungsvävnad. Genom att avlägsna Wnt från mediet kunde de se att differentiering av epitelceller ökade och fick en hög efterliknad till ursprungsepitelet *in vivo*. Både enteroiderna och colonoiderna var till en början sfäriska i formen och differentierade sedan till mer multilobulerad karaktär, varierande beroende på mediets tillsatser. Genuttryck av EPCAM uppmättes och histologiska snitt av organoiderna visade ett differentierat epitel. Med hjälp av immunohistologisk infärgning med cellmarkör för CHGA (enteroendokrina celler) kunde de se denna celltyp i jejunum och colon. De kunde även uppmäta genuttryck av CHGA med hjälp av PCR. Dock var uttrycket av CHGA i jejunum betydligt högre än i enteroiderna. I colon kunde de även se rikligt med bägarceller i HE-färgning och genuttryck av MUC2 uppmättes med hjälp av qPCR. Genuttrycket av MUC2 i jejunum varierade beroende på mediets tillsatser. De fann även genuttryck för panetceller (LYZ) i enteroiderna som skattades vara högre än i jejunumvävnaden. Detta undersöktes inte för colonoider i Windhaber *et al.* (2024).

3. Metod

Caecumvävnad togs från totalt fyra varmblodiga travare. Tre av hästarna (häst 1, 2 och 3) hade donerats till Institutionen för Kliniska Vetenskaper på Svenska Lantbruksuniversitetet (SLU, Uppsala) för utbildning av veterinärstudenter. På grund av ortopediska orsaker avlivades hästarna, i övrigt var de friska från gastro-intestinal sjukdom. Ägarna har godkänt hästarnas bidrag till forskning. Hästarna hade vid tillfället för avlivning varit i narkos i ca 5 h i högersidigt sidoläge. De avlivades medicinskt och vävnadsprov tog från hästen inom 1 h från avlivningen och placerades direkt på is. Vävnadsprov togs från caecums vägg, storlek ca 10x10 cm i området 10-20 cm från caecums apex. Vävnad från en häst (häst 4) togs i samband med slakt vid Faringe slakteri i Uppland. Vävnad från caecum ca 10-20 cm från apex togs ca 30 min efter avlivning och transporterades i buffert med tillsatser PBS, EDTA, DTT och Y27 på is till SLU, ca 1 timmes bilfärd. Hästarna i studien var alla varmblod och bestod utav 2 ston (15 år respektive 17 år) en valack (8 år) och en hingst (1 år). Respektive användningsområde för hästarna i studien visas i tabell 3 i resultat. Caecumvävnaden från hästarna delades upp och vävnadsprov togs för 1. Fixering i paraffin inför histologisk undersökning, 2. Nedfrysning i RNA-later inför undersökning av genuttryck med RT-qPCR, och 3. Kryptisolering (a) och odling (b) av caecaloider. 4. Caecaloiderna skördades inför histologisk undersökning respektive undersökning av genuttryck. En sammanfattning av flödesschemat finns i figur 2 nedan.



*Figur 2. Schematisk bild av flödesschema för respektive användningsområde. Vävns-
provet från hästens caecum 1. Sparas i paraffin inför histologisk undersökning med
ljusmikroskop, 2. Sparas i RNA-later inför undersökning av genuttryck med RT-qPCR
och 3. För kryptisolering och odling av organoider som sparas inför 4. histologisk
undersökning respektive 5. undersökning av genuttryck. Organoiderna odlades i 24-
brunnsplattor där kryptorna placeras i en matrigel som formar en kupol (ljusblå) och ett
flytande övertäckande medium (overlay medium, rött) med tillsatser tillför näring som
behövs för celltillväxten. Bild skapad i BioRender av författaren.*

3.1 Kryptisolering

Metoden följde ett modifierat protokoll från Hellman (2021). Se fullständigt protokoll på engelska i protokoll 1, bilaga 1.

Vävnaden tvättades i iskall fosfatbuffrad koksalt Phosphate Buffered Saline, (PBS). Små vävnadsprov 2x1 cm skars i mindre bitar och samlades i två falconrör 50 ml med iskall PBS med 30mM EDTA, 1mM DTT och 10 μ M Y27 för att inkuberas på is i 30 min i kylrum på en skakplattform (60 rpm) med kraftfulla 10 skakningar (manuellt) upp och ner var 5:e minut. Vävnad fördes sedan över till nya falconrör 30 ml med förvärmad PBS + 30mM EDTA+ 10 μ M Y27, inkubades i 10 min i 27 grader på skakplatta (250 rpm) med 10 skakningar var annan minut (totalt 4 st). Före första tvätten överförs vävnaden sedan till nya falconrör med iskall PBS+ 2 % PEST+ 1 μ g/ml Fungizone, inkuberas i 5 min på skakplatta i kylrum och inverteras varje 30:e sekund. Därefter flyttas vävnaden till nya falconrör med iskall PBS+ 2 % PEST+ 1 μ g/ml Fungizone, skakas sedan kraftfullt i 1 min för att kryptor ska lossna. Efter varje skak på en minut kontrolleras fraktionen i ljusmikroskop tills fler kryptor än villi syns i ljusmikroskop. De olika tvättfraktionerna dokumenterades med bilder genom ljusmikroskop. Den fraktion som innehåller flest kryptor odlas ut i matrigel, se nästa paragraf.

3.2 Kultivering av kryptor

Kultivering av kryptor genomfördes i anslutning till kryptisolering av färskt material med kryptor. Kryptor såddes ut i matrigel från Corning med två olika protokoll; 1. Odlingsmedium Hellman (2021) med DMEM/F12 och tillsatser av tillväxtfaktorer (se protokoll 2, Bilaga 1), 2. Kommersiellt Intesticultmedium från StemCell (#06010) med supplement B27, N2, Fungizone och PEST, och tillväxtfaktorerna SB202190, LY2157299, Y27632.

I korthet, kryptor blandas med tillväxtfaktor-supplemerad matrigel innan 50 μ l matrigel appliceras i en kupol (eng dome) i varje brunn på en förvärmad odlingsplatta med 24 brunnar. Matrigelen täcks sedan med ett övertäckande lager av odlingsmedium (eng overlay medium, i denna studie används DMEM/F12+GlutMAX från gibco) som även den är förvärmad i 37 °C. Plattorna med caecaloider förvarades i värmeskåp (37 °C, 7 % CO₂). Nya tillväxtfaktorer i en tillblandad GrowthFactor-mix (GF-mix) tillsattes i 1. Var 48:e timma separat från byte av overlay medium respektive 2. 96:e timma (se protokoll 2, bilaga 1) i samband med byte av overlay medium. Tillsats av GF-mix i utkanten av brunnen för att undvika att skada kupolen av matrigel. Byte av overlay medium gjordes var 96:e timmar i båda odlingsmetoderna, i 1. Separat från GF-mix och 2. I samband med tillsats av Gf-mix. Vid byte av medium pipetteras overlay medium upp, utan att skada kupolen med pipettspetsen. Sedan tillsätts ett nytt övertäckande medium med GF-mix enligt protokoll (protokoll 2, bilaga 1). Efter 7 dagar fragmenteras

caecaloiderna enligt protokoll (protokoll 2, bilaga 1). Flera passager kan göras. Varje dag dokumenteras caecaloidernas tillväxt och fotas. Samma metod används vid kultivering av frysta caecaloider och efter varje passage (fragmentering av caecaloider följt av ny odling av fragmenten).

3.3 RNA-rening och RT-qPCR

RNA-rening av vävnad från individerna genomfördes med NucleoSpin® RNA enligt protokoll 4, bilaga 1. För caecaloiderna användes ett annat protokoll, NucleoSpin® RNA Plus XS (protokoll 4, bilaga 1). Koncentrationen av mRNA kontrollerades med nano-drop, se tabell 5 i resultat. Allt mRNA som renats fram behandlades med DNase (protokoll 6, biaga 1), sedan tillverkades ett cDNA-bibliotek (protokoll 7, bilaga 1) för varje prov inför RT-qPCR med SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Proverna består utav 3 originalvävnader samt en caecaloid med tillhörande negativa kontroller (se listade i tabell 5 i resultat).

3.3.1 RT-qPCR

RT-qPCR genomfördes med QuantiTect® SYBR® Green PCR kit (Qiagen) för att mäta genuttryck av 8 gener som är specifika för olika celltyper i hästens tarm, tidigare använda av Hellman (2021) och Stewart *et al.*, (2018). För intern normalisering användes 3 referensgener, även kallade house keeping gener (HK) som uttrycks av alla celler. Nedan följer en tabell (tabell 1) med samtliga gener och tillhörande primers som används. Tre tekniska replikat gjordes per vävnad per gen, totalt 12 brunnar per gen, samt negativa kontroller. För varje primer beräknas koncentrationer av innehållet i QuanTitect SYBR Green PCR mastermix (protokoll 8, bilaga 1), vilket beror av primerkoncentrationen för respektive gen. Primerkoncentrationen är listad i tabell 1. Totalt laddades varje brunn med 25 µl, varav 2 µl cDNA och 23 µl QuanTitect SYBR Green PCR mastermix. För reaktionen användes CFX96 Touch PCR-maskin (Biorad). Analys av temperaturkurvor och erhållna Cq-värden gjordes i mjukvara BioRad CFS Manager Software (Version 3.1) och Cq-värdena exporterades till Excel för statistisk analys, se nedan.

Tabell 1. Lista över primers för 8 hästspecifika gener och 3 referensgener (house keeping genes, HK) som användes. Sekvens för Forward (F) respektive Reverse (R) primers. a= primer överlappar mellan två olika exon. b= primers ligger på samma exon Källa primer c= Stewart et al. (2018). d= Hellman (2021)

Target	Gen	Primersekvens	Primer konc. (nM)	Annealing temp. (° C)	Storlek (bp)
Epitheliala celler ^c	EPCAM	F: TGA CCA CAA ACT GCT CTG TGA R: GAG CCC GTC GTT ATT CTG GAT	400	59	168
Proliferativa celler ^d	PCNA	F: AAG CCA CTC CAC TGT CTC CTA R: CTA GGA TGC GTC CTC ATC CTC	400	59	170
Intestinala stamceller ^c	LGR5	F: AGC CTG GTG GTT CTG CAT CT ^a R: AAC GCT TTC TCG GGG ATC AG	400	57	179
Proliferativa celler och stamceller ^d	SOX9	F: CCT TGA GAA GAC CGT AGA CAA AG ^a R: ATT CGG TAC GAG TTG CCT TTA G ^a	500	60	145
Panetceller ^d	LYZ	F: CAC CAT GAA GGT TCT CCT GAC R: CCA TCT GGC CAA ACA GAC C	500	58	164
Entero-endokrina celler ^c	CHGA	F: CTG CGA GGA GAT GAA CGG AT ^a R: AGA ACC TCT GCG AGT TCG TC	400	60	189
Bägarceller ^c	MUC2	F: GAG TGT GAG TGG CAC TAC GAG R: TCA TAG ATG GGC CTG TGC TTA	400	59	211
Tuftceller ^d	DCLK1	F: TGC TAC AGC ATC TAG TGT ACA GAA T R: CCT GCA TTC TTC GGA GCT G	500	58	163
Referensgener					
	GAPDH	F: ATC TGA CCT GCC GCC TGG AG R: CGA TGC CTG CTT CAC CAC CTT C	400	64	120
	HPRT	F: AAT TAT GGA CAG GAC TGA ACG G ^a R: ATA ATC CAG CAG GTC AGC AAA G	300	57	139
	SDHA	F: GAG GAA TGG TCT GGA ATA CTG ^{a b} R: GCC TCT GCT CCA TAA ATC G ^b	300	57	66

3.3.2 Gelelektrofores

För visuell och representativ kontroll av qPCR-produkterna, efter analys av smältkurvorna, kördes elektrofores på en 2 % agarosgel. Totalt 16 produkter laddades i ordning enligt tabell 4 i resultat. I de fall som smältkurvorna skiljde sig har ytterligare replikat tagits med i gelen för att undersöka storleken på produkten, dessa är markerade med * i tabell 4 i resultat. qPCR-produkterna kördes på gel enligt protokoll 8 i bilaga 1 för att validera storleken på produkterna. Cq-värden som översteg 38,0 eller tekniska replikat som skiljde sig mer än 1,5 gång i Cq värde valdes att strykas ur analysen.

3.4 Histologi

Histologisk undersökning genomfördes av både vävnadsprov (häst 1, häst 2 och häst 3) samt från caecaloider. Fixering, snittning och färgning utfördes enligt gängse rutin på Patologi-lab. Inför fixering av caecaloider respektive vävnadsprov behandlades de med 10 % Formalin. Snitt färgades med Hematoxylin-Eosin (HE) och Periodic Acid Schiff (PAS). Inbäddning, snittning och färgning av vävnadsprover genomfördes i Patologi-lab av Albin Norman, Biomedicinsk analytiker vid Institutionen för Husdjurens biovetenskaper, Enheten för patologi. Se protokoll 11 för HE-färgning respektive protokoll 12 för PAS-färgning i bilaga 1.

3.4.1 Morfologisk analys

Histologiska snitt i HE och PAS av vävnaden från häst 1 och 2, samt ett histologiskt snitt från caecaloiden häst 4 undersöktes morfologiskt med ljusmikroskop. Totalt 14 synfält från caecaloiden och vävnaderna från de två hästarna fotades och antalet bägarceller och mitoser beräknades per synfält.

Bägarceller beräknades bäst i PAS-färgning. Mitoser beräknades bäst i HE-färgning. Endast tydliga kärndelningar med polade kärnor räknades som en mitos.

3.5 Statistisk analys

Resultatet av RT-qPCR och morfologisk beräkning analyserades och plottades i GraphPad Prism 10.4.0. De 3 referensgenernas genuttryck (Cq-värden) sammanställdes för alla 4 proven (häst 1,2,3 och caecaloid) och ett geometriskt medelvärde (GM referensgener) beräknades. Medelvärde för genuttryck för varje gen i (form av Cq-värdet) ställdes i relation till referensgenerna för ett relativt värde av uttryck ($\Delta Cq = \text{medelvärde Cq} - \text{GM referensgener}$). Potensen av det relativa Cq-värdet $2^{-(\Delta Cq)}$ plottades i GraphPad.

För jämförande plot av vävnader från häst 1, 2, 3 och caecaloiden beräknades först ett relativt värde av $\Delta\Delta Cq$ och sedan $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$.

Statistisk analys genomfördes i GraphPad med ANOVA one way (non parametric, Kruskal-Wallis test multiple comparisons) för jämförande av genuttryck i caecum vävnader från häst 1, 2 och 3.

Morfologisk beräkning av bägarceller respektive mitoser plottades i GraphPad, statistik analys genomfördes med envägs-ANOVA, p-värde $<0,05$ anses som signifikant.

4. Resultat

Av ekonomiska skäl kunde inte vävnad från alla hästarna användas för odling av caecaloider, därav är inte vävnaden från varje häst med i alla delar av studien. En sammanfattning av varje användningsområde för respektive häst finns listad i tabell 1. Protokollet justerades efter odling av caecaloider från häst 1, inför odling av häst 4. Kryptor från häst 2 och 3 förlorades efter nedfrysning och användes därför inte i studien. Kryptor från häst 1 kunde odlas efter nedfrysning. Kryptor från häst 4 följs från dag 0 och frystes ej ner under studiens gång.

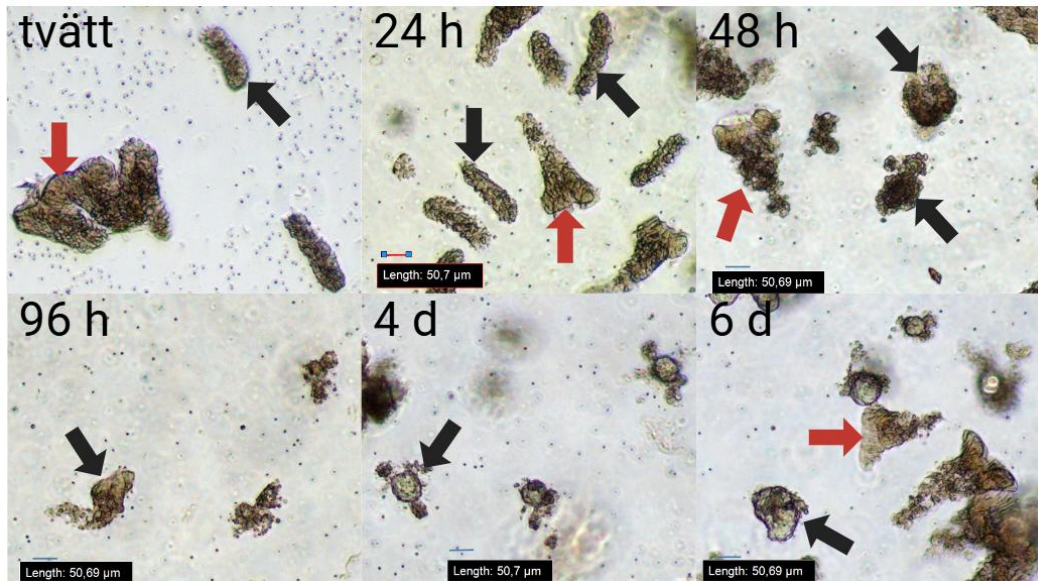
Tabell 3. Lista över var hästarna ingick i studien med individuella variationer.

Häst	Odling caecaloid	RT-qPCR caecumvävnad	RT-qPCR caecaloid	Histologi caecumvävnad	Histologi caecaloid
Häst 1	X	X	X	X	-
Häst 2	-	X	-	X	-
Häst 3	-	X	-	-	-
Häst 4	X	-	-	-	X

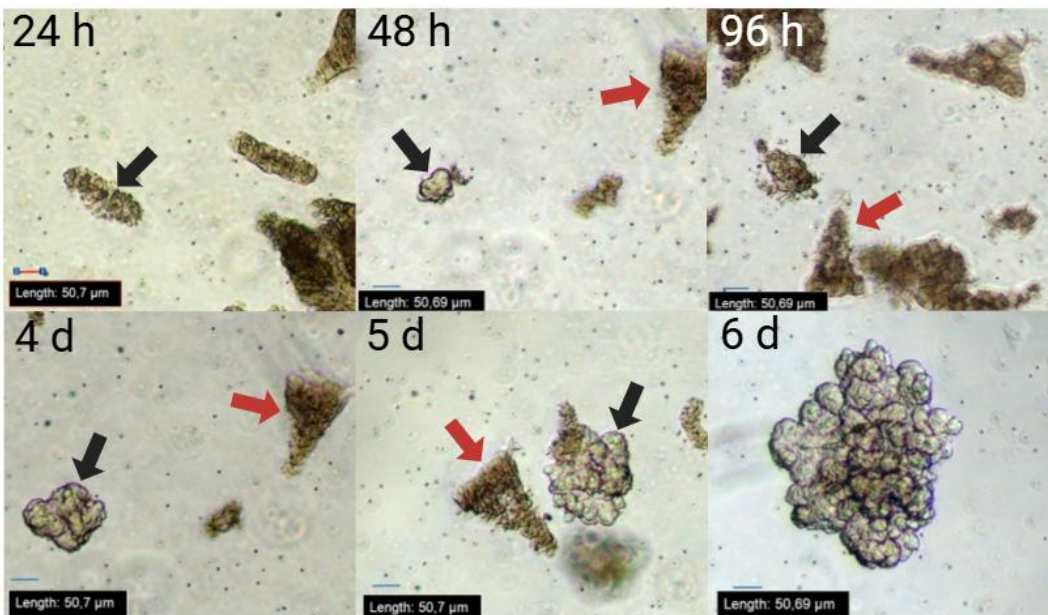
4.1 Odling av caecaloider

Dokumentation i form av bilder från kryptisolering och tvätt, samt kultivering och odling av kryptor till caecaloider från 24 h till och med dag 6 fotades med ljusmikroskop i 4X. Caecaloider odlade i Hellman medium i figur 3, respektive human Intesticultmedium från StemCell i figur 4. Epitelets toppar (villi-liknande) bevarades under hela första passagen i båda media och kunde ses som trekantiga cellformationer som inte tillväxte med tiden och kunde således användas som en storleksreferens.

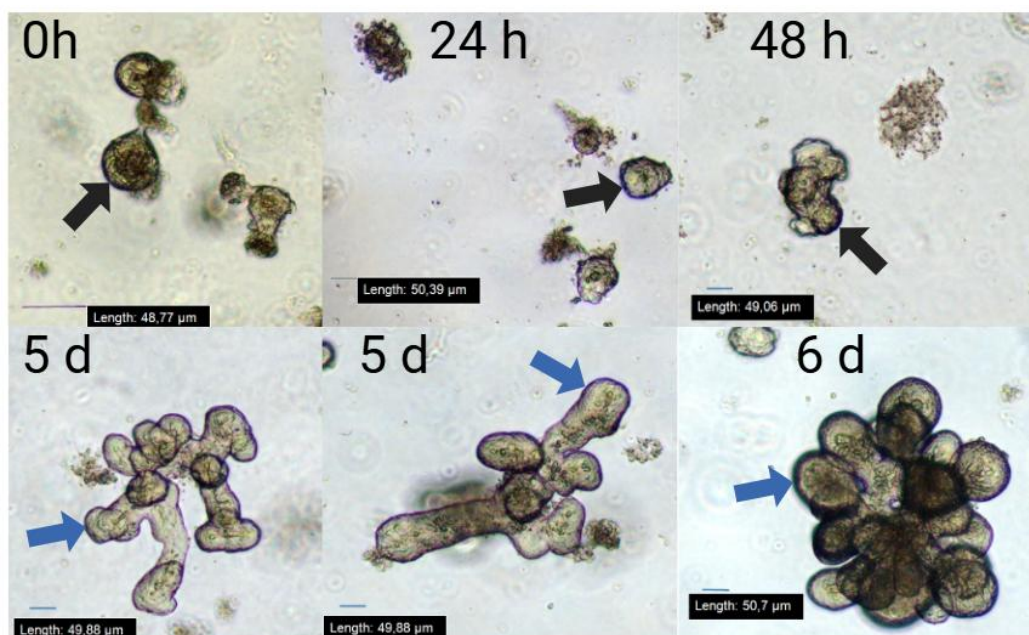
I första passagen hade caecaloiderna som tillväxte generellt en sfärisk form i båda media. De sfäriska caecaloiderna hade en distinkt kontur. Caecaloider odlade i intesticultmedium växte snabbare i passage 1 i jämförelse med Hellman medium. Dag 6 var caecaloiderna i snitt 3 gånger större i intesticultmedium i jämförelse med Hellman medium. Caecaloiderna i intesticultmedium hade fortfarande en rund sfärisk form, men konturen var mer diffus och hade en multilobulerad karaktär efter dag 4. Detta syntes inte i Hellman medium de första 6 dagarna.



Figur 3. Odling i Hellman media, passage 1. Foton av kryptor (svart pil) efter tvätt samt odling i 24 h till och med 6 dagar visar att kryptor bryts ner, genomgår celldöd och organiserar sig, prolifererar till sfäriska organoider, samt några enstaka icke-sfäriska. Epitelets tippor (röd pil) är trekantsformade och bevaras under odlingen utan att genomgå någon cellomvandling. Scalebar är ca 50 μm .



Figur 4. Odling i human intesticultmedia StemCell, passage 1. Foton av kryptor (svart pil) efter tvätt samt odling i 24 h till och med 6 dagar visar att kryptor bryts ner, genomgår celldöd och organiserar sig, prolifererar till sfäriska organoider. Efter dag 4 bildas multilobulerade caecaloider med icke-sfärisk morfologi. Epitelets tippor (röd pil) är trekantsformade och bevaras under odlingen utan att genomgå någon cellomvandling. Scalebar är ca 50 μm .



Figur 5. Odling i Hellman media (2021), passage 3. Foton av organoider (svart pil) efter fragmentering (0h, 10X) av organoider odlade i 14 d (2 passager) samt odling i 24 h till och med 6 dagar i 4X från passage 3. Foton visar att kryptliknande utskott bildas med tiden (blå pil), s.k. budding. De flesta organoider är icke-sfäriska. Scalebar är ca 50 µm.

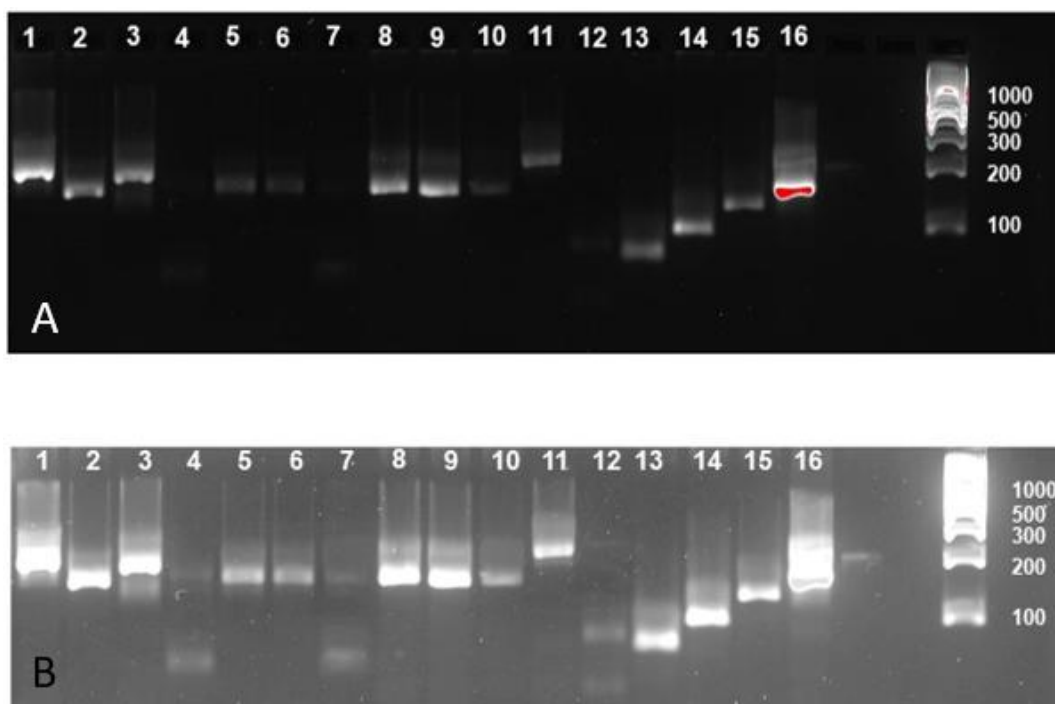
I passage 3 (figur 5) kunde vi se att de fragmenterade organoiderna (0h i 10X) började dela sig igen inom 24 h och bildade sfäriska och senare icke-sfäriska organoider. De kryptliknande utskotten som visas i figuren bildades och är tydligast på foton efter 5 dagar. Endast enstaka sfäriska organoider med stor diameter kunde hittas vid denna period. Dag 6 visar mörka områden som består utav celldöd centralt i de multilobulerade organoiderna.

4.2 Genuttryck caecum och caecaloider

Genuttrycket mättes med qPCR av 8 gener (EPCAM, PCNA, MUC2, DCLK1, SOX9, CHGA, LGR5 och LYZ) varav en gen (LGR5) uteslöts från analysen pga av väldigt lågt uttryck. Värdena (Cq-värdet) sattes i relation till uttrycket från referensgenerna och plottades i GraphPad Prism. Detta gjordes för caecum vävnad från häst 1, 2 och 3 respektive caecaloiden från häst 1. Statistisk analys med envägs-ANOVA gjordes för vävnadernas genuttryck. Produkterna från qPCR analyserades och storleken på produkterna validerades med hjälp av gelelektrofores. Resultatet visas i figur 6. Produkterna från alla de 8 generna laddades, samt de tre referensgenerna (GAPDH, SDHA och HPRT) enligt tabell 4 nedan. Resultatet från gelelektroforesen visas i figur 6. En exponerad version av bilden (med högre kontrast, redigerad i Photoshop) visas i figur 7.

Tabell 4. Gelelektrofores av PCR-produkter, tabellen visar ordningen som brunnarna laddades i, inklusive stegen med 100-1000 bp. Förväntad storlek anges i baspar (bp).
 *innebär att qPCR analys och dess produkter i gelektrofores skiljer sig från de representativa produkterna i samma qPCR-analys.

	Gen	Förväntad storlek (bp)
1	EPCAM	168
2	PCNA	170
3	MUC2	211
4	DCLK1*	163
5	DCLK1	163
6	DCLK1*	163
7	DCLK1*	163
8	SOX9	145
9	CHGA	189
10	CHGA*	189
11	LGR5	179
12	LGR5*	179
13	GAPDH	66
14	SDHA	120
15	HPRT	139
16	LYZ	164
18	Stege	100-1000



Figur 6. Gelelektrofores av qPCR-produkter A. originalbild och B. exponerad bild. Bilden visar storleken i 100-1000 baspar i stegen till höger i respektive bild. Varje brunn innehåller ett prov enligt: 1: EPCAM, 2: PCNA, 3: MUC2, 4-7: DCLK1, 8: SOX9, 9-10: CHGA, 11-12: LGR5, 13: GAPDH, 14: SDHA, 15: HPRT, 16: LYZ.

Avsaknad av produkt i brunn 4, 7 och 12 indikerade inget eller mycket litet genuttryck. På den (över)exponerade bilden (B) redigerad i Photoshop som visas i figur 6 syns ett till två svaga band. Band på storlek <100 bp tolkas som primer-dimerer, och räknas inte som produkter i qPCR-körningen.

Tabell 5. RNA-rening, uppmätta koncentrationer av mRNA (ng/ul) avgör mängd RNA (ul) resp H2O (ul) som späds ut med i protokoll 4 resp 5 i bilaga 1.

Ursprung av vävnad	Konc. Nanodrop (ng/ul)	Konc. Tape station (ng/ul)	RNA (ul) for 1,2 ug (max 8 ul)	H2O (ul)
Häst 1	188	255	5,33	4,27
Häst 2	206	183	6,56	3,04
Häst 3	328	305	3,93	5,67
Caecaloid H1	262	515	2,33	7,27

4.2.1 Genuttryck caecumvävnad och caecaloid

De 3 referensgenernas genuttryck (Cq-värden) sammanställdes för alla 4 proven (häst 1,2,3 och caecaloid) och ett geometriskt medelvärde (GM referensgener)

beräknades, se tabell 6. Medelvärde för genuttryck för varje gen i (form av Cq-värdet) ställdes i relation till referensgenerna för ett relativt värde av uttryck (ΔCq = medelvärde Cq - GM referensgener), se tabell 7. Potensen av det relativa Cq-värdet $2^{-(\Delta Cq)}$ plottades i GraphPad, se figur 7.

Tabell 6. Det geometriska medelvärdet för de tre referensgenerna GAPDH, SDHA och HPRT hos respektive vävnadsprov.

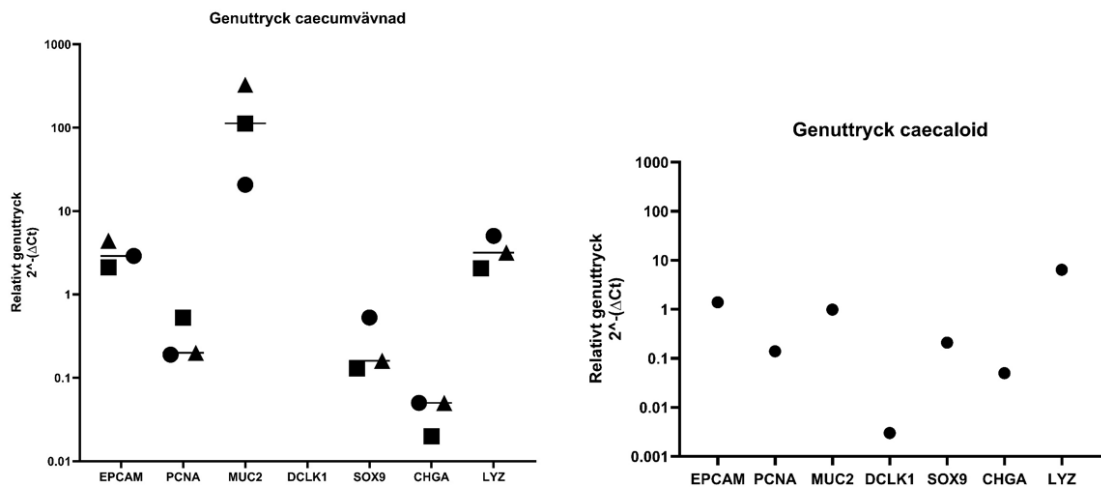
Gen	Geometriskt medelvärde för referensgenerna
Häst 1	30,30
Häst 2	29,44
Häst 3	29,66
Caecaloid	24,56

Tabell 7. ΔCq -värden (ΔCq = medelvärde Cq – GM referensgener)) uppmätta för respektive gen och vävnadsprov.

Gen	Häst 1	Häst 2	Häst 3	Caecaloid
EPCAM	-1,54	-1,08	-2,14	-0,48
PCNA	2,42	0,91	2,30	0,14
MUC2	-4,37	-6,82	-8,36	0,02
DCLK1				8,63
SOX9	0,92	2,92	2,65	0,21
CHGA	4,20	5,46	4,28	0,05
LYZ	-2,34	-1,04	-1,67	6,42

Genuttryck uppmättes för generna EPCAM, PCNA, MUC2, SOX9, CHGA och LYZ i caecumvävnad för de samtliga tre individerna, se figur 7. Inget genuttryck uppmättes för DCLK1 i caecumvävnad. MUC2 hade högst relativt uttryck i vävnaden, cirka 100 gånger (median) högre jämfört med referensgenerna. Uttryck för generna EPCAM, LYZ, PCNA och SOX9 var i nivå med referensgenerna. Lägst uttryck hade CHGA som låg ungefär 15 gånger (median) lägre än referensgenerna. Genuttrycket för MUC2 var signifikant högre än CHGA (15 gånger högre, $p=0,0086$).

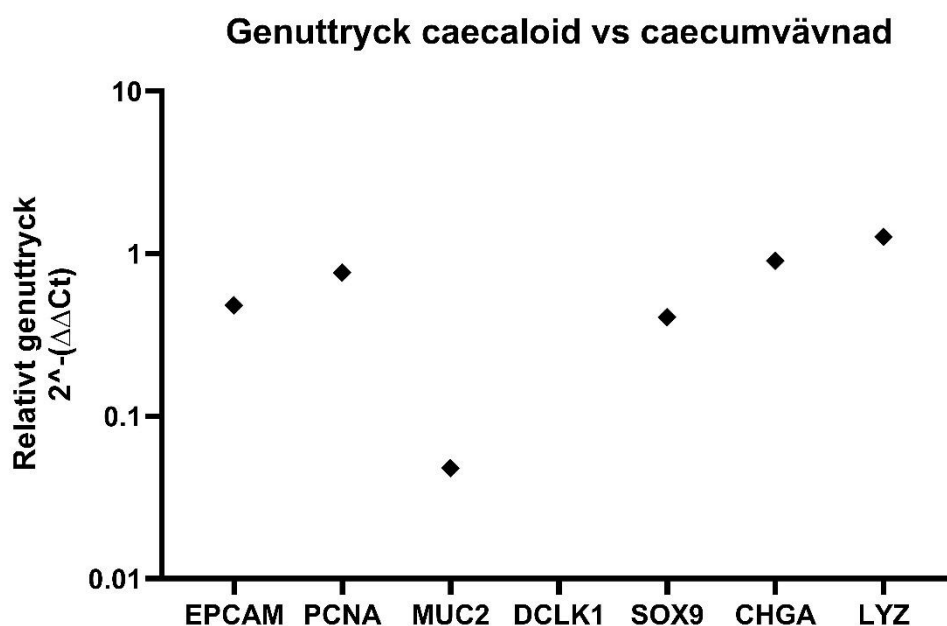
Cecaloid odlad från stamceller från häst 1 hade uppmätt genuttryck för samtliga gener vilket visar att det inte är enbart stamceller eller progenitorceller i caecaloiden, utan ger oss en indikation på att dessa har börjat differentiera (figur 7). Genuttryck av EPCAM (epitelceller) och MUC2 (bägarceller) uppmättes ha ett uttryck i nivå med referensgenerna. LYZ (panetceller) uppmättes upp till 10 gånger högre uttryck än referensgenerna. PCNA och SOX9 (progenitorceller och stamceller), DCLK1 (tuftceller) och CHGA (enteroendokrina celler) hade ett lägre relativt uttryck i förhållande till referensgenerna.



Figur 7. Punktdiagram för genuttryck i caecumvävnad för 3 individer, samt genuttryck för caecaloiden från en individ. Diagrammen visar det uppmätta genuttrycket i relation till uttrycket av referensgener på y-axeln i log10 skala för varje gen, där 1 innebär att det uppmätta genuttrycket är lika med referensgenernas uppmätta genuttryck. De olika symbolerna visar vilka mätpunkter som tillhör samma individ. MUC2 var 100 gånger mer uttryckt i caecumvävnaden i förhållande till referensgenerna. EPCAM och LYZ uttrycktes relativt mer i caecumvävnaden i förhållande till referensgenerna, medan PCNA och SOX9 uttrycktes relativt lägre. Signifikant skillnad visades i statistisk analys mellan MUC2 och CHGA ($p < 0,05$). EPCAM och MUC2 har nästintill lika mycket uttryck i caecaloiden som referensgenerna, medan LYZ har upp till 10 gånger högre uttryck. DCLK1 har över 100 gånger lägre uttryck i caecaloiden i förhållande till ursprungsvävnaden. Även PCNA, SOX9 och CHGA har 10 gånger lägre uttryck i caecaloiden i förhållande till referensgenerna.

4.2.2 Genuttryck i caecaloid vs caecumvävnad

Det relativa uppmätta värdet för genuttryck hos caecaloiden från häst 1 sattes i relation till det relativa uppmätta värdet för caecumvävnades uttryck för häst 1 och plottades i ett punktdiagram, figur 8. LYZ hade ett högre uttryck i caecaloiden i jämförelse med caecumvävnaden. EPCAM, PCNA, MUC2, SOX9 och CHGA hade lägre uppmätt genuttryck i caecaloiden i förhållande till caecumvävnaden. Störst skillnad mellan caecaloid och caecumvävnad i genuttryck visade MUC2 som var över 10 gånger lägre relativt uttryck i caecaloiden i jämförelse med caecumvävnadens relativa uttryck.



Figur 8. Punktdiagram som visar det uppmätta genuttrycket i caecaloiden odlad från stamceller av häst 1 i relation till caecumvävnaden från häst 1 på y-axeln i log10 skala för varje gen, där 1 innebär lika mycket relativt uttryck uppmätt i vävnaden som i organoiden. Inget värde kunde skattas för DCLK1 då caecumvävnaderna inte uppmätte något värde för genuttryck. PCNA, CHGA och LYZ uttrycktes lika mycket i caecaloiden som caecumvävnaden i förhållande till referensgenerna. EPCAM och SOX9 hade ett lägre relativt uttryck i caecaloiden i jämförelse med caecumvävnaden. MUC2 uppmätte 10 gånger lägre relativt uttryck i caecaloiden i jämförelse med caecumvävnadens.

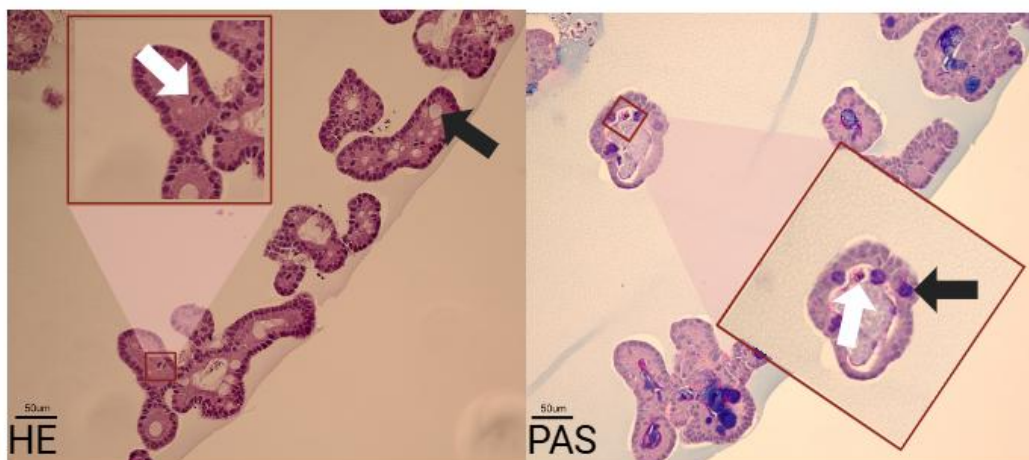
4.3 Morfologisk analys

Caecumvävnad från häst 1 och häst 2 jämfördes histologiskt med caecaloiden som odlats från stamceller från häst 4, passage 2. Både snitt med HE-färgning och PAS-färgning undersöktes med ljusmikroskop och dokumenterades med bilder.

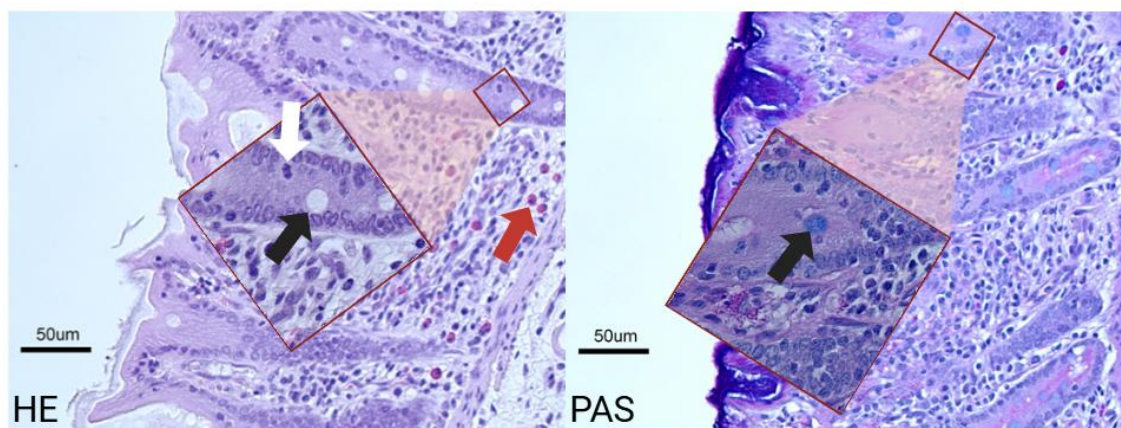
Antalet bägarceller och mitoser beräknades per synfält, totalt 14 synfält per prov. Detta gjordes både i HE-färgning och PAS-färgning i 20X. Figur 9 visar bilder från caecaloiden i tvärsnitt och i figur 10 visar bilder från caecumvävnad i längssnitt. Det går att se hur celler från kryptorna differentierar mot ytan, och enskilda mitoser går att finna i epitelet i vävnaden. Det går att finna mitoser i organoiderna också.

Bägarceller syns både i HE och i PAS. Mukus som är infärgat i PAS syns både i ett intakt mukuslager som linjerar epitelet mot lumen i vävnaden och infärgade bägarceller i vävnaden. I caecaloiden har mukus färgats in i lumen, såväl som i bägarceller.

Epitelceller är väl representerade i caecaloiden såväl som i epitelet i caecumvävnaden. I caecumvävnaden syns även måttligt med eosinofiler i lamina propria.



Figur 9. Histologiskt snitt 20X i HE-färgning respektive PAS-färgning av caecaloid. Bärgarceller (svart pil) färgas lila i PAS. Mitoser (vit pil) syns även i inzoomade bilder av HE och PAS. Scalebar är 50 μm.



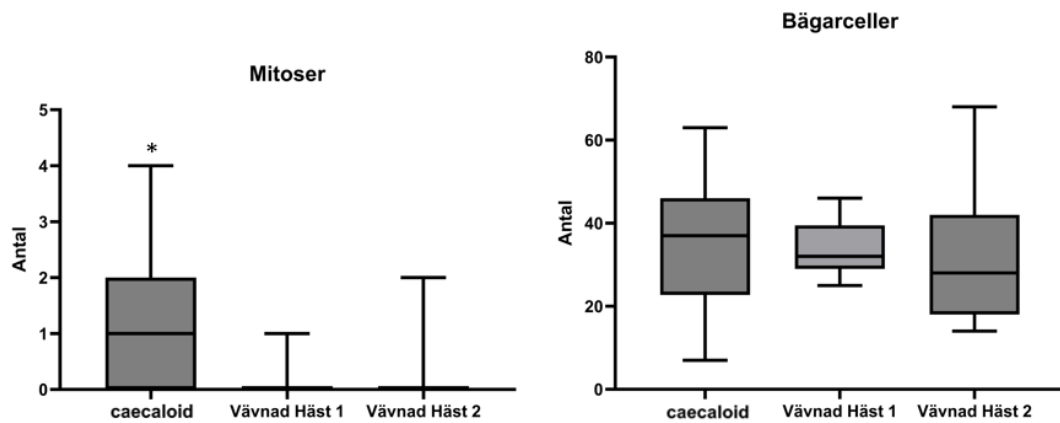
Figur 10. Histologiskt snitt 20X i HE-färgning respektive PAS-färgning av caecumvävnad. Bärgarceller (svart pil) och mucus färgas lila i PAS. Intakt mucus-lager mot lumen ses i både HE och PAS. Mitoser (vit pil) syns även i inzoomade bilder 40X. Eosinofiler (röd pil) syns i lamina propria i HE-färgning. Scalebar är 50 μm.

4.3.1 Bärgarceller och mitoser

Antalet bärgarceller per synfält beräknades (totalt 14 synfält per snitt) och visas i tabeller i figur 11 nedan. Det finns rikligt med bärgarceller i caecaloiden såväl som i caecumvävnaden.

Ingen signifikant skillnad uppmättes mellan caecaloiden och vävnaden i antal bärgarceller. Antalet mitoser per synfält beräknades (totalt 14 synfält per snitt) och visas i figur 11. Endast celler som hade poolade kärnor räknades som en mitos, se bilder på mitoser i caecaloid och caecumvävnad i histologiska snitt i figur 9 och

10 ovan. Caecaloiden hade signifikant fler mitoser per synfält än de båda vävnaderna ($p=0,0023$).



Figur 11. Boxplot som visar antalet mitoser respektive antalet bägarceller per synfält i ljusmikroskop. På y-axeln visas antalet räknade celler av respektive celltyp, på x-axeln namnges vilket vävnasprov de histologiska snitten är gjorda av. ANOVA visade på ingen signifikant skillnad av bägarceller mellan vävnadsproverna ($p>0,05$). ANOVA av antalet mitoser per synfält visade på en signifikant skillnad mellan caecaloiden och de båda vävnaderna ($p<0,05$).

5. Diskussion

Resultaten i denna studie tyder på att det går att odla caecaloider från stamceller i hästens caecum. Caecaloiderna tillväxte både i medium från Hellman (2021) och i human intesticultmedium från StemCell. Caecaloider från en häst kunde framgångsrikt frysas ner och återuppväckas. Det behövs därför mer studier på varför vissa individers caecaloider inte kunde återuppväckas efter frysning och metoden förfinas för att kunna säkerställa en framgångsrik återuppväckning. Caecaloiderna odlades till passage 3 och dokumenterades under tiden. Det gick att framgångsrikt fixera organoiderna i formalin och snitta för histologisk undersökning. Genuttrycket studerades med hjälp av RT-qPCR.

5.1 Odling av caecaloider

Caecaloiderna tillväxte från stamceller av caecum i både Hellman medium och human intesticult från StemCell. Supplement av B27, N2, Fungizone och PEST och tillväxtfaktorererna SB202190, LY2157299, Y27632 användes i båda media.

Subjektivt går det att säga att utseendet och storleken på organoiderna skiljer sig mellan media. Tillväxten av caecaloider från häst 4 var i intesticultmedium i första passagen större än i Hellman medium. Dag 6 i första passagen var caecaloidernas diameter upp till 3 gånger större i intesticulmedium. Detta trots att tillsats av tillväxtfaktorer och byte av overlay medium skedde lika ofta (var 96:e timma). Då innehållet i intesticultmedium är okänt går det inte att dra några slutsatser om skillnader mellan media. För fortsatta försök att odla caecaloider föredras Intesticult media, för större och generellt mer multilobulerade caecaloider.

Passage 3 odlades enbart i Hellman medium (2021). Fragmenten av caecaloider tillväxer med högre hastighet i passage 3 i jämförelse med passage 2. Caecaloiderna är större och mer differentierade, majoriteten dag 5 i passage 3 är multilobulerade (icke-sfäriska). Dag 6 får de flesta caecaloiderna en mörkare färg som indikerar på debris som fälls, troligen epitelceller som gått i apoptos. Detta beskriver även Windhaber *et al.* (2024) vid odling av colonoider på häst.

5.1.1 Karaktärisering av organoider

Karaktärisering av organoider i form av histologisk undersökning och undersökning av genuttryck med PCR gjorde endast på caecaloider som odlats i Hellman media. Därför kan inga slutsatser dras om genuttryck i Intesticult media. Här behövs fler studier för att undersöka karaktärisering av caecaloider odlade i Intesticult media.

Epitelceller är representerade i hög grad i både caecumvävnadens epitel och i caecaloiderna, vilket överensstämmer med organoider odlade från hästens jejunum och colon (Windhaber *et al.* 2024). Genuttryck av EPCAM uppmättes till en nivå över referensgenerna hos såväl vävnad som caecaloid, vilket förstärker intrycket av att epitelceller är väl representerade. Detta liknar resultatet i Hellman (2021) där enteroider hade ett högt uttryck av EPCAM.

Det är rikligt med bägarceller i den caecala vävnaden såväl som i caecaloiderna, vilket stämmer överens med ekvina colonoider i Windhaber *et al.* (2024), men också tidigare studier på mus och kanin (Duque-Correa *et al.* 2020; Mussard *et al.* 2020). MUC2 hade ett högre relativt genuttryck i vävnaden i förhållande till referensgenerna. I caecaloiden var uttrycket lika stort som referensgenernas. Vi kan dra slutsatser att caecaloiderna innehåller MUC2-positiva celler som även histologiskt har ett utseende av en bägarcell. I ekvina enteroider odlade i Hellman media var uttrycket av MUC2 lägre än referensgenerna, vilket stämmer överens med att jejunum har färre bägarceller än caecum (Hellman 2021). Detta styrker även att organoider odlade från stamceller i caecum har andra egenskaper än organoider odlade från stamceller i jejunum.

Caecaloidens genuttryck av PCNA (proliferativa celler) och SOX9 (stamceller och proliferativa celler) var lägre än referensgenernas uppmätta uttryck. Det skiljer sig från Hellman (2021) som hade ett högre uttryck i enteroiden av PCNA i jämförelse med referensgenerna. SOX9 hade lägre uttryck i enteroiden (Hellman 2021), likt uttrycket i caecaloiden. Enteroider kan enligt dessa resultat ha ett högre uttryck av progenitorceller än caecaloiderna, något som måste styrkas av fler studier innan några slutsatser kan dras. Genuttrycket i Hellman 2021 var konstant över 6 passager i 2D-monolager som ursprungliga 3D-enteroiden. Det behövs mer studier för att kunna dra slutsatser om det kan påverka genuttrycket i caecaloiden i vilken passage och vilken del av passagen som caecaloiden befinner sig i vid tillfället av RNA-rening. Caecaloiden från häst 1 odlades till passage 3 och bilder från slutet av passage 3 visar att de var väl differentierade och hade en multilobulerad form. Detta skulle stämma överens med ett lägre uttryck av stamceller och progenitorceller, och ett högre uttryck av differentierade celler.

Inget uttryck uppmättes av DCLK1 (tuftceller) i caecumvävnaden i qPCR. Gelelektrofores av qPCR-produkter visar i hög exponering att ett tunt band syns även i brunn 4 och 7 (DCLK1) i nivå med storleken på produkten, men ett tydligare band i mindre storlek som förmodligen är en primer-dimer (där primer-paret felaktigt binder varandra och bildar en liten produkt). Detta kan tyda på att ett mycket lågt uttryck av DCLK1 finns i dessa produkter, vilket kan förklara att värdena för Cq var så pass höga att de ej räknades med i analysen. Endast caecaloiden hade ett uppmätt uttryck för DCLK1, se figur 4. Genuttrycket av DCLK1 var lägre än i referensgenerna.

Uttrycket av enteroendokrina celler (CHGA) uppmättes till lägre i caecaloiden i förhållande till referensgenerna. Det var ett lindrigt högre uttryck av CHGA i caecaloiden i jämförelse med vävnaden. Ett lägre uttryck av CHGA i jämförelse med MUC2 stämmer överens med Gonzalez *et al.* (2015) som skriver att ett fåtal enteroendokrina celler färgades in med antikroppar mot CHGA. Även Windhaber *et al.* (2024) färgade in lindrigt med enteroendokrina celler i colonoider som också visade relativt lågt genuttryck av CHGA.

I kontrast med Hellman (2021) uppmättes genuttrycket av panetceller (LYZ) till ett högre värde i caecaloiden i relation till referensgenerna. Dessutom hade caecaloiden ett högre värde än caecumvävnaden, men även vävnaden hade ett högt uttryck av LYZ i förhållande till referensgenerna. LYZ som används som en markör för panetceller förväntas inte finnas i caecum, då panetceller i regel endast går att hitta i tunntarm på häst (Gonzalez *et al.* 2015; Cui *et al.* 2023). Fler studier krävs för att kunna dra slutsatser om vad ett högt uttryck av LYZ i caecum och caecaloider innebär. Det kan innebära att fler celltyper som innehåller lysozym som kodas av genen LYZ finns i hästens blindtarm. Även Duque-Correa *et al.* (2020) uppmätte uttryck av LYZ i caecaloider från mus. Ytterligare studier om dessa typer av celler har visat att lysozym har en viktig uppgift i epitelets egna immunförsvar, men fler studier behövs för att kunna reda ut uppkomna frågetecken. Vid human coloncancer misstänker forskare att lysozym har en viktig uppgift i immunförsvaret och en inhiberande påverkan på neoplasiomvandling (Glyn *et al.* 2024). Då caecaloiderna är snabbväxande celler där kryptstamcellerna delar sig kan mekanismer som hindrar okontrollerad celldelning fylla en viktig funktion. Ett högt uttryck av LYZ kan också innebära brister i metoden vid insamling av material från originalvävnaden och kryptisoleringen. Andra celler än kryptor kan uttrycka LYZ, så som immunceller och därmed ge ett felaktigt resultat i kryptornas genuttryck.

Stamcellsmarkören LGR5 uteslöts från analysen, då Cq-värden översteg 38 vilket tolkades som att en tillförlitlig PCR-produkt inte bildades under körningen. Markören har använts i Duque-Correa *et al.* (2015) på caecaloider från mus. I Hellman (2021) uteslöts LGR5 från analysen av genuttryck på häst. Det kan bero på att LGR5 är en dålig markör för hästens stamceller, eller att det primerpar som ärvdes från Hellman (2021) i denna studie inte är tillräckligt bra. LGR5 är en fungerande stamcellsmarkör för caecaloider framodlade från mus (Duque-Correa *et al.* 2020) respektive kanin (Mussard *et al.* 2020).

Sammanfattningsvis går det att konstatera att organoiderna har ett uttryck av gener som normalt finns i tarm (caecum) hos häst. Detta stämmer överens med det genuttryck som uppmättes från hästens caecumvävnad. Det går inte att säga något om genuttrycket av vissa gener är större eller mindre då det var för få variabler för statistisk analys. Det är intressant att i framtiden undersöka detta statistiskt med en större mängd provmaterial och odlade caecaloider från fler individer.

5.2 Histologisk undersökning

Både caecaloiden och caecumvävnaden hade rikligt med bägarceller i de histologiska snitten. Detta stämmer överens med den förväntade bilden av att caecum har rikligt med bägarceller. Det stämmer även överens med det höga genuttrycket av MUC2 som uppmättes i vävnaden. Genuttrycket av MUC2 i caecaloiden var lägre än i vävnaden. Det kan bero på att bägarcellerna i caecaloiden inte är lika aktiva som i vävnaden. Vävnaden som togs från avlivade hästar hade bland annat processat ingesta i tarmen, integrerat med mikrobiotan som finns i caecum och dessutom utsatts för mekaniskt trauma vid provtagningen. Flera aspekter kan bidra till det ökade uttrycket av MUC2 i originalvävnaden och däribland signalering från omkringliggande celler. Morfologiskt sågs ingen skillnad i de histologiska snitten, då caecaloiden hade en hög koncentration av bägarceller och även mukus som färgats in i lumen.

Mitoser som beräknades i synfälten var signifikant fler i caecaloiden i jämförelse med vävnaden. Det kan bero på att vi vid odling av kryptor selekterat för stamceller och proliferativa celler vars uppgift är att förnya epitelet och dela sig. De differentierade cellerna kan även av olika anledningar avstanna i sin differentiering tidigare i caecaloiderna i jämförelse om de klättrade mot lumen i tarmvävnaden, och därför ha en kortare livslängd. Detta kan då medföra att cellerna prolifererar mer för att bilda fler celler som kan differentiera.

Ytterligare metoder som i framtiden kan vara intressanta för karaktärisering av ekvina caecaloider för att jämföras med caecumvävnad är histokemi, flödescytopetri, immunofluorescence och *in situ* hybridisering eller laser capture bisecting. Dessa metoder skulle kunna ge information om caecaloidernas cellsammansättning och funktioner, vilket kan användas för att befästa resultatet från q-PCR som redovisas i denna studie. Även morfologisk undersökning med elektronmikroskop skulle vara en intressant jämförelse på cellnivå i framtiden.

5.3 Slutsats

Sammanfattningsvis styrker denna studie att det går att framgångsrikt odla organoider från hästens blindtarm. Caecaloiderna hade genetiska och morfologiska egenskaper som liknade orginalepitel från blindtarmen. Fler upprepningar av metoden krävs dock för att fastställa och etablera en framgångsrik metod för att odla caecaloider.

Slutligen kunde vi med resultaten från denna studie konstatera att det går att odla organoider från hästens caecum, något som hittills inte gjorts. Detta är en pusselbit i att skapa en *in vitro*-modell för blindtarm på häst som kan användas för

patologiska experiment utan att hästar behöver utsättas för onödigt lidande i försöken. Värld-parasitundersökningar med infektioner av bandmask och små blodmaskar är exempel på experiment som kan bidra till en lösning på resistensproblematiken mot avmaskningsmedel på häst i Sverige, exempelvis vid framtagning av ett vaccin.

Referenser

- Back, H., Nyman, A. & Osterman Lind, E. (2013). The association between *Anoplocephala perfoliata* and colic in Swedish horses—A case control study. *Veterinary Parasitology*, 197 (3–4), 580–585. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.020>
- Beaumont, M., Blanc, F., Cherbuy, C., Egidy, G., Giuffra, E., Lacroix-Lamandé, S. & Wiedemann, A. (2021). Intestinal organoids in farm animals. *Veterinary Research*, 52 (1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00909-x>
- Bellaw, J.L. & Nielsen, M.K. (2020). Meta-analysis of cyathostomin species-specific prevalence and relative abundance in domestic horses from 1975–2020: emphasis on geographical region and specimen collection method. *Parasites & Vectors*, 13 (1), 509. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04396-5>
- Cui, C., Li, L., Wu, L., Wang, X., Zheng, Y., Wang, F., Wei, H. & Peng, J. (2023). Paneth cells in farm animals: current status and future direction. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14 (1), 118. <https://doi.org/10.1186/s40104-023-00905-5>
- Date, S. & Sato, T. (2015). Mini-gut organoids: Reconstitution of the stem cell niche. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 31 (1), 269–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125218>
- Gerbe, F., Legraverend, C. & Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69 (17), 2907–2917. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0984-7>
- Glyn, T., Williams, S., Whitehead, M., Eglinton, T., West, N. & Purcell, R.V. (2024). Digital spatial profiling identifies molecular changes involved in development of colitis-associated colorectal cancer. *Frontiers in Oncology*, 14, 1247106. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1247106>
- Hellman, S. (2021). Generation of equine enteroids and enteroid-derived 2D monolayers that are responsive to microbial mimics. *Veterinary Research*, 52 (1), 108. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00976-0>
- Lind, E.O., Eysker, M., Nilsson, O., Uggla, A. & Höglund, J. (2003). Expulsion of small strongyle nematodes (*cyathostomin* spp) following deworming of horses on a stud farm in Sweden. *Veterinary Parasitology*, 115 (4), 289–299. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00200-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00200-0)
- Matthews, J.B., Hodgkinson, J.E., Dowdall, S.M.J. & Proudman, C.J. (2004). Recent developments in research into the *Cyathostominae* and *Anoplocephala perfoliata*. *Veterinary Research*, 35 (4), 371–381. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004026>
- Mussard, E., Pouzet, C., Helies, V., Pascal, G., Fourre, S., Cherbuy, C., Rubio, A., Vergnolle, N., Combes, S. & Beaumont, M. (2020). Culture of rabbit caecum organoids by reconstituting the intestinal stem cell niche in vitro with

- pharmacological inhibitors or L-WRN conditioned medium. *Stem Cell Research*, 48, 101980. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101980>
- Osterman-Lind, E., Holmberg, M. & Grandi, G. (2023). Selective anthelmintic treatment in horses in Sweden based on coprological analyses: Ten-year results. *Animals*, 13 (17), 2741. <https://doi.org/10.3390/ani13172741>
- Pawlina, W. & Ross, H. (2020). *Histology a text and atlas*. 8. ed. Wolters Kluwer. ss. 636-638.
- Reed, S. M., Bayly, W. M., & Sellon, D. C. (2010) *Equine Internal Medicine*. 3. ed. Saunders.
- Reinemeyer, C.R. & Nielsen, M.K. (2009). Parasitism and colic. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 25 (2), 233–245. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2009.04.003>
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., Van De Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., Van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J. & Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459 (7244), 262–265. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
- Sjaastad, Ø.V., Sand, O. & Hove, K. (2016). *Physiology of Domestic Animals*. 3. ed. Scandinavian Veterinary Press.
- Tinker, M.K., White, N.A., Lessard, P., Thatcher, C.D., Pelzer, K.D., Davis, B. & Carmel, D.K. (1997). Prospective study of equine colic incidence and mortality. *Equine Veterinary Journal*, 29 (6), 448–453. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1997.tb03157.x>
- Windhaber, C., Heckl, A., Csukovich, G., Pratscher, B., Burgener, I.A., Biermann, N. & Dengler, F. (2024). A matter of differentiation: equine enteroids as a model for the in vivo intestinal epithelium. *Veterinary Research*, 55 (1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13567-024-01283-0>

Populärvetenskaplig sammanfattning

Sjukdomar och infektioner i magtarmkanalen är ett problem både hos människa och hos djur. För att kunna utveckla bättre behandlingar vid sjukdomar likt dessa behöver de kunna studeras på ett sätt som efterliknar verkligheten. För att inte behöva utsätta levande djur för experimentella sjukdomar behövs därför en passande *ex vivo* modell som beter sig på liknande sätt som djurets eget organ och kropp.

Dagens forskning har utvecklat en teknik som gör det möjligt att i labb-miljö odla fram små, vävnadsliknande strukturer, så kallade organoider. Dessa organoider efterliknar den ursprungliga vävnaden de härstammar ifrån, likt hur det hade varit hos det faktiska djuret. I den här studien gjordes försök att odla fram organoider från hästars blindtarm.

För att skapa organoider från hästens blindtarm, hädanefter kallade caecaloider, användes stamceller som isolerats från blindtarmsvävnad på häst efter avlivning. För att få stamcellerna att växa och utvecklas till olika celltyper, tillsattes speciella tillväxtfaktorer vilka stimulerar cellerna att dela sig och utvecklas till att likna den vävnad som finns i blindtarmen.

Genom att analysera caecaloidernas genuttryck har vi kunnat identifiera flera viktiga celltyper som finns i den riktiga blindtarmen, såsom epitelceller, bågarceller och stamceller och därmed bekräfta att de har en liknande sammansättning av celler som ursprungsvävnaden. Vi har också undersökt hur cellerna ser ut under mikroskop och sett att caecaloiderna innehåller en stor mängd bågarceller, vilket ytterligare bekräftar att caecaloiderna liknar ursprungsvävnaden.

Den här framgången är viktig då vi för första gången visar att det går att odla caecaloider från hästens caecum och att dessa liknar den riktiga blindtarmen. Detta framsteg innebär att forskare nu kan odla caecaloider, vilket öppnar upp för nya forskningsmöjligheter, där man använder caecaloider för att testa olika sjukdomar, till exempel vid parasitinfektioner, utan att behöva utsätta hästar för onödigt lidande. Det är ett stort steg framåt för både djurvälståndet och veterinärmedicinen.

Tack

Jag vill uttrycka mitt djupa tack till min engagerade handledare, Eva Tydén, för hennes värdefulla vägledning och stöd under arbetets gång, samt för möjligheten att få vara en del av det inspirerande organoid-teamet vid SLU.

Ett stort tack går även till Fredrik Södersten, min biträdande handledare, för all hjälp med hanteringen av materialet i samband med den histologiska undersökningen och dokumentationen.

Jag vill även rikta ett varmt tack till Julia Andersson, som i sin dubbla roll som biträdande handledare och forskningsassistent möjliggjort labb-arbetet och varit en ovärderlig resurs. Hennes engagemang, där hon lagt ned otaliga timmar på organoid-odlingen och stöttning i övrigt, har haft en stor inverkan på arbetets framdrift.

Tack till Magnus Åbrink för värdefulla diskussioner och feedback i rollen som examinerare.

Jag vill också tacka Ove Wattle för hans hjälp med att tillhandahålla färskt vävnadsmaterial från hästarna vid studentövningarna på Institutionen för kliniska vetenskaper. Ditt engagemang har varit avgörande för att genomföra delar av studien. Stort tack även till Faringe slakteri för deras bidrag med vävnadsprov, som varit nödvändiga för vår studie.

En särskild tacksamhet vill jag också rikta till Albin Norman, för det omfattande och noggranna arbetet med de histologiska snitten som har varit en förutsättning för de resultat vi har fått fram.

Slutligen, ett stort tack till min kurskamrat Alma Lundin, som i rollen som partner i organoid-projektet varit en fantastisk stöttepelare genom hela arbetet. Ditt engagemang och din vilja att dela med dig av både tid och kunskap har betytt mycket för mig.

Bilaga 1 Samtliga protokoll från metoddelen

Protokoll 1 Kryptisolering

1. Intestinal tissue on ice
2. Cut into 2x2 cm pieces → 2 pieces/tube
3. Transfer the sections into 50 ml falcon tubes containing ice cold PBS+EDTA+Y27+DTT
4. Incubate on ice on shaking platform (60rpm) 30 min in cold room
5. Vigorously shake every 5 min (10 shakes up and down)
6. Transfer section to 30 ml pre-warmed PBS+EDTA+Y27
7. Incubate 10 min in 37° C on shaking platform (250 rpm)
8. Shake vigorously every 2-3 min (crypts are immobilised), (10 shakes up and down, total 4 times)
9. Transfer to ice cold PBS+PEST+Fungizone (Wash 1)
10. Incubate 5 min on a shaker platform in cold room
11. Invert manually every 30 s.
12. Transfer to ice cold PBS+PEST+Fungizone (Wash 2)
13. Shake 1 min vigorously. Until crypt/villi units are seen in microscope 10ul.
14. Centrifuge 200 *g 5 min
15. Suspend in PBS+BSA
16. Count crypts → aim for 50 crypts/50ul.

Cultivation of enteroids

1. Add crypt to Matrigel – approx. 20 domes/tissue
 2. Add growth factor mix
 3. Add medium – follow Matrigel protocol
- Or save, see cryostore protocol

PBS-buffers

PBS non-sterile

PBS 30mM EDTA, 1mMDTT, 10uM Y27632 – ice cold

300 ml = 18 ml EDTA (0,5M) + 0,3 ml Y27 (10mM) + 3 ml DTT (100 m)

PBS 30 mM EDTA, Y27632 (10 uM) – 37 ° C

300 ml 0 18 ml EDTA (0,5M) + 0,3 ml Y27 (10mM)

PBS 2% PEST and 1ug/ml fungizone – ice cold

1 L= PEST 20 ml, Fungizone 4 ml (Amphotericin B 250 ug/ml)

PBS + 0,1% BSA

Prepare:

Thaw Matrigel

GF mix – 80 well mix

Prewarm plates and medium

Other materials:

- Sissors
- Petri dishes
- Chapel
- Tweezers
- Ice
- Isopropanol containers Mr froser
- 50 ml tubes and 30 ml tubes – labelled in advanced
- Shaker boards
- Centrifuge
- Pipettes

Protokoll 2. Kultivering av organoider, Hellman (2021)

Reagent stocks

DMEM/F12

Matrigel

N2

B27

PEST

HEPES

Noggin

R-spondin

EGF

Wnt3a

Y27632

SB202190

LY2157299

CHIR 99021

GF-mix for 500 ul Matrigel (10 wells)

Noggin (25 ug/ml) 2 ul

R-spondin (100 ug/ml) 2,5 ul

EGF (10 ug/ml) 2,5 ul

Wnt3a (20ug/ml) 2,5 ul

Y-27632 (1 mM) 5 ul

SB202190 (1 mM) 5 ul
LY-2157299 (50 uM) 5 ul
CHIR 99021 (1mM) 1,25 ul

Overlay medium (20 wells)

DMEM/F12+glut 9,5 ml
N2 (1%) 100 ul
B27 (2%) 200 ul
PEST (2%) 200 ul
HEPES (1%) 100 ul

Preparations

Prewarm 24 well plates in 37° C minimum 30 min
Thaw matrigel on ICE
Make a GF mix keep in ICE
Make overlay medium DMEM/F12 and prewarm to 37 ° C
Make (ice cold) PBS+0,1%BSA (always pre-wet tips for avoiding cells to stick to pipette surface)
Cold tips for Matrigel

Day 1

Newly isolated crypts or thaw crypts (see crypt isolation or cryostore)

1. Wash in ice cold PBS+BSA three times – 1300 rpm for 5 min
2. Count crypts after final wash – approx. 30 crypts/dome. Always dip tip in PBS+BSA before pipetting crypts.
3. Add fragmented crypts to Matrigel + GF-mix. Pipette in mix without bubbles to get smaller pieces.
4. Plate 50 ul domes (use cold tips)
5. Incubate for 30 min in 37° C
6. Add 1ml of prewarmed overlay medium 0,5 ml/well.

Day 3 (28 h)

Add GF-mix, 2 ul per well. For 1 ml Matrigel/20 wells:

EGF (10 ug/ml) 5 ul
Wnt3a (20ug/ml) 5 ul
Noggin (25 ug/ml) 4 ul
R-spondin (100 ug/ml) 5 ul
Y-27632 (1 mM) 10 ul
SB202190 (1 mM) 10 ul
LY-2157299 (50 uM) 10 ul
CHIR 99021 (1mM) 2,5 ul

Day 5 (96 h)

Change medium and add GF.

Day 7 passage

1. Aspirate overlay medium
2. Add 1 ml of cell recovery solution (ice cold) incubate on ice 5 min.
3. Pipette gently to detach Matrigel domes.
4. Transfer to 15 ml tube
5. Incubate on ice for 15 min – invert tubes every 2 min
6. Centrifugate 1300 rpm 5 min
7. Two washes in ice cold PBS-BSA 1300 rpm 5 min
8. Count crypts after final wash – approx. 30 crypts/dome. Always dip tip in PB + BSA before pipetting crypts.
9. Remove supernatant -add pipetting steps if more fragmentation is needed.
10. Add fragments into Matrigel + GF
11. Plate 50 ul domes (use cold tips)
12. Incubate for 30 min in 37 ° C
13. Add 1 ml of prewarmed overlay medium (0,5 ml/well)

After 48 h add GF-mix

After 96 h change medium and add GF-mix.

Protokoll 3. Nedfrusning av organoider

Modifierat protokoll från Hellman (2021).

Freezing of organoids

1. Place Mr Frosty boxes at +4° C
2. Carefully remove the liquid culture medium from the side of each well.
3. Add 1 ml ice-cold PBS + 0,1% BSA to each well and break up domes by pipetting up and down.
4. Pool contents from all the wells that will be frozen into a 15 ml Falcon tube containing 2 ml ice-cold PBS + 0,1% BSA.
5. Centrifuge 300g 5 min in cold room, at +4° C
6. Aspirate off supernatant
7. Carefully resuspend pelleted organoids in the minute residual liquid.
8. Add ice-cold cryostore and gently pipette up and down a few times. 1 ml cryostore per 3 wells (=3 wells / cryotube)
9. Portion 1 ml each of the resuspended organoid solution into labelled cryotubes.
10. Place in Mr Frosty box over night at -80 ° C.

11. Move to LN2 tank for long-term storage and register in the cryostorage inventory list.

Protokoll 4. RNA purification from tissue

Modifierat protokoll från NucleoSpin® RNA (Bioanalysis Macherey Nagel kit, nov 2023 rev 22. p18). Vävnad från respektive individ har varit bevarad i RNA later, fryst i -80 °C. Steril skalpell och pincett används för att mäta upp rätt mängd vävnad. Vävnaden placeras i ett Eppendorf-rör och mortlas sedan i Buffert enligt protokoll nedan.

Efter varje RNA-rening kontrolleras önskvärd koncentration i Nano-drop. Resultat från Nano-drop jämförs sedan med resultat från Tape station som genomförs när all RNA är renad.

Material:

NucleoSpin® RNA kit

Mortel som passar Eppendorf-rör (för steg 2)

Eppendorf-rör

Märkpenna

1. Homogenize sample. Disrupt 15-30 mg of tissue.
2. Add 350 μ L Buffer RA1 and 3,5 μ L 3.5 μ L DTT. Lyse cells mechanically.
3. Filtrate the lysate through NucleoSpin® Filter (violet ring), place in a Collection Tube (2 mL), apply the mixture, and centrifuge for 1 min at 11,000 x g.
4. Discard the NucleoSpin® Filter and add 350 μ L ethanol (70 %) to the homogenized lysate and mix by pipetting up and down (5 times).
5. For each preparation take one NucleoSpin® RNA Column (light blue ring) placed in a Collection Tube. Pipette lysate up and down 2–3 times and load the lysate to the column. Centrifuge for 30 s at 11,000 x g. Place the column in a new Collection Tube (2 mL).
6. Add 350 μ L MDB (Membrane Desalting Buffer) and centrifuge at 11,000 x g for 1 min to dry the membrane.
7. Prepare DNase reaction mixture in a sterile 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided): For each isolation, add 10 μ L reconstituted rDNase (also see section 3) to 90 μ L Reaction Buffer for rDNase. Mix by flicking the tube. Apply 95 μ L DNase reaction mixture directly onto the center of the silica membrane of the column. Incubate at room temperature for 15 min.
8. 1st wash: Add 200 μ L Buffer RAW2 to the NucleoSpin® RNA Column. Centrifuge for 30 s at 11,000 x g. Place the column into a new Collection Tube (2 mL).

- 2nd wash: Add 600 µL Buffer RA3 to the NucleoSpin® RNA Column. Centrifuge for 30 s at 11,000 x g. Discard flowthrough and place the column back into the Collection Tube.
- 3rd wash: Add 250 µL Buffer RA3 to the NucleoSpin® RNA Column. Centrifuge for 2 min at 11,000 x g to dry the membrane completely. Place the column into a nuclease-free Collection Tube (1.5 mL, supplied).
9. Elute the RNA in 60 µL RNase-free H₂O, (supplied) and centrifuge at 11,000 x g for 1 min. If higher RNA concentrations are desired, elution can be done with 40 µL. Overall yield, however, will decrease when using smaller volumes.

Protokoll 5. RNA extraktion caecum organoider

En platta av kultiverade organoider av caecum poolades i ett rör. Matrigel upplöstes med PBS och BSA. Kit för RNA-rening NucleoSpin® RNA Plus XS Protocol (MachereyNagel, 08/2017, rev 01. p.14).

Day 1

Pellet organoids in 15 mL tubes from one plate. Leave minimal cell media. Froze 15 mL tubes in -80 °C.

Day 2 (48 h)

Thaw pellet and centrifuge 400 g for 15 min. Carried out RNA extraction according to instructions in the kit (NucleoSpin® RNA Plus XS Protocol).

1. Mix pellet with 100 µL LB1. Transfer to Eppendorf tube and vortex vigorously. Add 100 µL LB2.
2. Place a NucleoSpin® gDNA Removal Column XS (yellow ring) in a Collection Tube (2 mL, provided), transfer the homogenized lysate (~200 µL) to the column, and centrifuge for 2 min at 50 x g followed by 10 s at 11,000 x g. Discard the column and continue with the flow-through.
3. Add 150 µL Binding Solution BSXS (1.5 volumes relative to LB1) to the flow-through and mix well by moderate vortexing or by pipetting up and down several times.
4. Transfer the whole lysate (~350 µL) to the NucleoSpin® RNA Plus XS Column (light blue ring) preassembled with a Collection Tube. Centrifuge for 1 min at 300 x g followed by 10 s at 11,000 x g.
5. 1st wash: Add 100 µL Wash Buffer MDB onto the column. Centrifuge for 10 s at 11,000 x g. Discard the flow-through with collection tube and place the column into a new 2 mL Collection Tube (provided).
2nd wash: Add 500 µL Buffer WB2 onto the column. Centrifuge for 10 s at 11,000 x g.

3rd wash: Add 200 µL Buffer WB2 onto the column. Centrifuge for 2 min at full speed (<20,000 x g) to dry the membrane. Place the column into a collection tube (1.5 mL, provided).

6. Add 15 µL RNase-free H₂O and centrifuge 1 min at 11,000 x g

Protokoll 6. DNase behandling

När önskvärd koncentration av RNA är renad utförd först en DNase-behandling (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade, Invitrogen, Rev.: 012802) innan tillverkning av cDNA-biblioteket för att vara säker på att allt genomiskt DNA (gDNA) är borta, då det stör och kontaminerar qPCR analysen.

Protokoll DNase-behandling för n=9 prover: (1,2 µg RNA per prov)

DNase reaction mix (for number of samples + one extra) = 10x DNase I reaction buffer (12 µl) + DNase 1U/µl (12 µl)

EDTA (2 mM) (for number of samples + one extra) = 12 µl

1. Label tubes and mark them +RT and -RT.
2. Prepare DNase mix:
3. Prepare tube with EDTA:
4. Add appropriate volume of H₂O to +RT, so that the final reaction volume is 12 µl.
5. Add 2,4 µl of DNase reaction mix to each tube. Incubate at room temp for 15 min.
6. Add 1.2 µg RNA with tubes on ice.
7. Incubate in room temp for 15 min.
8. Inactivate DNase by adding 1,2 µl of EDTA to each tube.
9. Heat for 10 min at 65 °C.

Protokoll 7. Syntes av cDNA-bibliotek

För tillverkning av cDNA-bibliotek utgår från modifierat protokoll SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Rev. date: 7 Dec 2004). Kontroller är utan Reverse Transskriptas (-RT).

RNA + H₂O för varje prov enl tabell 1.

Mix 1 (for number of samples + one extra) has been scaled up to 1.1. For n=5 samples: mix olido (dT) 9,24 µl + random primers 9,24 µl + dNTP mix 9,24 µl. +RT mix (n=5): mix 5X First strand buffer 29,40 µl + 0,1M DTT 7,35 µl + SuperScript™ III RT 7,35 µl.

-RT mix (n=5): mix 5X First strand buffer 7,38 µl + 0,1M DTT 1,84 µl + H₂O 1,84 µl.

1. Prepare Mix 1, +RT mix and -RT mix.
2. Add 3,96 ul of Mix 1 to each +RT tube.
3. Spin down quickly.
4. Incubate at 65 °C for 5 min
5. Incubate at 1 min on ice
6. Add 1,58 ul -RT mix to each -RT tube.
7. Add 3,43 ul From each +RT tube to each -RT tube.
8. Add 6,3 ul of +RT mix into each +RT tube.
9. Gently pipette up and down and spin down quickly.
10. Run the following: 25 °C for 5 min, 50 °C for 30-60 min, 70 °C for 15 min
11. Add 100,32 ul nuclease free H2O for 1:5 dilution.

Protokoll 8. RT- qPCR

qPCR kit som används är QuantiTect® SYBR® Green PCR kit. QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix innehåller HotStarTaq® DNA Polymerase, QuantiTect SYBR Green PCR Buffer, dNTP mix, including dUTP, SYBR Green I, ROXTM passive reference dye and 5 mM MgCl₂. RNase-Free Water tillkommer i kitet.

RT-qPCR genomförs med cDNA från 3 vävnadsprover (Häst 1, Häst 2 och Häst 3) samt organoid cDNA. Primers och Annealing Temperature används enligt tabell 1 i metoddelen.

Reaktion volym per brunn 25 µl, varav 2 µl cDNA. qPCR 40 cyklar enligt temperaturer: 95 °C i 15 min, 95 °C i 15 s, *Annealing temp* i 30 min, 72 °C i 30 min. Annealing temperatur listas i tabell 1 i metod.

Tabell 8. qPCR reaktion setup in general. Volume varies due to primer concentration in tabell 1 i resultat.

Component	Volume/reaction	Final concentration
QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 µl	1x
Primer A	Variable	0.5 µM
Primer B	Variable	0.5 µM
Template DNA or cDNA	Variable	1 µg/reaction
RNase-free water	Variable	
Optional: Uracil-N-glycosylase	Variable	0.5 units/reaction
Total reaction volume	25 µl	25 µl

Protokoll 9. Gelelektrofores

- 2 % agarosgel löses i TBE 0,5 M
- Tillsätt 6 µl Gelred
- Ladda stege 100 bp 3 µl
- Ca 10 µl PCR produkt och 2 µl loadingbuffert i varje brunn

- 100 V 40 min
- Framkallas på geldoc

Protokoll 10. Preparering av organoider inför färgning.

Modifierat protokoll (Hellman 2021, in house).

1. Remove the overlay medium and add 1mL 10% Formalin. Incubate for 45 min in room temp.
2. Pipette up and down to detach the Matrigel and organoids. Transfer to a 50 mL tube.
3. Pellet the fixated organoids by centrifugation at 1300 rpm for 5 min.
4. Meanwhile, prepare 2% agarose (with low gelling temperature). Keep in a warm bath until use.
5. Suspend the organoids in 2 mL agarose and immediately centrifuge at 1000 rpm for 3 min, room temperature.
6. Cool on ice or leave in fridge for 24 h. Invert the tube to remove the gel (pincette or scalpels may be used if stuck. The organoids should optimally be located in the tip of the gel.
7. Embed the tip of the gel in paraffin (is done in Pathology-lab).

Fixering och snittning av vävnadsprover och organoider i paraffin görs på Patologi-lab av kunnig personal.

Protokoll 11. HE-färgning

Färgning med HE (Hematoxylin-Eosin) genomförs enl protokoll från Patologi-lab, BVF, SLU, in house (genomförs av Albin Norman) Protokoll utgivet 2018, reviderat 2022.

Lösningar och kemikalier

Mayer's hematoxylin (köps färdig)

Eosin Y 0,2 % (köps färdig, tillsatt 1 mL HAc/ca 200 mL)

Utförande

Inkubera glasen i 60 C värmeskåp, 40 minuter

Avparaffinering/Rehydrering:

Xylen I, 15 minuter

Xylen II, 15 minuter

ABS I, 5 minuter

ABS II, 5 minuter

95 % alk., 5 minuter

70 % alk., 5 minuter

Skölj i rinnande kranvatten, 5 minuter
Mayer's hematoxylin, 5 minuter
Skölj i rinnande kranvatten, 20 minuter
Eosin, 30-60 sek
Dehydrering: 95 % alk., blaska snabbt
95 % alk., blaska snabbt
ABS I, 2 minuter
ABS II, 2 minuter
ABS III, 5 minuter
Xylen I, blaska
Xylen II, blaska
Xylen III, 2+ minuter
Montering av täckglas med pertex
Resultat
Kärnor – blå
Bindväv, erythrocyter, cytoplasma – röd/rosa/orange

Protokoll 12. PAS-färgning

Färgning med PAS (ABPAS – Alcian Blue - Periodic Acid Schiff) genomförs enl protokoll från Patologi-lab, BVF, SLU, in house (genomförs av Albin Norman)
Protokoll utgivet 2024.

Lösningar och kemikalier

Mayers hematoxylin (köps färdig)
0,5 % Perjodsyra (blandas, färsk, 0,5g/100ml avjoniserat vatten)
Schiffs reagens (köps färdig, förvaras kyld och ljusskyddad, återanvänds)
Alcian Blue pH 2,5 (köps färdig)

Utförande

Inkubera glasen i 60 C värmeskåp, 40 minuter
Rehydrering: Xylen I, 15 minuter
Xylen II, 15 minuter
ABS I, 5 minuter
ABS II, 5 minuter
95 % alk., 5 minuter
70 % alk., 5 minuter
Avjoniserat vatten
Alcian Blue, 20 minuter
Skölj i avjoniserat vatten
0,5 % Perjodsyra, 5 minuter

Skölj noga i avjoniserat vatten
Schiffs reagens, 20 minuter
Skölj i rinnande kranvatten, 10-15 minuter
Mayers hematoxylin, 1 minut
Skölj i rinnande kranvatten, 15 minuter
Dehydrering: 95 % alk., blaska snabbt
95 % alk., blaska snabbt
ABS I, 2 minuter
ABS II, 2 minuter
ABS III, 5 minuter
Xylen I, blaska
Xylen II, blaska
Xylen III, 2+ minuter
Montering av täckglas med pertex
Resultat
Glykogen, glykoprotein, proteoglykaner – magenta
Sura muciner – ljus blå
Neutrala muciner – magenta
Blandning av neutrala och sura muciner – mörkblå/lila
Kärnor – mörkblå/violetta

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Du hittar en länk till SLU:s publiceringsavtal på den här sidan:

- <https://libanswers.slu.se/sv/faq/228316>

☒ JA, jag ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

☐ NEJ, jag ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.