



PETRA ROPRET

**BARIERNA FUNKCIJA IN OBNOVA UROTELIJA SEČNEGA
MEHURJA PODGAN PO DELOVANJU POLI-L-LIZINA V *EX VIVO*
POGOJIH**

MAGISTRSKA NALOGA

**BARRIER FUNCTION AND REGENERATION OF RAT URINARY
BLADDER UROTHELIUM AFTER TREATMENT WITH POLY-L-
LYSINE UNDER *EX VIVO* CONDITIONS**

MASTER'S THESIS

Ljubljana 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Kerec Kos in somentorstvom doc. dr. Andreje Erman. Mikroskopsko analizo sem opravila na Inštitutu za biologijo celice na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani.

Zahvala

Za strokovno pomoč, nasvete in spodbudne besede se iskreno zahvaljujem obema mentoricama.

Posebna zahvala gre moji družini, fantu in prijateljem, ki so mi tekom študija ves čas stali ob strani, me spodbujali in verjeli vame.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Kerec Kos in somentorstvom doc. dr. Andreje Erman.

Petra Ropret

Ljubljana, 2016

Vsebina

1.	UVOD.....	1
1.1.	Zgradba in naloga sečnega mehurja.....	1
1.2.	Urotelij.....	2
1.3.	Prepustnost urotelija	4
1.4.	Luščenje in obnova urotelija.....	5
1.4.1.	Povzročitelji luščenja urotelija	6
1.4.2.	Obnova urotelija	7
1.5.	Poli-L-lizin.....	8
2.	NAMEN DELA.....	14
3.	MATERIALI IN METODE.....	15
3.1.	Materiali.....	15
3.1.1.	Raztopine.....	17
3.1.2.	Tkivo.....	18
3.2.	Metode	19
3.2.1.	Merjenje TEU	19
3.2.2.	Morfološka analiza tkiva	23
4.	REZULTATI.....	25
4.1.	Rezultati meritev TEU stene sečnega mehurja podgan v pogojih <i>ex vivo</i>	25
4.1.1.	Kontrolni poskusi	25
4.1.2.	Poskusi s PLL	28
4.1.3.	Primerjava rezultatov poskusov s PLL.....	38
4.2.	Rezultati elektronsko mikroskopske analize urotelija podgan v pogojih <i>ex vivo</i> .	41
4.2.1.	Časovna točka T1	41
4.2.2.	Časovna točka T2	42
4.2.3.	Časovna točka T3	47
5.	RAZPRAVA.....	52
6.	SKLEP.....	61
7.	LITERATURA.....	62

Povzetek

Urotelij sečnega mehurja zaradi svoje edinstvene zgradbe predstavlja krvno-urinsko bariero, ki je najbolj neprepustna bariera v telesu sesalcev. Zdravljenje nekaterih bolezni sečnega mehurja, kot sta npr. bakterijski cistitis in površinski rak sečnega mehurja, vključuje tudi pomožno terapijo z intravezikalno dostavo luščilnih sredstev, kot sta npr. targesin in mitomicin C. Na živalskih modelih in raziskavah v pogojih *ex vivo* se je za učinkovito luščilno sredstvo izkazal tudi hitosan.

Z našo raziskavo smo želeli dokazati, da je poli-L-lizin zaradi svojih polikationskih lastnosti potencialno luščilno sredstvo za urotelij. Pri tem smo želeli ugotoviti, katera molekulska masa, koncentracija in čas delovanja poli-L-lizina so potrebni za njegovo optimalno delovanje, ki vključuje tako učinkovito luščenje površinskih celic urotelija kot tudi uspešno obnovo tkiva po poškodbi. V pogojih *ex vivo* smo merili transepitelijsko električno upornost stene sečnih mehurjev podgan v dvoprostorskih difuzijskih celicah. Poškodbe in obnovo urotelija smo morfološko ovrednotili z elektronsko mikroskopsko analizo.

Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da poli-L-lizin pri vseh preizkušanih spremenljivkah (molekulska masa, koncentracija in čas delovanja) poveča prepustnost stene sečnega mehurja podgan v pogojih *ex vivo*, kar je posledica prekinjanja medceličnih stikov med urotelijskimi celicami in zato luščilnega delovanja na urotelij sečnega mehurja. Po delovanju poli-L-lizina z molekulsko maso 30-70 kDa ali 70-150 kDa nismo ugotovili razlik v povečani prepustnosti tkiva, prav tako ni bilo razlik med 15- oz. 30- minutnim delovanjem poli-L-lizina na tkivo. Vpliv poli-L-lizina na barierno funkcijo urotelija pa je dokazano odvisen od koncentracije in sicer je 0,01% poli-L-lizin bolj povečal prepustnost stene sečnega mehurja in povzročil obsežnejše luščenje urotelija kot 0,001% poli-L-lizin. Do obnove urotelija v pogojih *ex vivo* je prišlo v vseh poskusih, saj smo zasledili znake povečane proliferacije in napredujoče diferenciacije urotelijskih celic. Po delovanju 0,01% poli-L-lizina je bila obnova urotelija ob koncu obdobja regeneracije na nižji stopnji kot pri 0,001% koncentraciji poli-L-lizina. Dokazali smo, da je 0,01% poli-L-lizin z molekulsko maso 30-70 kDa učinkovito in varno luščilno sredstvo za urotelij, ki v 15-minutnem delovanju homogeno odlušči površinske celice, čemur sledi hitra obnova strukture in barierne funkcije urotelija.

Ključne besede: urotelij, luščenje, transepitelijska električna upornost, poli-L-lizin

Abstract

Urothelium due to its unique structure represents a blood-urinary barrier, which is the most impervious barrier in the body of mammals. Treatment of certain bladder diseases such as bacterial cystitis and superficial bladder cancer, also includes a secondary treatment with intravesical delivery of substances that induce urothelial exfoliation, for example targesin and mitomycin C. Additionally, in animal models and *ex vivo* experiments chitosan was successfully used as an exfoliation inducer.

The aim of our study was to prove that poly-L-lysine due to its polycationic properties can be potentially used as an exfoliation inducer of urothelium and to determine the molecular weight, concentration and time of treatment with poly-L-lysine for optimal exfoliation of the urothelium, followed by the efficient regeneration. In *ex vivo* conditions we measured transepithelium electrical resistance of the rat urinary bladder wall in side-by-side diffusion chambers. The damage and regeneration of urothelium was then further evaluated morphologically by electron microscopic analysis.

Based on our results, at all tested variables (molecular weight, concentrations and the time treatment) poly-L-lysine increased the permeability of the urinary bladder wall under the *ex vivo* conditions as a result of disrupting the tight junction between the urothelial cells and therefore causing exfoliation of urothelium. We did not observe any difference in permeability of the bladder wall after treatment of the tissue with poly-L-lysine with molecular weight 30-70 kDa or 70-150 kDa. There was also no difference between 15- and 30-minute treatment with poly-L-lysine. However, the concentration of poly-L-lysine effects its influence on the urothelial barrier function. Namely, 0.01% poly-L-lysine increased the permeability of the urinary bladder wall to a larger extent and caused more extensive exfoliation of the urothelium than 0.001% poly-L-lysine. Under *ex vivo* conditions regeneration of the urothelium occurred in all the experiments as we observed signs of increased proliferation and progressive differentiation in urothelial cells. However, after the treatment with 0.01% poly-L-lysine regeneration of urothelium reached a lower level compared to 0.001% concentration. We can conclude that 0.01% poly-L-lysine with molecular weight of 30-70 kDa is an effective and safe exfoliation inducer of urothelium. Namely, after 15-minute treatment it causes homogeneous exfoliation of superficial urothelial cells, followed by a rapid regeneration of the urothelium structure and barrier function. **Key words:** urothelium, exfoliation, transepithelial electrical resistance, poly-L-lysine

Seznam okrajšav

A: absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja

KST: kratkostični tok

MM: molekulska masa

PBS: fosfatni pufer

PLA: poli-L-arginin

PLL: poli-L-lizin

POVP: povprečje relativnih TEU ob določenem času

R: relativna vrednost TEU stene sečnega mehurja (% TEU glede na $t = 30$ min (T1))

SD: standardni odklon relativnih TEU

SEM: vrstični elektronski mikroskop

T1: časovna točka 1

T2: časovna točka 2

T3: časovna točka 3

TEM: presewni elektronski mikroskop

TEP: transepitelijski potencial

TEU: transepitelijska električna upornost

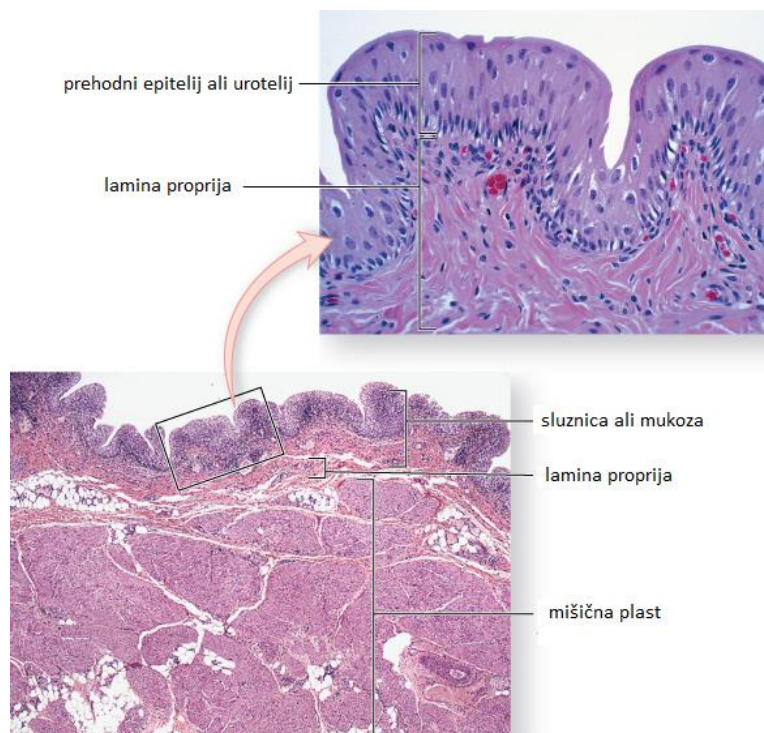
1. UVOD

1.1. Zgradba in naloga sečnega mehurja

Sečni mehur (*vesica urinaria*) je votel organ z debelo mišično steno. Njegova naloga je zbiranje urina (1). Osrednji del mehurja imenujemo telo (*corpus vesicae*) in zaseda večji del mehurja, zgornji del imenujemo vrh (*apex vesicae*) in spodnji del imenujemo svod (*fundus vesicae*), iz katerega izhaja sečnica. Sistem izvodil je poleg sečnega mehurja sestavljen še iz ledvičnega meha, sečevoda in sečnice (2, 3).

Stena sečnega mehurja je sestavljena iz treh plasti (slika 1):

- sluznice (*mukoze*), ki obdaja votlino sečnega mehurja in je sestavljena iz urotelija, ki ima značaj prehodnega epitelija ter lamine proprije (*lamina propria mucosae*), ki leži med bazalno lamino in mišično plastjo.
- mišične plasti (*muscularis propria*), ki jo tvorijo tri plasti gladkih mišičnih celic, ki potekajo v vseh smereh (krožno, vzdolžno in spiralno).
- adventicije, ki je sestavljena predvsem iz vezivnega tkiva (2, 3).



Slika 1: Prerez stene sečnega mehurja. Povzeto po (4).

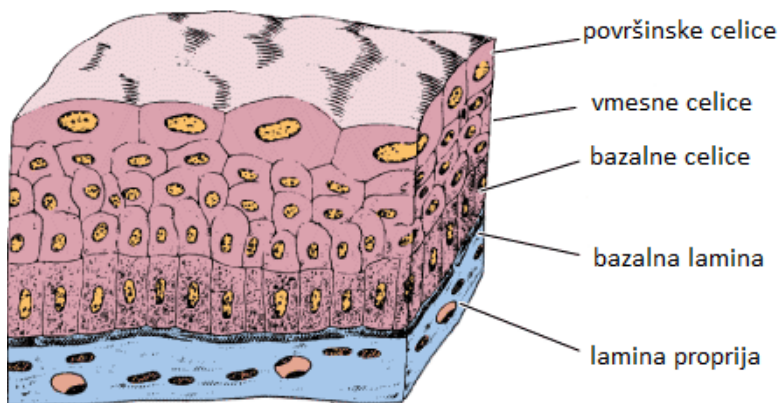
Oblika sečnega mehurja in sluznice je odvisna od polnosti organa. Prazen mehur leži pri ljudeh v medenici za sramnično zrastjo in ima debelo steno ter nagubano sluznico. Z urinom napolnjen mehur sega navzdol v spodnji del trebušne votline, stena sečnega mehurja se ob tem zravna, sluznica pa stanjša (2, 3). Urin, ki se zbira v mehurju, nastaja s filtracijo krvi v ledvicah in vsebuje odpadne produkte kot so sečnina, voda, presnovki, amonijeve ioni. V mehurju se urin shranjuje kratek čas in ohranja svojo sestavo, nato pa se skozi sečnico izloča iz organizma (1, 5).

1.2. Urotelij

Prehodni epitelij, imenovan urotelij, pokriva notranjo - lumensko površino sečnega mehurja, sečevoda, ledvičnih čašic in zgornjega dela sečnice ter je v neposrednem stiku z urinom.

Urotelij sestavljajo trije celični skladi, v vsakem od njih imajo celice drugačno strukturo in nalogo (slika 2):

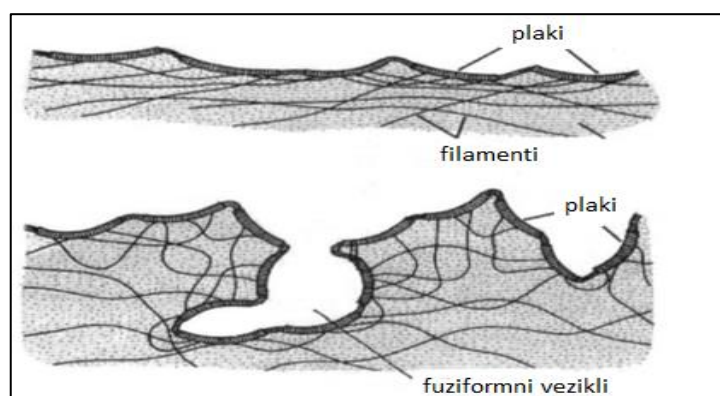
- Bazalne celice; so relativno majhne celice, kubične oblike, velike od 5 do 10 μm v premeru. Pritrjene so na bazalno lamino in so najmanj diferencirane od vseh celic v uroteliju.
- Vmesne ali intermediarne celice; nahajajo se nad bazalnimi celicami in so po velikosti večje, v premeru merijo do 20 μm . Po obliki so kubične ali visokoprizmatske in so na višji stopnji diferenciacije od bazalnih.
- Površinske ali dežnikaste celice; so visoko oz. končno diferencirane, velike celice večkotne oblike, ki v premer merijo od 50 – 120 μm , odvisno od polnosti mehurja (5, 7).



Slika 2: Zgradba urotelija. Povzeto po (4).

Prehajanje molekul med hipertoničnim urinom in tkivnimi tekočinami preprečuje krvno-urinska bariera, ki jo zagotavljajo specifično zgrajena apikalna membrana površinskih celic urotelija ter tesni stiki med njimi (5, 6). Naloga krvno urinske-pregrade je preprečiti prehajanje snovi iz urina v krvne kapilare, ki se nahajajo v lamini propriji, in hkrati preprečiti izgubljanje vode in ionov iz epitelija v hipertonični urin, kar je bistvenega pomena za normalno delovanje organizma in zagotavljanje presnovne homeostaze (7).

Transcelularno pot prehajanja molekul skozi urotelij preprečuje specifična apikalna membrana površinskih celic (6). Ta je sestavljena iz odebeljenih in neodebeljenih predelov. Odebeljena, toga področja so t.i. urotelijsko plaki, ki predstavljajo 70-90 % celotne apikalne površine dežnikastih celic. Plaki v apikalni membrani merijo v premeru približno 0,5 μm , debeli so 12 nm. Med plaki so t.i. medplakni predeli z neodebeljeno membrano debeline 8-10 nm. Tako zgradba apikalne membrane daje lumenski površini sečnega mehurja značilno školjkasto nazobčan izgled in omogoči gubanje in raztezanje membrane med ponavljajočim se krčenjem in raztezanjem epitelija in sečnega mehurja (7).



Slika 3: Prikaz lumenske površine urotelija v polnem (zgoraj) in praznem (spodaj) sečnem mehurju. Povzeto po (8).

Plaki so zgrajeni iz specifično urejenih transmembranskih proteinov imenovanih uroplakini, katerih sinteza poteka v Golgijevem aparatu. Iz Golgijevega aparata uroplaki potujejo proti površini celice v specifični obliki fuziformnih veziklov, katerih naloga je povečanje površine urotelija ob raztezanju sečnega mehurja. Polnjenje mehurja sproži najprej raztezanje apikalne membrane in preurejanje citoskeletnih filamentov. Pri tem se sploščijo površinske celice, apikalna membrana se raztegne, nadaljnje polnjenje mehurja pa povzroči raztezanje filamentov, ki so pritrjeni na medcelične stike. Ti filamentni potegnejo fuziformne vezikle v apikalno membrano in tako povečajo njeno površino (slika 3) (5, 6, 7).

Površinske celice urotelija imajo na svoji apikalni površini dobro razvit glikokaliks, ki ga predstavljajo glikolipidi in glikoproteini v apikalni membrani. Ogljikovi hidrati v membrani so različni oligosaharidi in glikozaminoglikani, ki sodijo v skupino polisaharidov in imajo zaradi velikega števila sulfatnih skupin na površini visok negativni naboj. Glikozaminoglikani tvorijo skupaj z molekulami vode na površini celic sluz, ki pomembno vpliva na prepustnost in bioadhezivne lastnosti urotelija. Na negativno nabito površino se vežejo pozitivno nabite molekule, kar je lahko eden od razlogov za bioadhezijo snovi (polimerov) na sluznico. Pri bioadheziji imajo lahko poleg ionskih vezi pomembno vlogo še kovalentne in vodikove vezi ter hidrofobne in Van der Waalsove interakcije (5, 6, 7, 9).

1.3. Prepustnost urotelija

Paracelularni prehod ali prehod molekul po medceličnih prostorih je v uroteliju močno omejen s tesnimi stiki med površinskimi celicami. Tesni stiki povezujejo lateralne plazmaleme sosednjih površinskih celic, sestavljeni pa so iz mreže citosolnih in transmembranskih proteinov ter elementov citoskeleta (10, 11). Prehod snovi, ki običajno prehajajo človeške membrane, kot so npr. voda, sečnina, amonijevi ioni, je skozi urotelij onemogočen (6).

Zelo občutljiva metoda za ugotavljanje prepustnosti epitelija je merjenje transepitelijske električne upornosti (TEU), ki je definirana kot upornost tkiva za prehajanje elektrolitov in je obratno sorazmerna permeabilnosti epitelija za ione (5). Krvno-urinska pregrada je najbolj tesna in neprepustna pregrada v telesu. Njene vrednosti TEU so veliko večje od vrednosti ostalih krvno-tkivnih pregrad, saj znaša upornost urotelija med $10000 \Omega\text{cm}^2$ in $75000 \Omega\text{cm}^2$. Če je TEU večja od $500 \Omega\text{cm}^2$, govorimo o tesnih epitelijih. Ta izjemno velika vrednost TEU urotelija je rezultat visoke transcelularne upornosti apikalne plazmaleme v kombinaciji z visoko paracelularno upornostjo tesnih stikov med površinskimi celicami. Krvno-možganska pregrada, ki ščiti možgane pred molekulami, ki se prenašajo po krvi, ima vrednost TEU med $1000 \Omega\text{cm}^2$ in $2000 \Omega\text{cm}^2$. Vrednosti TEU epidermalnih in črevesnih epitelijev nihajo med $100 \Omega\text{cm}^2$ in $400 \Omega\text{cm}^2$ in sodijo v skupino prepustnih epitelijev, o katerih govorimo, če so vrednosti TEU pod $500 \Omega\text{cm}^2$ (5, 6).

Leta 1951 je danski znanstvenik Hans H. Ussing izumil napravo, ki se imenuje Ussingova difuzijska celica in jo uporabil za preučevanje aktivnega transporta ionov skozi izolirano

žabjo kožo. Od takrat se metoda uporablja za različne namene ugotavljanja integritete in prepustnosti različnih celičnih plasti. Ussingove difuzijske celice so fiziološko odvisni sistemi za merjenje transporta ionov, spojin in zdravilnih učinkovin skozi različna epiteljska tkiva. Difuzijske celice se uporabljajo za različna izolirana živalska tkiva ter celične kulture. Na področju farmacije so te celice uporabne za ugotavljanje prehajanja zdravilnih učinkovin, predvsem skozi epitelij prebavnega trakta. George M. Grass in Stephanie A. Sweetana sta optimizirala Ussingovo difuzijsko celico in jo uporabila za proučevanje difuzije zdravilnih učinkovin skozi vpeto tkivo. Lahko jo uporabljamo tudi za spremljanje elektrofizioloških parametrov, kot je npr. transepiteljski potencial (TEP), ki nam da podatek o tem, ali je tkivo živo in pa kratkostični tok (KST), ki nam pove količino naboja ionov, ki so se v določenem času aktivno prenesli skozi tkivo (12-15).

1.4. Luščenje in obnova urotelija

Za vzdrževanje normalne tkivne homeostaze je potrebno ravnotežje med proliferacijo celic, ki je proces povečevanja števila celic in med procesi, ki število celic zmanjšujejo (apoptoza, nekroza) (16). V tkivu je nastajanje novih celic uravnoreženo z odmiranjem visoko diferenciranih starih celic, ki so bodisi poškodovane ali v prebitku. Odstranjevanje celic na splošno delimo na dva osnovna načina propadanja celic, nekrozo in apoptozo (17). Nekroza je patološki proces, ki vodi v celično smrt in je posledica poškodbe celic in ne genetsko vodene razgradnje celic. Pri nekrozi običajno pride do poškodbe in popolne prepustnosti celične membrane, zaradi česar se iz celice sprosti vsebina citosola in celičnih organelov. Ob sprostitvi vsebine celice lahko encimi poškodujejo tudi sosednje celice, zato nekroza navadno obsega večje število celic, ob tem pa se sproži vnetni odziv tkiva (18). Apoptoza je programirana, genetsko vodena celična smrt, ki se sproži iz notranjosti celice ali celične površine (16-19).

Urotelij je zelo odporno in stabilno tkivo z nizko proliferacijsko aktivnostjo. Posledično je samoobnova urotelija počasna, vendar pa se lahko hitro zelo poveča kot odgovor na različne notranje in zunanje stresne dejavnike. Dejavniki, ki povzročijo intenzivno luščenje urotelija, so daljša izpostavitve obsevanju, vročina, hormoni, endotoksini in bakterije. Proti bakterijski infekciji se npr. organizem odzove s povečanim luščenjem urotelijskih celic, ker se na ta način bakterije izločijo iz sečnega mehurja skupaj z odluščenimi celicami, na katere so se pritrdile. Pri luščenju urotelija pride do prekinitve medceličnih stikov med

urotelijskimi celicami in posledično do luščenja celic v notranjost sečnega mehurja. Urotelijske celice, ki se odluščijo v lumen mehurja, so večinoma žive, imajo nespremenjeno strukturo in ne kažejo znakov celične smrti. Zaradi hipertoničnega urina kasneje pride do litičnih sprememb in nekroze odluščenih celic, ki se skupaj z urinom izločijo iz telesa (10, 20).

1.4.1. Povzročitelji luščenja urotelija

Inducirano luščenje urotelija se je izkazalo za uspešno terapijo pri zdravljenju bakterijskega cistitisa in površinskega raka sečnega mehurja. Bakterijski cistitis je pogosta infekcija, ki jo najpogosteje povzroča uropatogena bakterija *Escherichia coli*. Bakterije se ob vstopu v sečni mehur najprej pritrdijo na apikalno plazmalemo površinskih urotelijskih celic, nato pa skozi membrano vstopijo v notranjost celic. V citosolu se pričnejo deliti in tvorijo skupke bakterijskih celic, iz katerih se lahko pozneje odcepijo posamezne bakterije, ki izstopijo iz celic in prehajajo v svetlino mehurja, se pritrdijo na druge površinske celice in tako širijo okužbo. Ob ponavljajočem bakterijskem cistitisu se v klinični praksi uporablja intravezikalna aplikacija Targesina. Targesin je srebrova koloidna raztopina, ki deluje kot luščilno sredstvo za urotelij. Zaradi odluščenja okuženih urotelijskih celic z bakterijami se ob sočasni uporabi antibiotikov verjetnost ponovne okužbe sečil zmanjša (21).

Površinski rak sečnega mehurja prizadene sluznico sečnega mehurja in sega najbolj globoko do lamine proprije. Če površinskega raka sečnega mehurja ne zdravimo, se lahko razširi v mišično plast in pride do mišično-invazivnega raka sečnega mehurja, ki lahko tudi metastazira. V izogib temu se v klinični praksi uporablja za luščenje urotelijskih celic mitomicin C, ki je najpogosteje uporabljen citostatik v terapiji površinskega raka sečnega mehurja. Mitomicin C ima citostatično delovanje, ki temelji na kovalentni vezavi na DNA, kar vodi v apoptozo celic. Urologi ga aplicirajo s katetrom neposredno v sečni mehur po predhodni odstranitvi rakavega tkiva s kirurškim posegom (22, 23).

Na živalskih modelih pa se je za uspešno luščilno sredstvo izkazal hitosan (10, 21). Hitosan je kationski polisaharid, sestavljen iz monomernih enot glukozamina in *N*-acetilglukozamina. Je nizko toksičen, biorazgradljiv polimer, ki izkazuje različne biološko aktivne lastnosti, kot npr. protimikrobno in protitumorsko delovanje, je tudi pospeševalec absorpcije in bioadhezivno sredstvo. Hitosan ima veliko molekulsko maso in je zelo

viskozen, topen je le v kislih vodnih medijih, kjer lahko protonirane amino skupine interagirajo z negativno nabitimi molekulami oziroma v organizmu z negativno nabito površino različnih tkiv, tudi s površino urotelija. Luščilni učinek hitosana je v veliki meri odvisen od koncentracije disperzije in časa izpostavljenosti tkiva. Na živalskem modelu *ex vivo* je bilo optimalno luščilno delovanje hitosana na urotelij določeno pri 30-minutnem tretiranju tkiva z 0,05% disperzijo. V teh pogojih je bilo luščenje urotelija homogeno po celotni površini, obnova tkiva pa je bila hitra. Pri krajšem času izpostavitve (15 min) je bilo luščenje urotelija zelo točkovno in nehomogeno. Daljši čas tretiranja tkiva s hitosanom (60 min) je povzročil luščenje celic v globino urotelija, odluščile so se tudi vmesne celice, zaradi tega je v času regeneracije prišlo do aktivne proliferacije tkiva in posledično do hiperplazije. Večje koncentracije disperzije hitosana (0,5%) so povzročale nekrozo urotelijskih celic, luščenje je bilo točkovno in v globino tkiva (24, 25).

1.4.2. Obnova urotelija

Obnavljanje urotelija je v fizioloških razmerah kompleksen in dolgotrajen proces, ki obsega intenzivno proliferacijo in diferenciacijo bazalnih celic v vmesne in teh v površinske celice. V času normalne diferenciacije urotelija mora biti osnovna funkcija tkiva nemotena, ne glede na ciklično spreminjanje volumna urina v mehurju. Normalna diferenciacija celic je zelo dolg proces in traja npr. pri glodavcih od 6 mesecev do 1 leta. Večina postopkov, ki uspešno inducirajo luščenje urotelija, lahko privede do vnetnega odgovora, podaljšanega luščenja in hiperplazije ter celo do nekroze tkiva. Po poškodbah oz. po izpostavitvi stresnim dejavnikom se tkivo obnovi že v nekaj dneh, krvno-urinska pregrada pa že v nekaj urah (10, 20, 26).

Pri obnovi urotelija potekata procesa celične proliferacije in diferenciacije. Celice lahko glede na proliferacijsko aktivnost delimo na statične, pogojno obnovljive in stalno obnavljajoče. Nevroni centralnega živčnega sistema nimajo proliferacijske aktivnosti in so statični, ker se v odraslem organizmu ne delijo. Krvne celice, celice črevesnega in kožnega epitelijskega tkiva se nenehno obnavljajo in imajo visoko proliferacijsko aktivnost skozi celotno življenje organizma. Med pogojno obnovljive pa sodijo jetrne, ledvične celice in celice urotelija, ki imajo v normalnih pogojih nizko proliferacijsko aktivnost, ob poškodbi tkiva pa se ta lahko zelo poveča in je obnova tkiva hitra in intenzivna (27, 28). V fizioloških pogojih je urotelij sečnega mehurja zelo stabilno tkivo z nizko proliferacijsko aktivnostjo. V primeru poškodbe tkiva ali namerno povzročenem luščenju urotelija se proliferacijska

aktivnost poveča, s tem pa se spodbudi tudi diferenciacija urotelijskih celic in posledično se tkivo hitro obnovi (27). Obnovitvena sposobnost urotelija je odvisna od številnih rastnih faktorjev in njihovih receptorjev kot so npr. epidermalni rastni faktor, transformirajoči rastni faktor, inzulinu podoben rastni faktor, fibroblastni rastni faktor in drugi (29).

Diferenciacija urotelija poteka vertikalno, od bazalnih celic, ki so na najnižji stopnji diferenciacije, preko vmesnih celic do površinskih, ki so visoko diferencirane (29). Bazalne celice ležijo na bazalni lamini in so nanjo pritrjene s hemidesmosomi. Celice imajo močno bazofilno citoplazmo, v kateri najdemo številne ribosome in slabo razvit endoplazemski retikulum. Apikalna plazmalema ni značilno asimetrično odebeljena kot pri visoko diferenciranih površinskih celicah, tudi fuziformnih veziklov v bazalnih celicah ni. Številne bazalne celice se mitotsko delijo. Vmesne celice so večje od bazalnih in tudi bolj diferencirane. Na površini celic je videti razvojne faze značilnih odebeljenih področij s plaki, pod apikalno plazmalemo pa že lahko opazimo nekaj fuziformnih veziklov, kar pomeni, da so vmesne celice predstopnja končno diferenciranih površinskih celic. Slednje so velike in ploščate in pokrivajo številne vmesne celice pod seboj. So visoko diferencirane in specializirane celice z enim ali dvema jedrom in številnimi fuziformnimi vezikli v citoplazmi. Površinske celice imajo dobro razvit Golgijev aparat. Apikalna plazmalema končno diferenciranih površinskih celic ima značilno oblikovane mikrogrebene in plake, ki dajejo celicam nazobčan oz. naguban školjkast videz (27, 30).

Preoblikovanje apikalne plazmaleme med diferenciacijo urotelijskih celic poteka v štirih stopnjah:

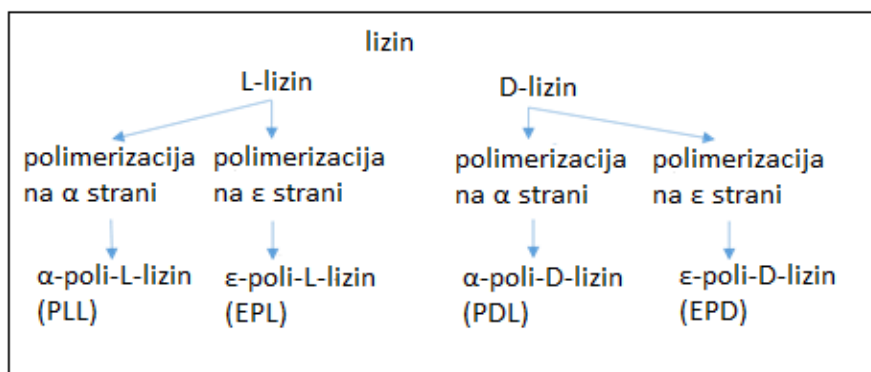
1. Površina z mikrovili
2. Površina z nesklenjenimi vrvičastimi grebeni
3. Površina s sklenjenimi vrvičastimi grebeni
4. Površina s školjkastimi mikrogrebeni s plaki

Z mikroskopsko analizo urotelijskih celic lahko z ugotavljanjem razvojne stopnje apikalne plazmaleme ugotavljamo stopnjo diferenciacije celic in celotnega urotelija ter s tem tudi stopnjo obnove urotelija po poškodbi (27).

1.5. Poli-L-lizin

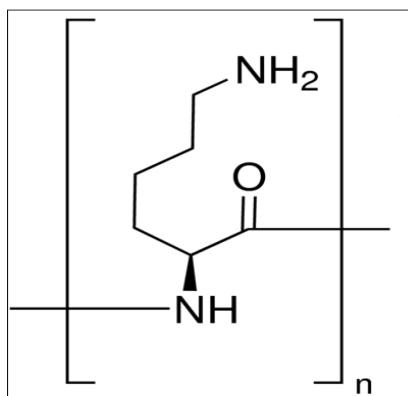
Poliaminokislina so pomembna vrsta biorazgradljivih polimerov in sodijo v manjšo skupino poliamidov, ki so sestavljeni iz več molekul ene aminokislina, katere so med seboj

povezane s peptidno vezjo. Polilizin je sestavljen iz molekul aminokisline lizin, ki ima dve amino skupini, eno na α -ogljiku in drugo na ϵ -ogljiku. Obe sta lahko tarči polimerizacije, kar pomeni, da lahko dobimo α -polilizin ali ϵ -polilizin. Omenjeni obliki se delita še po kiralnosti na L- oz. D- optična izomera (slika 4) (31, 32).



Slika 4: Shematski prikaz derivatov polilizina. Povzeto po (33).

Poli-L-lizin (PLL) je sintezni polimer, ki je vodotopen, biorazgradljiv, užiten in nizko toksičen, ter ne predstavlja nevarnosti za ljudi in okolje. Sodi v skupino kationskih polimerov, ki imajo v širokem območju pH ($\text{pH} < 10,5$) pozitivni naboj, ki je posledica protoniranih hidrofilnih amino skupin (slika 5) (31, 32, 34).



Slika 5: Kemijska struktura poli-L-lizina (35).

Uporaba PLL je razširjena na različna področja znanosti. Zaradi protimikrobnega delovanja in termostabilnosti je uporaben kot naravni konzervans v prehranski industriji. Njegova absorpcija v prebavnem traktu je zaradi velikosti molekule zelo omejena. Najdemo ga tudi v prehranskih dopolnilih za pomoč pri hujšanju, saj naj bi zaviral delovanje lipaze trebušne slinavke in s tem v tankem črevesju zmanjšal absorpcijo zaužitih maščob. V farmacevtski industriji se ga pogosto uporablja kot komponento dostavnih

sistemov za zdravilne učinkovine in kot nevirusni dostavni sistem za gensko zdravljenje raka (31, 36).

PLL ima kot dostavni sistem za zdravilne učinkovine številne dobre lastnosti. Izboljša absorpcijo zdravilnih učinkovin (verjetno zaradi polikationskih lastnosti), ima veliko prostih amino skupin, na katere se lahko veže relativno velika količina zdravilne učinkovine, v organizmu se razgradi, je nizko toksičen in dostopen v različnih velikostih molekulske mase (izbira glede na potrebo) (31, 34, 36). Prednost PLL pred nekaterimi drugimi kationskimi polimeri je v tem, da ima pozitiven naboj v območju fizioloških vrednosti pH, kar omogoča vezavo na negativno nabito površino sluznic v organizmu. Sposobnost PLL za izboljšanje prehajanja zdravilnih učinkovin skozi lipidni dvosloj lahko povežemo z že znanim mehanizmom delovanja poli-L-arginina (PLA), ki se uporablja v farmaciji kot pomožna snov za izboljšanje absorpcije zdravilnih učinkovin in bioadheziv. PLA v primerjavi z nekaterimi drugimi pospeševalci absorpcije (površinsko aktivne snovi, žolčne soli, maščobne kisline) ne povzroča draženja in poškodb na sluznici oz. tkivu. Kot polikation se veže na površino sluznice in lahko izboljša paracelularni prehod zdravilnih učinkovin z delovanjem na tesne stike in povečanjem prepustnosti celičnih membran (31, 34, 38, 39, 40).

S pomočjo elektrostatskih interakcij tvori PLL komplekse z negativno nabito DNA. Kompleksi, imenovani polipleksi obdržijo pozitiven naboj, kar v nadaljnji stopnji omogoči interakcije z negativno nabitimi celičnimi membranami in posledično vstop v celico, večinoma s pomočjo endocitoze. PLL se zato uporablja kot dostavni sistem za gensko zdravljenje. P. Symonds je v raziskavi potrdil učinkovito vezavo molekule DNA (negativno nabitih fosfatnih skupin) na PLL in sposobnost kompleksacije ter uporabnost PLL kot dostavnega sistema za nukleinske kisline (36, 37, 38, 45).

PLA in PLL so uporabili v raziskavi na endotelijskih celicah govejih pljuč, ki ga prekrivajo glikozaminoglikani, med njimi tudi heparan sulfat, ki naj bi ob vezavi s kationskimi molekulami preko citoskeleta signalno uravnaval barierne lastnosti celic. Ugotovili so kako velikost molekul in količina PLL in PLA vplivata na prepustnost pljučnih endotelijskih celic. Z merjenjem TEU so ugotovili, da polimeri arginina in lizina večji od 11 kDa zmanjšajo prepustnost endotelija, saj se je vrednost TEU v vseh primerih zmanjšala za približno 70%. Primerjali so različne koncentracije polimerov (10, 50 in 100 µg/mL) in ugotovili največji padec vrednosti TEU (za 60%) PLA s koncentracijo 50 µg/mL in PLL s

koncentracijo 100 $\mu\text{g/mL}$. Ugotavljali so tudi delovanje nevtralnega polimera in sicer dekstrana z molekulsko maso 70 kDa in opazili, da se vrednost TEU ni zmanjšala. Primerjali so tudi delovanje različnih molekulskih mas (MM) polimerov. Uporabili so PLA z MM 11,8 kDa, 38 kDa in 90 kDa in v vseh primerih ugotovili maksimalen padec vrednosti TEU (za 60-70%). Največji padec vrednosti TEU endotelija so ugotovili tudi po delovanju PLL z MM 32 kDa in 58 kDa (za 70%), medtem ko delovanje PLL z MM 7,3 kDa ni vplivalo na vrednosti TEU pljučnega endotelija. Monomeri arginina in polilizina niso vplivali na barierno funkcijo endotelija, iz česar sklepajo, da je za povečanje prepustnosti endotelija ključna navzkrižna vezava polimera z receptorji na površini celic. Za potrditev hipoteze, da vezava polikationov na heparan sulfat povzroča motnje v barierni funkciji endotelijskih celic, so s specifičnimi encimi odstranili določene glikozaminoglikane in po delovanju PLA ponovno merili vrednosti TEU. Ugotovili so, da odstranitev heparan sulfatov s površine celic z encimom heparinaza III zmanjša vpliv PLA na prepustnost endotelija za približno 50% (41).

Ranaldi G. in sodelavci (42) so ugotovili, da MM in koncentracija PLL značilno vplivata na odpiranje tesnih stikov. Merili so TEU in paracelularni prehod zunajceličnega označevalca inulina na Caco-2 celični liniji. PLL z majhno MM (30 kDa) in 0,01% koncentracijo je bil v študiji pri povečanju paracelularnega prehajanja enako učinkovit kot PLL z visoko MM (300 kDa) pri petkrat nižji koncentraciji (0,002%). Mehanizem delovanja ni popolnoma pojasnjen. Predvidevajo, da lahko različna MM in strukturna konformacija molekule PLL vplivata na različno gostoto naboja, kar lahko vpliva na integriteto celičnih membran in posledično povzroči različno prepustnost (42, 43, 44).

Symonds P. v svoji raziskavi predstavlja različne potencialne mehanizme delovanja PLL in primerja delovanje glede na koncentracijo in MM polimera. PLL poveča prepustnost membran tako, da poruši njihovo integriteto. Pojav je povezan z mešanjem (ang. scrambling) fosfolipidov, kar lahko pri daljšem delovanju PLL poškoduje tudi membrane mitohondrijev in posledično vodi v apoptotsko celično smrt. Stopnjo poškodbe membran in odstotek propada celic so vrednotili z deležem sproščenega citokroma c iz mitohondrijev različnih celičnih linij. Več citokroma c se je sprostilo pri poskusih s PLL z MM 27,4 kDa kot pri PLL z MM 2,9 kDa, kar pomeni, da MM značilno vpliva na prepustnost celičnih membran (45).

PLL ima tudi potencialno protitumorno delovanje, vendar mehanizmi delovanja niso v celoti pojasnjeni. V raziskavi *in vivo* na živalih (46) so potrdili antiangiogeno delovanje dendrimernih kompleksov PLL po intravenski aplikaciji, kar pomeni, da PLL prepreči rast novih kapilar v območju tumorja in posledično zavira oz. kontrolira njegov razvoj (46). Ugotavljali so tudi uporabnost PLL pri zdravljenju površinskega raka sečnega mehurja in ugotovili, da se pozitivno nabite molekule PLL vežejo na negativno nabite površine urotelijskih celic. Spremembe na celični membrani in citoskeletu rakavih urotelijskih celic naj bi vodile v celično smrt (47, 48). Fisher D. in sodelavci z Univerze v Marburgu (Nemčija) so testirali različne polikatione, ki imajo dokazano lastnost pospeševalcev absorpcije in ugotavljali citotoksičnost posameznega polimera v pogojih *in vitro* na fibroblastih miši. Stopnja citotoksičnosti je odvisna od časa tretiranja, koncentracije polimera, MM in gostote naboja. Ti parametri so značilno vplivali na učinkovitost vezave polikationov na membrano fibroblastov in posledično na njihove poškodbe, ki so vodile zlasti v nekrozo celic (47).

Raziskovali so tudi vpliv PLL na rast tumorjev trebušne votline miši (Ehrlich ascites tumor) in citotoksični učinek PLL na celice HeLa. Gre za nesmrtno celično linijo, ki se pogosto uporablja v raziskovalne namene, prvotno pa so te celice izolirali iz tumorja materničnega vratu. Ugotovili so, da je PLL citotoksičen, vendar so potrdili določeno stopnjo selektivnosti glede celičnih linij. Ugotovili so tudi različno delovanje PLL glede na MM, koncentracijo in konformacijo (L- in D- izomera) PLL na celični linija HeLa. Citotoksični učinek PLL so ovrednotili pri različnih MM (13, 35, 60 in 70 kDa) in ugotovili, da ta pada skupaj z manjšanjem MM. Podobno je vplivala koncentracija PLL in sicer se je PLL z MM 35 kDa pri koncentraciji 25 µg/ml izkazal za manj citotoksičnega kot PLL pri koncentraciji 50 µg/ml ali 75 µg/ml. Pri enaki koncentraciji in MM obeh konformacijskih oblik (35 kDa in 20 µg/ml) polilizina je L-izomer izkazoval večji učinek pri zaviranju celične rasti kot D-izomer. L-izomer je deloval takoj in se čez čas razgradil, saj so se po 10 urah celice regenerirale, celična rast se je ponovno vzpostavila in sicer kar 70-80% bolj uspešno v primerjavi s kontrolo (celični medij brez PLL). Nasprotno pa je D-izomer s časom povečal svojo učinkovitost in se je po nekaj dneh zaviranje celične rasti še povečevalo. Citotoksičnost je lahko posledica vezave PLL na celične membrane in posledično povečane prepustnosti membran za manjše molekule, ki sodelujejo pri sintezi DNA in proteinov. Velik antineoplastični učinek PLL na tumorske celice miši povezujejo z

večjo gostoto negativnega naboja na rakavih celicah in s tem večjo in bolj selektivno vezavo PLL na tumorje (48).

PLL se je v študijah ortotopičnega tumorja na živalskih modelih izkazal tudi kot odlična predpriprava urotelija sečnega mehurja pred implantacijo tumorskih celic v sečne mehurje miši, saj je PLL povečal učinkovitost adhezije tumorskih celic na površino urotelija miši. PLL naj bi nevtraliziral negativni naboj površinskih celic urotelija zaradi plasti glikozaminoglikanov. Na pozitivno nabito površino urotelija so se negativno nabite tumorske celice bolj učinkovito vezale in s tem je bila stopnja implantacije tumorskih celic večja (49, 50).

Dokazano je tudi zelo učinkovito protimikrobno delovanje PLL preko različnih mehanizmov. Pozitivno nabite amino skupine PLL so ključne za zaviranje rasti gliv, kvasovk in bakterij (Gram pozitivnih in Gram negativnih). Elektrostatske interakcije PLL s celično membrano bakterij, ki je negativno nabita ali nevtralna, vodijo do poškodb na celični membrani, posledično do osmotskega neravnovesja v citoplazmi bakterijske celice, kar zavira njeno rast in razvoj. PLL lahko destabilizira membrano bakterije z vezavo na negativno nabite skupine fosfolipidov in z njimi tvori micelle. Rast micelov povzroči poškodbe na membrani bakterijske celice (51). Drugi mehanizem delovanja PLL je na nivoju DNA. PLL se veže na negativno nabito DNA v bakterijski celici, motnje delovanja DNA pa lahko vodijo v smrt bakterije (31, 36, 52). Poleg tega lahko PLL povzroči celično smrt tudi preko oksidativnega stresa in nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti, ki nastanejo ob poškodbi membrane in prehodu PLL v citosol bakterijske celice (53). Najverjetneje je učinkovito protimikrobno delovanje PLL kombinacija vseh opisanih mehanizmov. PLL je učinkovit že pri nizkih koncentracijah 1-8 µg/ml, za učinkovito delovanje na spore pa je potrebna višja koncentracija do 15 µg/ml. Za optimalno delovanje na mikroorganizme je potrebna dolžina aminokislinskega zaporedja vsaj devetih lizinskih enot (31, 36, 51, 52).

2. NAMEN DELA

Luščilna sredstva imajo pomembno vlogo pri zdravljenju bakterijskega cistitisa in površinskega raka sečnega mehurja. Z njimi odstranimo okužene ali rakave urotelijske celice. V klinični praksi se v ta namen že uporabljata targesin in mitomicin C, hitosan pa se je izkazal za uspešno luščilno sredstvo na živalskih modelih.

Namen magistrskega dela je ugotoviti vpliv poli-L-lizina na barierno funkcijo urotelija sečnega mehurja podgan v odvisnosti od časa tretiranja tkiva, koncentracije in molekulske mase poli-L-lizina. Zanima nas predvsem učinkovitost luščenja površinskih urotelijskih celic po izpostavitvi tkiva poli-L-lizinu ter sposobnost obnovitve barierne funkcije urotelija po odstranitvi poli-L-lizina s površine tkiva. Učinkovitost luščenja in stopnjo obnove urotelija bomo ovrednotili v pogojih *ex vivo* z merjenjem transepitelijske električne upornosti stene sečnega mehurja podgan v dvoprostorskih difuzijskih celicah. Morfološke spremembe urotelija bomo spremljali z elektronsko mikroskopsko analizo takoj po izpostavitvi tkiva poli-L-lizinu in ob koncu obdobja regeneracije.

Cilj magistrskega dela je ugotoviti čas izpostavitve, koncentracijo in molekulsko maso za optimalen učinek poli-L-lizina na urotelij. Želimo dokazati, da poli-L-lizin učinkovito lušči urotelijske celice, pri tem pa ne povzroča globokih poškodb urotelija, zato luščenju sledi hitra obnova tkiva.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

Luščilna sredstva:

- Poli-L-lizin hidrobromid 30-70 kDa, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija
- Poli-L-lizin hidrobromid 70-150 kDa, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija

Tkivo

- sečni mehurji podgan (linija HsdRccHan Wistar, ženski spol), Medicinska fakulteta UL, Medicinski eksperimentalni center, Ljubljana, Slovenija

Topila

- destilirana voda, Fakulteta za Farmacijo UL, Ljubljana, Slovenija
- celični medij Dulbecco's modified Eagle's medium (1000 mg glukoze/L, piridoksin, klorovodikova kislina in natrijev hidrogenkarbonat, brez L-glutamina), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija

Plini

- karbogen (5 % ogljikovega dioksida in 95 % kisika), Messer, Ruše, Slovenija

Druge snovi

- natrijev klorid, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- dinatrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- kalijev dihidrogenfosfat, p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- klorovodikova kislina, Titrisol® za pripravo 1 molarne raztopine klorovodikove kisline, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- natrijev hidroksid, Titrisol® za pripravo 1 molarne raztopine natrijevega hidroksida, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- puferska raztopina Panreac pH 7,00 ± 0,02 (20 °C), Barcelona, Španija
- 1 % ozmihev tetraoksid, Serva, Heidelberg, Nemčija
- Epon 812, Serva, Heidelberg, Nemčija
- uranil acetat, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- svinčev citrat, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija

- natrijev kakodilat, Serva, Heidelberg, Nemčija
- glutaraldehid, Serva, Heidelberg, Nemčija
- paraformaldehid, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- srebrova pasta, Silver DAG1415, PLANO GmbH, Wetzlar, Nemčija
- saharoza, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemčija
- ketamin hidroklorid, Bioketan 10 %, Vetoquinol Biowet, Gorzow, Poljska
- ksilazin, Chanazine 2 %, Chanelle Pharmaceuticals Manufacturing Ltd, Galway, Irska

Aparature

- analitska tehtnica AG245, Mettler Toledo, Schwartzbach, Švica
- analitska tehtnica XP105, Mettler Toledo, Schwartzbach, Švica
- pH meter MP220, Mettler Toledo, Schwartzbach, Švica
- magnetno mešalo HI 190M, Hanna Instruments, Woonsocket, Združene države Amerike
- EasyMount™ difuzijske celice z napetostnimi in tokovnimi elektrodami ter šest-kanalnim potenciometrom z možnostjo vpenjanja napetosti in toka – "Multichannel
- voltage-current clamp" (VCC MC6), Physiologic instruments, Inc., San Diego, CA, Združene države Amerike
- termostatorirana vodna kopel M3 LAUDA, Lauda-Königshofen, Nemčija
- digitalni termometer EN 13485, TFA Dostmann, Wertheim, Nemčija
- avtomatska pipeta 2500 µL, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- avtomatska pipeta 10 mL, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- ultrazvočna kadička Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija
- sušilec pri kritični točki, Critical Point Dryer (Bal-tec CPD 030), Bal-tec, Balzers, Lichtenstein
- ultramikrotom (Leica EM UC6), Leica Microsystems, Wetzlar, Nemčija
- vrstični elektronski mikroskop Vega3, Tescan, Brno, Češka
- presevni elektronski mikroskop CM100, Philips, Eindhoven, Nizozemska

3.1.1. Raztopine

Fosfatni pufer (PBS)

PBS s pH 7,4 smo pripravili tako, da smo na analizni tehtnici zatehtali 1,190 g natrijevega hidrogenfosfata dodekahidrata, 0,095 g kalijevega dihidrogenfosfata in 4,000 g natrijevega klorida. Vse zatehte smo kvantitativno prenesli v 0,5 L bučko in dopolnili z destilirano vodo do oznake. Bučko smo pretresli, da so se soli raztopile, nato smo pufru umerili pH na vrednost 7,4 z 1 molarno raztopino klorovodikove kisline, oz. z 1 molarno raztopino natrijevega hidroksida. Tako pripravljen fosfatni pufer smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

PBS s pH 6,5 smo pripravili na enak način kot fosfatni pufer s pH 7,4. Z 1 molarno raztopino klorovodikove kisline smo pH umerili na vrednost 6,5. Fosfatni pufer smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

Predhodno smo pripravili dva fosfatna pufra po enaki recepturi, enega smo umerili na pH 7,4, drugega na pH 6,5. Prvi pufer (s pH 7,4) smo uporabili pri vseh poskusih kot donorsko raztopino v obdobju inkubacije, predinkubacije in regeneracije, saj je optimalno fiziološko sprejemljiv. PLL je dobro topen v vodnih medijih in ima pozitiven naboj v širokem pH območju (pH < 10), zato smo ga raztapljali v fosfatnem pufru pH 6,5. Pri nekoliko nižjih vrednostih pH ima PLL večji naboj in posledično boljše vezavo na negativno nabite površinske celice urotelija. Pufer smo izbrali tudi glede na fiziološki pH urina (4-8) ter glede na predhodne podobne študije in raziskave, kjer so uporabili PBS z vrednostmi med 6 in 6,5. (31, 32, 34, 42, 52).

Raztopine PLL

Za pripravo 0,01% raztopine PLL (30-70 kDa in 70-150 kDa) smo na precizni analitski tehtnici s pomočjo pincete zatehtali približno 2 mg PLL hidrobromida in ga prenesli v 50 mL bučko. Z avtomatsko pipeto smo v bučko dodali desetkrat toliko mL PBS 6,5 kot smo zatehtali mg PLL (npr. 20 mL v kolikor smo zatehtali točno 2,00 mg) in nekaj časa dobro mešali dokler se PLL ni popolnoma raztopil. Raztopine smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

Za pripravo 0,001% raztopine PLL smo redčili 0,01% raztopino PLL s PBS 6,5. S pomočjo avtomatske pipete smo odpipetirali 1 mL 0,01% raztopine in jo prenesli v 10 mL bučko ter dodali PBS 6,5 do oznake. Raztopino smo dobro premešali in hranili v hladilniku pri 4 °C.

Kakodilatni pufer s pH 7,4 (0,2 molaren)

Za pripravo raztopine natrijevega kakodilata smo najprej s pomočjo analitske tehtnice zatehtali 8,590 g natrijevega kakodilata, ki smo ga prenesli v 200 mL bučko in z destilirano vodo dopolnili do oznake. Raztopino smo dobro premešali, da se je sol raztopila. Nato smo v 250 mL bučko odpipetirali 62,50 mL že pripravljene raztopine natrijevega kakodilata, dodali 3,37 mL 0,2 molarne klorovodikove kisline in dopolnili do oznake z destilirano vodo. Kakodilatni pufer smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

Raztopina saharoze (0,33 molarna) v kakodilatnem pufru s pH 7,4 (0,2 molaren)

0,33 molarno raztopino saharoze v kakodilatnem pufru smo pripravili tako, da smo na analitski tehtnici zatehtali 112,959 g saharoze in jo prenesli v 1 L bučko ter do oznake dopolnili z 0,2 molarnim kakodilatnim pufrom s pH 7,4. Raztopino smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

Fiksativ za pripravo tkiva (SEM)

Za fiksacijo tkiva pri SEM smo pripravili fiksativ tako, da smo zatehtali 20,000 g paraformaldehida in ga kvantitativno prenesli v 1 L bučko. Odpipetirali smo 18,87 mL 25% raztopine glutaraldehida in ga dodali v bučko ter do oznake dopolnili z 0,2 molarnim kakodilatnim pufrom s pH 7,4. Fiksativ smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

Fiksativ za pripravo tkiva (TEM)

Za fiksacijo tkiva pri TEM smo pripravili fiksativ tako, da smo zatehtali 45,000 g paraformaldehida in ga kvantitativno prenesli v 1 L bučko. Odpipetirali smo 18,87 mL 25% raztopine glutaraldehida in ga dodali v bučko ter do oznake dopolnili z 0,2 molarnim kakodilatnim pufrom s pH 7,4. Fiksativ smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.1.2 Tkivo

Sečni mehur podgan

Sečne mehurje za potrebe poskusov smo izolirali iz samic podgan linije HsdRccHan Wistar. Ta del poskusov smo naredili na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, ki ima dovoljenje za delo na izoliranih tkivih in organih. Potrdilo št. U34401-4/2013/3 je izdala Uprava republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin.

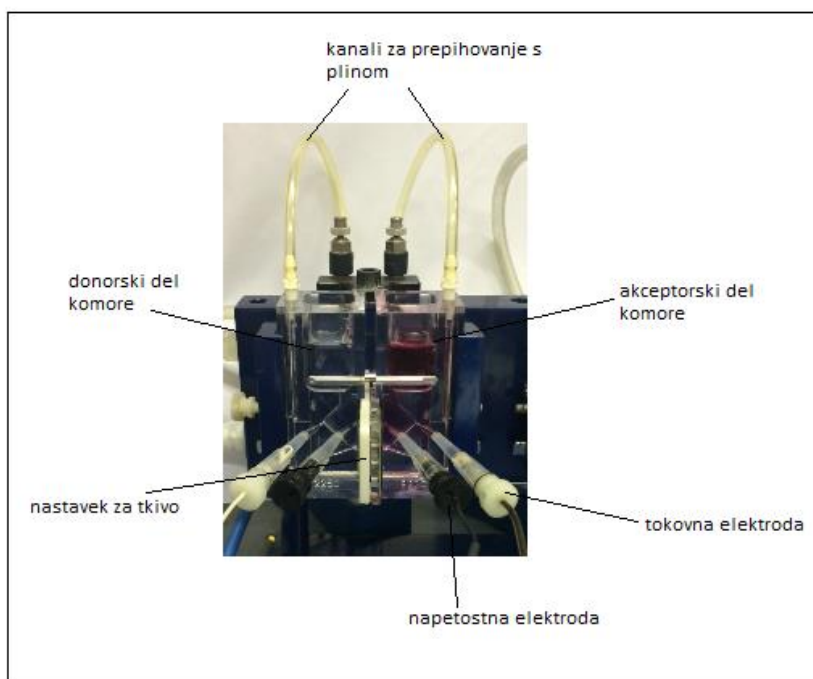
Podgane so bile pred usmrtnitvijo nastanjene v prostorih s sobno temperaturo, 55 ± 10 % vlažnostjo ter 12-urnim dnevnim in nočnim ciklom. Dobivale so vodo in hrano v

normalnih količinah. Usmrtili smo jih v komori s CO₂, nato smo jim odprli trebušno votlino in izrezali sečne mehurje. Do vpenjanja v difuzijske celice smo sečne mehurje hranili v celičnem mediju na sobni temperaturi.

3.2 Metode

3.2.1. Merjenje TEU

Za merjenje TEU smo uporabili *EasyMount*TM dvoprostorske difuzijske celice, ki so sestavljene iz dveh delov (donorska in akceptorska stran komore), nastavka za tkivo, dveh tokovnih elektrod, dveh napetostnih elektrod in kanalov za prepihanje s plinom (slika 6). V našem primeru smo obe strani difuzijskih celic prepihovali s karbogenom, ki je mešanica kisika in ogljikovega dioksida, kar omogoča mešanje raztopin in oksigenacijo tkiva. Difuzijske celice so priklopljene na vodno kopel za konstantno vzdrževanje temperature med 36 in 37 °C (12, 14, 15).



Slika 6: Dvoprostorska difuzijska celica *EasyMount*TM.

Elektrofiziološke parametre smo izmerili s pomočjo šestkanalnega napetostno tokovnega izvira. Odčitavali smo transepitelijski električni potencial (TEP), ki je potencial elektrokemijskega gradienta in ga ustvari vpet urotelij z aktivnim transportom ionov. Izmerimo ga s parom napetostnih elektrod, ki ima kompenzirano pozitivno oz. negativno

asimetrijo ob toku $0,0 \mu\text{A}$ (s kompenzacijo izničimo napetost zaradi asimetrije med elektrodama). Izmerjen potencial predstavlja razliko potenciala na sluznični strani in na serozni strani. Potencial na serozni strani ozemljimo zato, da lahko merimo le potencial na sluznični strani. Vrednosti TEP nam povejo stopnjo vitalnosti tkiva, saj nevitalno tkivo ne more ustvariti elektrokemijskega gradienta. To je pomembno za *ex vivo* poskuse, saj lahko po več ur z merjenjem TEP spremljamo ali je vpeto tkivo v difuzijskih celicah še vitalno. Kratkostični tok (KST) je električni tok, ki je potreben, za spremembo transepitelijskega potenciala. Vrednost KST pomeni celokupen transport ionov skozi urotelij, pri tem ne upoštevamo upornosti raztopin. Transepitelijska električna upornost (TEU) predstavlja upornost tkiva proti pasivnemu prehajanju ionov. Izračunamo jo z enačbo 1 in sicer po Ohmovem zakonu iz izmerjenih vrednosti TEP in KST (12, 54).

$$\boxed{\text{TEU} = (\Delta U_t / \Delta I_t) \cdot A \quad [\Omega \text{ cm}^2]}$$

Enačba 1

U_t - Napetost ob času t [mV]

I_t - Tok ob času t [μA]

A - površina vpetega tkiva, ki je v stiku z raztopino [cm^2]

Vrednosti TEU so obratno sorazmerne s prehajanjem ionov, ki lahko prehajajo po dveh poteh, transcelularno in paracelularno (5, 12, 54). Ob prekinjanja tesnih stikov ali porušitve integritete celičnih membran sta obe poti prehoda skozi tkivo olajšani, zato se vrednosti TEU posledično zmanjšajo (5, 6).

Priprava elektrod

Elektrode smo pripravili iz nastavkov za $200 \mu\text{L}$ pipeto, ki smo jih v ta namen prilagodili tako, da smo odrezali konico, da se ta prilega odprtinam na difuzijski celici. 3 M raztopino KCl smo segreli in vmešali agar ter pustili, da se agar ohladi in zgosti. V vsak nastavek smo vbrizgali $100 \mu\text{L}$ pripravljene mase ter pustili v časi napolnjeni z KCl in zatesnili s parafilmom. Pred uporabo elektrod smo preverili ali so v nastavkih prisotni zračni mehurčki, če so bili potem smo nastavke zamenjali ali vbrizgali še malo pripravljene mase z agarjem, da smo se znebili mehurčkov. Elektrode smo hranili v hladilniku tako, da so bile konice nastavkov potopljene v raztopini KCl.

Vpenjanje tkiva v difuzijske celice

Izolirane sečne mehurje podgan smo v celičnem mediju pri sobni temperaturi takoj prenesli iz Inštituta za biologijo celice, Medicinske fakultete UL na Fakulteto za farmacijo UL. Sečnim mehurjem smo odstranili odvečno vezivo ter jih prepolovili. Polovico mehurja smo vpeli v nastavek za tkivo, pri čemer je bila urotelijska stran mehurja v stiku z donorsko raztopino oz. raztopino, ki jo preiskujemo, serozna stran pa z akceptorsko raztopino.

Izvedba meritev TEU

- Vse potenciometre na aparatu smo nastavili na vrednost 0,0.
- Celice s praznimi nastavki za tkivo smo pritrdili na stojala.
- Vodno kopel in napetostno tokovni sistem smo vključimo in počakamo nekaj minut, da se kopel segreje.
- Nastavke z elektrodami smo vzeli iz KC in jih sprali s prečiščeno vodo. Napetostne elektrode smo namestili v odprtine na difuzijskih celicah, ki so bližje nastavku za tkivo, tokovne elektrode pa v odprtine, ki so dlje od nastavka tkiva.
- Celice s praznimi nastavki za tkivo smo najprej napolnili z posamezno raztopino in jo umerili.
- Priključili smo dotok karbogena (95 % O₂, 5 % CO₂).
- Upravljalce, na katerih so izhodi za elektrode, smo nastavili na OPERATE.
- Nastavili smo FUNCTION na OPEN (zelena lučka) ter METER na VOLTAGE (zelena lučka). Napetost, ki smo jo izmerili je bila posledica asimetrije med elektrodama. V primeru asimetrije (negativne ali pozitivne) smo z OFFSET potenciometrom nastavili napetost na 0,0 mV. V kolikor je bila absolutna vrednost asimetrije višja od 10 mV, tega ni bilo mogoče kompenzirati, zato smo v takem primeru zamenjali elektrodi.
- METER smo nastavili na CURRENT ter pritisnili testni gumb PUSH TO ADJUST. Izmerjeni tok je moral biti stabilen, njegova vrednost pa med 60 in 68 μA. V kolikor je bil tok manjši ali je padal, smo zamenjali tokovni elektrodi z novimi. Včasih je bilo dovolj, če smo med seboj zamenjali levo in desno tokovno elektrodo.
- Če smo želeli kompenzirati upornost raztopine smo nastavili METER na VOLTAGE in med držanjem gumba PUSH TO ADJUST s potenciometrom FLUID RES COMPENSATION nastavili vrednost na 0,0.

- Nastavili smo FUNCTION na ZERO in z injekcijsko brizgo odstranili pufer iz difuzijskih celic.
- Nastavke za tkivo z vpeto polovico sečnega mehurja smo obrnili tako, da je bil urotelij obrnjen proti donorski strani difuzijski celice. Na donorsko stran smo odpipetirali 2,5 mL PBS 7,4 segretega na 37 °C, na akceptorsko stran pa 2,5 mL celičnega medija, ki smo ga enako ko pufer predhodno segreli. V takšnih pogojih smo pustili tkivo 30 min, V tem času se je tkivo navadilo na pogoje in šele nato smo pričeli z odčitavanjem elektrofizioloških parametrov. V obdobju predinkubacije, ki je trajalo 30 min smo tkivo izpostavili PBS 7,4 in odčitavati elektrofiziološke parametre na 10 min.
- Sledilo je različno dolgo obdobje tretiranja, v katerem smo odčitavali elektrofiziološke parametre na 5 min. V tem obdobju so bile na donorski strani spodaj navedene raztopine, ki smo jih pustili na tkivu 15 ali 30 min:
 - o 0,01% PLL z MM 70-150 kDa, 15 min
 - o 0,01% PLL z MM 70-150 kDa, 30 min
 - o 0,01% PLL z MM 30-70 kDa, 15 min
 - o 0,01% PLL z MM 30-70 kDa, 30 min
 - o 0,001% PLL z MM 30-70 kDa, 15 min
 - o 0,001% PLL z MM 30-70 kDa, 30 min
 - o PBS s pH 6,5, 15 min
 - o PBS s pH 6,5, 30 min
- Med regeneracijo tkiva (300 ali 315 min v PBS 7,4) smo najprej odčitavali parametre na 10 min in nato na 20 min.
- Pred tretiranjem in regeneracijo smo zamenjali raztopine v donorskem delu komore. Med vsako menjavo raztopin smo na aparaturi nastavili FUNCTION na ZERO in iz difuzijske celice z injekcijsko brizgo odstranili raztopino. Nadomestili smo jo z 2,5 mL na 37 °C ogrete druge raztopine. Pri menjavi raztopine PLL s PBS 7,4, smo donorski del komore dvakrat sprali z destilirano vodo in nato še enkrat s PBS 7,4.
- Elektrofiziološke parametre smo odčitavali po naslednjih korakih:
 - o Za odčitavanje TEP: Nastavili smo FUNCTION na OPEN ter METER na VOLTAGE.
 - o Za odčitavanje KST: Nastavili smo FUNCTION na CLAMP ter METER na CURRENT

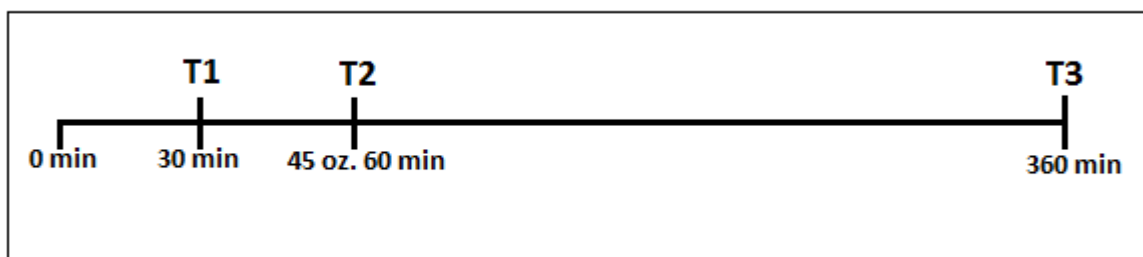
- Po končanem poskusu smo nastavke s tkivom vzeli iz difuzijske celice in tkivo zavrgli. Elektrode smo sprali s prečiščeno vodo in jih dali v 3 molarnem KCl in hranili v hladilniku. Celice in nastavke za tkivo smo očistili v ultrazvočni kadički, na koncu pa smo jih sprali še s prečiščeno vodo. Sušili smo jih pri sobni temperaturi.

3.2.2. Morfološka analiza tkiva

Delovanje PLL na urotelij sečnega mehurja podgan smo analizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) in s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM).

Postopek odvzema tkiva po poskusih *ex vivo*

Po končanem merjenju TEU smo polovico sečnega mehurja podgane previdno vzeli z nastavka za tkivo dvoprostorske difuzijske celice in ga takoj prenesli v fiksativ za elektronsko mikroskopijo. Tkivo smo jemali v treh izbranih časovnih točkah T1, T2 in T3 kot so prikazane na sliki 7.



Slika 7: Prikaz časovnih točk odvzema tkiva za elektronsko mikroskopsko analizo.

Časovna točka T1 predstavlja čas po končani 30- minutni predinkubaciji. Časovna točka T2 predstavlja čas ob koncu 15- oz. 30- minutnega tretiranja tkiva s PLL. Časovna točka T3 je končna točka poskusa in predstavlja čas ob koncu 315- oz. 300- minutne regeneracije tkiva v PBS 7,4.

Vrstična elektronska mikroskopija (SEM)

Polovice sečnih mehurjev podgan smo takoj po merjenju TEU prenesli v fiksativ za SEM (2 % paraformaldehid in 2 % glutaraldehid v 0,2 molarnem kakodilatnem pufru s pH 7,4). Po fiksaciji (3,5 ure) pri 4 °C smo tkiva čez noč spirali z 0,2 molarnim kakodilatnim pufrom s pH 7,4. Naslednji dan smo tkiva za eno uro izpostavili 1 % ozmijevem tetroksidu in po dehidraciji z acetonom posušili s Critical Point Dryerjem pri kritični točki CO₂. Nato

smo polovice sečnih mehurjev nalepili s srebrovo pasto na posebne nosilce, jih naprašili z zlatom in opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM).

Presevna elektronska mikroskopija (TEM)

Polovice sečnih mehurjev podgan smo takoj po merjenju TEU prenesli v fiksativ za TEM (4,5 % paraformaldehid in 2 % gluteraldehid v 0,2 molarnem kakodilatnem pufri s pH 7,4), kjer smo jih s skalpelom razrezali na več majhnih koščkov (velikosti 1mm^3) in jih fiksirali 3 ure pri $4\text{ }^\circ\text{C}$.

Po fiksaciji smo koščke tkiva čez noč spirali z 0,33 molarno saharozo v 0,2 molarnem kakodilatnem pufri (pH 7,4) pri $4\text{ }^\circ\text{C}$. Naslednji dan je sledila sekundarna fiksacija z 1 % ozmijevim tetroksidom in kontrastiranje z 2 % uranil acetatom pri sobni temperaturi. Nato smo tkivo sprali z destilirano vodo in dehidrirali v etanolu. Koščke tkiva smo nato vklopili v umetno smolo Epon 812, ki je pri višjih temperaturah ($60\text{-}80\text{ }^\circ\text{C}$) v termostatu polimerizirala in se strdila, kar nam je omogočilo, da smo vklopno smolo skupaj s tkivom z ultramikrotomom narezali na ultratanke rezine debeline 50 nm. Te smo kontrastirali s svinčevim citratom in jih opazovali s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM).

4. REZULTATI

4.1. Rezultati meritev TEU stene sečnega mehurja podgan v pogojih *ex vivo*

Vpliv PLL na barierno funkcijo sečnega mehurja podgan smo ovrednotili z merjenjem TEU. Pri tem smo spreminjali MM in koncentracijo PLL ter čas izpostavljenosti tkiva polimeru. Izmerjene absolutne vrednosti TEU smo zaradi boljše primerljivosti rezultatov pretvorili v relativne vrednosti, saj so se vrednosti TEU sečnih mehurjev že v predinkubacijski dobi med seboj zelo razlikovale (med 50 in 500 Ωcm^2). Absolutno vrednost TEU posameznega sečnega mehurja ob času 30 min (tik pred začetkom tretiranja s PLL) smo določili za 100% in na podlagi te meritve smo pretvorili ostale absolutne vrednosti TEU v relativne.

4.1.1. Kontrolni poskusi

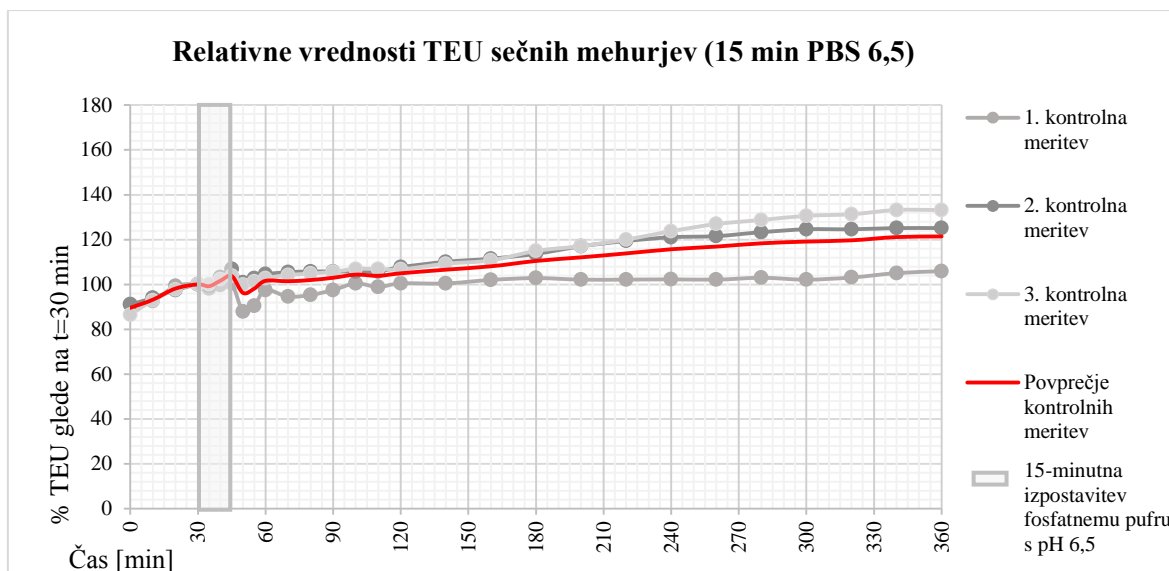
V kontrolnih poskusih smo urotelij za 15 ali 30 min izpostavili PBS s pH vrednostjo 6,5, ki smo ga uporabili za pripravo raztopin PLL. Želeli smo dokazati, da medij v katerem smo raztapljali PLL nima učinka na barierno funkcijo sečnega mehurja. Rezultati 15-minutnega tretiranja tkiva s PBS s pH 6,5 so predstavljeni v preglednici I in na sliki 8, rezultati 30-minutnega tretiranja pa v preglednici II in na sliki 9.

Preglednica I: Absolutne in relativne vrednosti TEU stene sečnega mehurja po 15- minutni izpostavitvi PBS s pH 6,5. Sivo obarvane celice označujejo interval, v katerem je bilo tkivo izpostavljeno PBS 6,5. A- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, R- relativna vrednost TEU, POVP- povprečje relativnih vrednosti TEU, SD- standardni odklon relativnih vrednosti TEU.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		3. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	59	91	76	91	62	86	90	3
10	59	93	78	94	67	93	93	1
20	64	99	81	97	70	98	98	1
30	64	100	83	100	72	100	100	0
35	63	98	83	99	72	100	99	1
40	64	100	86	103	74	102	102	2
45	65	100	89	107	75	104	104	3
50	56	88	84	101	72	100	96	7
55	58	90	85	103	73	101	98	7
60	63	97	87	105	74	103	102	4
70	61	95	88	105	75	104	101	6
80	61	95	88	106	75	105	102	6
90	63	97	88	106	76	106	103	5
100	64	100	88	106	77	107	104	3

Nadaljevanje preglednice I:

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		3. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
110	63	99	88	106	77	107	104	4
120	64	100	90	108	77	107	105	4
140	64	100	92	110	79	109	107	5
160	65	102	93	111	80	111	108	5
180	66	103	94	114	83	115	110	7
200	66	102	97	117	84	117	112	9
220	66	102	99	119	86	120	114	10
240	66	102	101	121	89	124	116	12
260	66	102	101	122	91	127	117	13
280	66	103	103	123	93	129	118	14
300	66	102	104	125	94	131	119	15
320	66	103	104	125	95	131	120	15
340	67	105	104	125	96	133	121	15
360	68	106	104	125	96	133	121	14

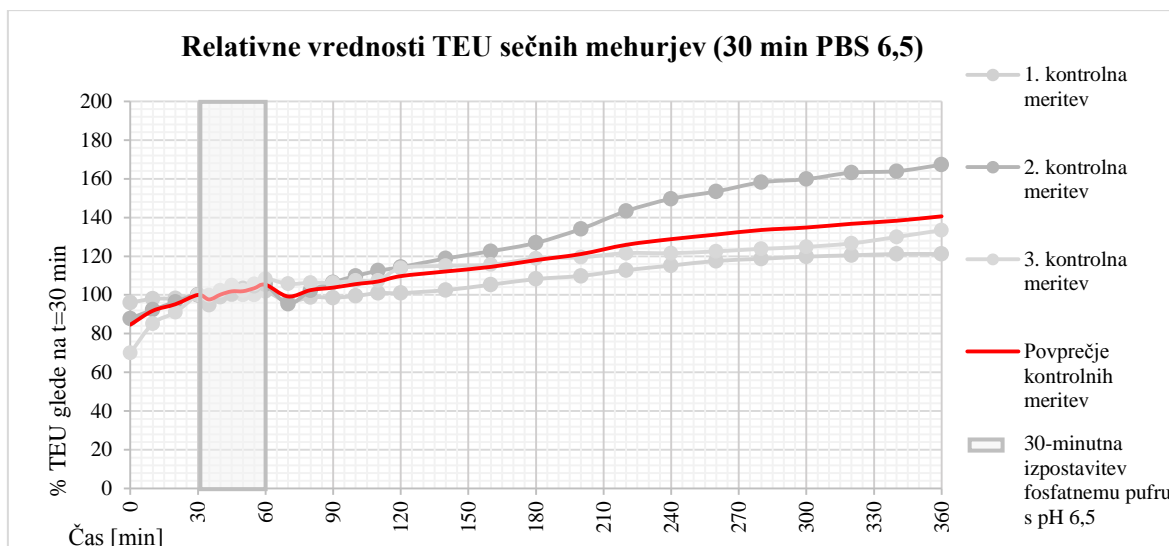


Slika 8: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, ki so bili 15 min izpostavljeni PBS 6,5. Osenčen del na grafu predstavlja časovni interval izpostavljenosti tkiva PBS 6,5.

Povprečna relativna vrednost TEU je ob menjavah pufrov (ob času 30 in 45 minut) nekoliko padla, za največ 12%. To je najverjetneje posledica samega postopka menjave raztopin na donorski strani difuzijske celice, ko se spremenijo trenutni pogoji (npr. temperatura) na površini stene sečnega mehurja. Do konca poskusa so vrednosti TEU počasi naraščale in dosegle v povprečju 121% vrednosti

Preglednica II: Absolutne in relativne vrednosti TEU stene sečnega mehurja po 30- minutni izpostavitvi PBS s pH 6,5. Sivo obarvane celice označujejo interval, v katerem je bilo tkivo izpostavljeno PBS 6,5. A- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, R- relativna vrednost TEU, POVP- povprečje relativnih vrednosti TEU, SD- standardni odklon relativnih vrednosti TEU.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		3. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	81	96	73	88	212	70	85	13
10	83	98	77	92	258	85	92	6
20	83	98	80	96	276	91	95	4
30	85	100	83	100	303	100	100	0
35	83	98	79	95	302	100	98	3
40	84	99	83	99	310	102	100	2
45	85	100	84	100	318	105	102	3
50	85	100	86	103	310	102	102	2
55	85	100	87	105	320	106	103	3
60	86	102	88	106	328	108	105	3
70	82	97	80	95	320	106	99	6
80	84	99	85	102	322	106	102	4
90	83	99	89	106	322	106	104	4
100	84	99	92	110	325	107	106	5
110	86	101	94	112	325	107	107	6
120	86	101	95	114	345	114	110	8
140	87	102	99	119	348	115	112	9
160	89	105	102	123	350	116	114	9
180	92	108	106	127	360	119	118	9
200	93	110	112	134	362	119	121	12
220	96	113	120	143	368	122	126	16
240	98	115	125	150	368	122	129	18
260	100	118	128	153	371	123	131	19
280	100	119	132	158	375	124	134	21
300	101	120	133	160	378	125	135	22
320	102	120	136	163	384	127	137	23
340	103	121	137	164	394	130	138	23
360	103	121	140	167	404	133	141	24



Slika 9: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, ki so bili 30 min izpostavljeni PBS 6,5. Osenčen del na grafu predstavlja časovni interval izpostavljenosti tkiva PBS 6,5.

Tudi v primeru 30- minutne izpostavitve stene sečnega mehurja PBS s pH 6,5 je povprečna vrednost TEU ob obeh menjavah pufrov nekoliko padla, v tem primeru za največ 5%. V povprečju so vrednosti TEU ves čas počasi naraščale in ob koncu časa regeneracije dosegle celo 141% vrednosti.

4.1.2. Poskusi s PLL

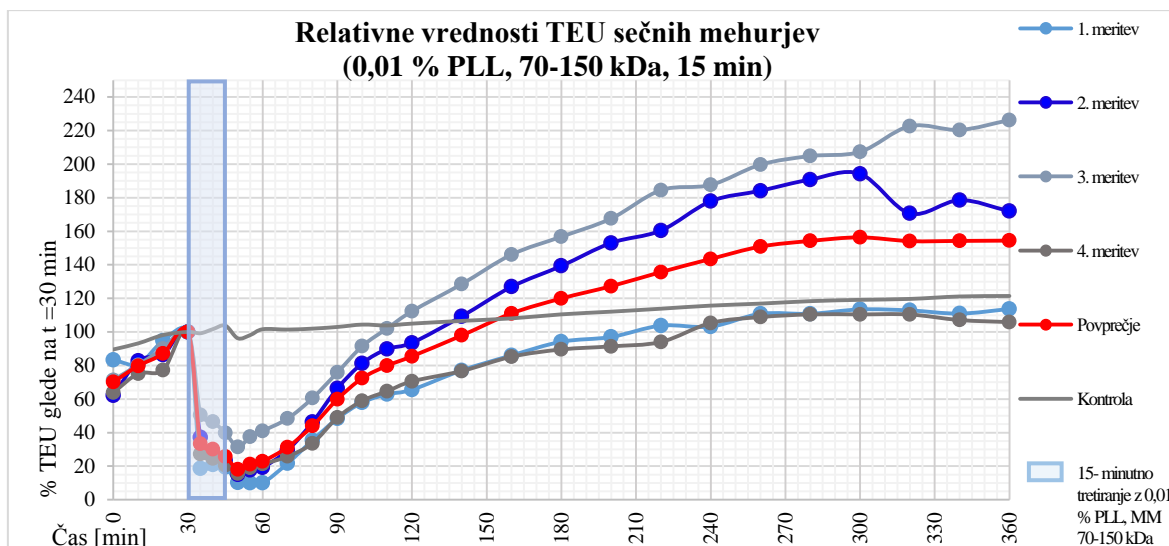
Pri poskusih s PLL smo tkivo izpostavili različnim pogojem (MM in koncentracija PLL, čas tretiranja), da smo ugotovili optimalne pogoje za učinkovito delovanje PLL.

0,01% PLL (70-150 kDa), 15 min

Preglednica III in slika 10 prikazujeta absolutne in relativne vrednosti TEU stene sečnega mehurja po 15- minutni izpostavitvi 0,01% PLL z MM 70-150 kDa.

Preglednica III: Absolutne in relativne vrednosti TEU stene sečnega mehurja po 15- minutni izpostavitvi 0,01% PLL z MM 70-150 kDa. Modro obarvane celice označujejo interval, v katerem je bilo tkivo izpostavljeno PLL. A- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, R- relativna vrednost TEU, POV- povprečje relativnih vrednosti TEU, SD- standardni odklon relativnih vrednosti TEU.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		3. meritev		4. meritev		POV P [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	316	83	191	62	99	71	229	64	70	10
10	306	81	255	83	111	80	270	75	80	3
20	359	95	266	86	125	90	277	77	87	7
30	379	100	308	100	138	100	359	100	100	0
35	71	19	114	37	70	51	97	27	33	14
40	79	21	87	28	64	47	88	25	30	11
45	74	19	72	23	55	40	74	21	26	9
50	39	10	46	15	44	31	56	16	18	9
55	38	10	54	18	52	38	69	19	21	12
60	38	10	59	19	57	41	76	21	23	13
70	82	22	91	29	67	48	93	26	31	12
80	134	35	142	46	84	61	121	34	44	12
90	183	48	204	66	105	76	176	49	60	14
100	220	58	250	81	127	92	211	59	72	17
110	238	63	277	90	141	102	232	65	80	19
120	248	66	288	93	156	112	253	71	85	22
140	292	77	337	109	178	129	275	77	98	26
160	326	86	391	127	202	146	306	85	111	30
180	357	94	429	139	217	157	321	90	120	33
200	367	97	471	153	232	168	328	91	127	39
220	393	104	494	160	255	184	337	94	136	44
240	391	103	548	178	260	188	378	105	143	45
260	420	111	567	184	276	200	391	109	151	48
280	420	111	587	191	284	205	396	110	154	51
300	430	113	598	194	287	207	396	110	156	52
320	427	113	525	171	308	223	396	110	154	54
340	420	111	550	179	305	220	384	107	154	55
360	431	114	529	172	313	226	380	106	154	56



Slika 10: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, ki so bili 15 min izpostavljeni 0,01% PLL z MM 70-150 kDa. Osenčen del na grafu predstavlja časovni interval izpostavljenosti tkiva PLL.

Povprečna vrednost TEU je v času predinkubacije naraščala nato pa je takoj po menjavi pufru z 0,01% PLL (70-150 kDa) strmo padla, na 33% vrednosti in v času tretiranja s PLL ves čas počasi padala, do najmanj 18% vrednost. V času regeneracije je povprečna vrednost TEU naraščala in dosegla vrednosti kontrole v 160 minuti.

0,01% PLL (70-150 kDa), 30 min

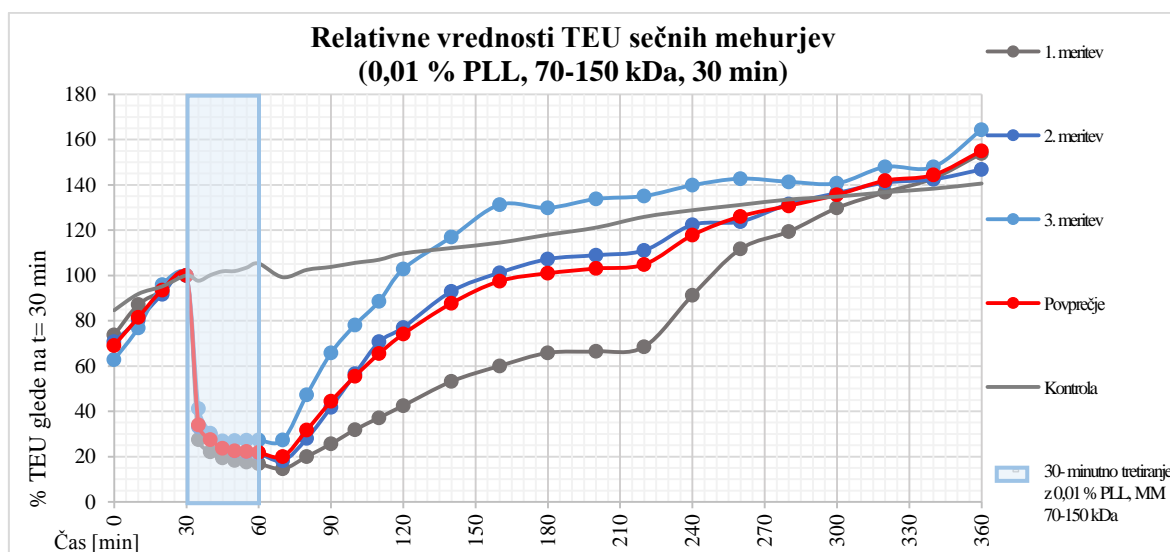
Preglednica IV in slika 11 prikazujeta absolutne in relativne vrednosti TEU urotelija sečnega mehurja po 30- minutni izpostavitvi 0,01% PLL z MM 70-150 kDa.

Preglednica IV: Absolutne in relativne vrednosti TEU stene sečnega mehurja po 30- minutni izpostavitvi 0,01% PLL z MM 70-150 kDa. Modro obarvane celice označujejo interval, v katerem je bilo tkivo izpostavljeno PLL. A- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, R- relativna vrednost TEU, POVP- povprečje relativnih vrednosti TEU, SD- standardni odklon relativnih vrednosti TEU.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		3. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	236	74	265	71	157	63	69	6
10	278	87	301	80	192	77	81	5
20	298	93	343	92	240	96	94	2
30	320	100	374	100	250	100	100	0
35	88	28	124	33	103	41	34	7
40	71	22	112	30	76	30	27	5
45	62	19	92	25	68	27	24	4
50	59	18	84	22	68	27	23	4
55	56	18	82	22	68	27	22	5
60	54	17	80	21	68	27	22	5
70	47	15	68	18	68	27	20	7

Nadaljevanje preglednice IV:

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		3. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
80	64	20	105	28	118	47	32	14
90	82	26	157	42	164	66	44	20
100	102	32	212	57	195	78	56	23
110	119	37	265	71	222	89	65	26
120	136	43	288	77	257	103	74	30
140	170	53	348	93	292	117	88	32
160	192	60	379	101	328	131	97	36
180	210	66	401	107	325	130	101	32
200	212	66	408	109	335	134	103	34
220	219	69	416	111	338	135	105	34
240	292	91	458	122	350	140	118	25
260	357	112	464	124	357	143	126	16
280	382	119	493	132	354	141	131	11
300	415	130	511	136	352	141	136	5
320	437	137	528	141	370	148	142	6
340	457	143	533	142	370	148	144	3
360	492	154	550	147	411	164	155	9



Slika 11: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, ki so bili 30 min izpostavljeni 0,01% PLL z MM 70-150 kDa. Osenčen del na grafu predstavlja časovni interval izpostavljenosti tkiva PLL.

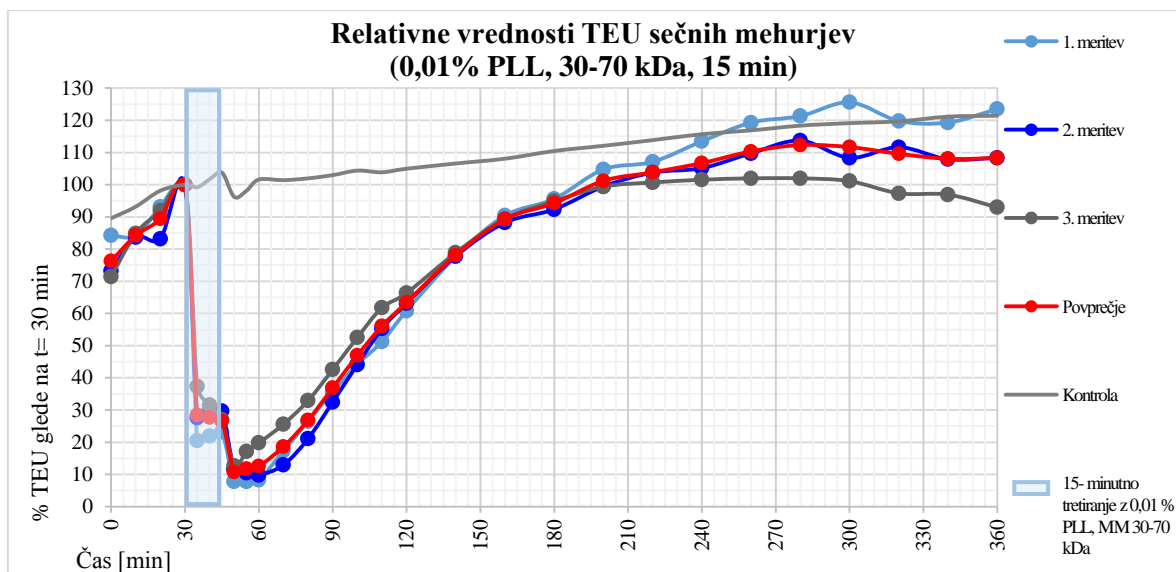
Povprečna vrednost TEU je v času predinkubacije naraščala nato pa je takoj po menjavi pufru z 0,01% PLL (70-150 kDa) strmo padla, na 34% vrednosti in v času tretiranja s PLL ves čas počasi padala, do najmanj 20% vrednost. V času regeneracije je povprečna vrednost TEU naraščala in dosegla vrednosti kontrole v 300 minuti.

0,01% PLL (30-70 kDa), 15 min

Preglednica V in slika 12 prikazujeta absolutne in relativne vrednosti TEU urotelija sečnega mehurja po 15- minutni izpostavitvi 0,01% PLL z MM 30-70 kDa.

Preglednica V: Absolutne in relativne vrednosti TEU stene sečnega mehurja po 15- minutni izpostavitvi 0,01% PLL z MM 30-70 kDa. Modro obarvane celice označujejo interval, v katerem je bilo tkivo izpostavljeno PLL. A- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, R- relativna vrednost TEU, POVP- povprečje relativnih vrednosti TEU, SD- standardni odklon relativnih vrednosti TEU.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		3. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	438	84	322	73	394	71	76	7
10	438	84	368	84	468	85	84	1
20	485	93	366	83	506	92	89	5
30	521	100	440	100	551	100	100	0
35	107	20	121	28	206	37	28	8
40	114	22	131	30	174	32	28	5
45	121	23	130	30	149	27	27	3
50	40	8	51	12	70	13	11	3
55	40	8	46	10	94	17	12	5
60	43	8	43	10	109	20	13	6
70	90	17	57	13	141	26	19	6
80	138	26	93	21	182	33	27	6
90	185	36	143	32	235	43	37	5
100	230	44	194	44	290	53	47	5
110	267	51	243	55	341	62	56	5
120	317	61	278	63	366	66	63	3
140	405	78	342	78	435	79	78	1
160	471	90	388	88	493	89	89	1
180	498	96	406	92	523	95	94	2
200	545	105	437	99	548	99	101	3
220	558	107	456	104	555	101	104	3
240	591	113	463	105	560	102	107	6
260	621	119	483	110	562	102	110	9
280	632	121	500	114	562	102	112	10
300	654	126	477	108	558	101	112	13
320	624	120	491	112	537	97	110	11
340	621	119	475	108	534	97	108	11
360	643	123	477	108	513	93	108	15



Slika 12: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, ki so bili 15 min izpostavljeni 0,01% PLL z MM 30-70 kDa. Osenčen del na grafu predstavlja časovni interval izpostavljenosti tkiva PLL.

Povprečna vrednost TEU je v času predinkubacije naraščala nato pa je takoj po menjavi pufra z 0,01% PLL (30-70 kDa) strmo padla, na 28% vrednosti in v času tretiranja s PLL ves čas počasi padala, do najmanj 11% vrednost. V času regeneracije je povprečna vrednost TEU naraščala in v 280 minuti skoraj dosegla vrednosti kontrole.

0,01% PLL (30-70 kDa), 30 min

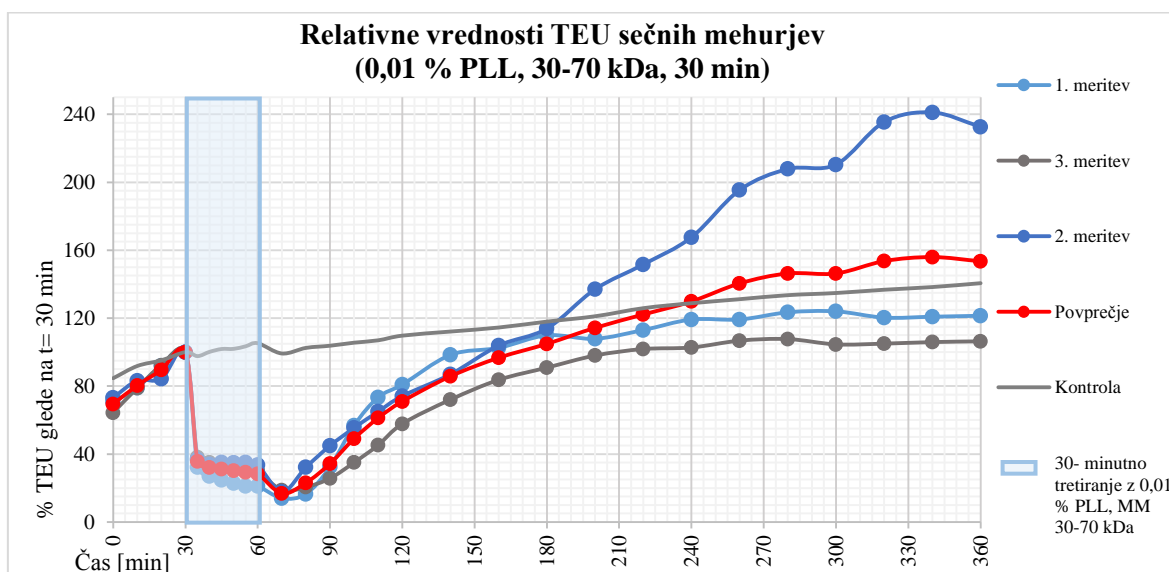
Preglednica VI in slika 13 prikazujeta absolutne in relativne vrednosti TEU urotelija sečnega mehurja po 30- minutni izpostavitvi 0,01% PLL z MM 30-70 kDa.

Preglednica VI: Absolutne in relativne vrednosti TEU stene sečnega mehurja po 30- minutni izpostavitvi 0,01% PLL z MM 30-70 kDa. Modro obarvane celice označujejo interval, v katerem je bilo tkivo izpostavljeno PLL. A- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, R- relativna vrednost TEU, POVP- povprečje relativnih vrednosti TEU, SD- standardni odklon relativnih vrednosti TEU.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		3. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	260	71	173	73	238	64	69	5
10	290	79	196	83	292	79	80	2
20	338	92	198	84	341	92	90	5
30	367	100	236	100	370	100	100	0
35	118	32	87	37	141	38	36	3
40	99	27	80	34	129	35	32	4
45	91	25	83	35	124	33	31	6
50	84	23	82	35	120	33	30	6
55	77	21	83	35	116	31	29	7

Nadaljevanje preglednice VI:

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		3. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
60	77	21	79	34	112	30	28	6
70	51	14	42	18	69	19	17	2
80	60	16	76	32	76	21	23	8
90	119	32	106	45	95	26	34	10
100	209	57	131	55	129	35	49	12
110	269	73	153	65	167	45	61	14
120	297	81	175	74	214	58	71	12
140	361	98	205	87	266	72	86	13
160	376	103	245	104	309	84	97	11
180	403	110	268	114	336	91	105	12
200	396	108	323	137	362	98	114	20
220	415	113	357	152	376	102	122	26
240	437	119	395	168	380	103	130	34
260	437	119	460	195	395	107	140	48
280	453	123	490	208	398	108	146	54
300	455	124	496	210	386	105	146	56
320	441	120	555	236	388	105	154	71
340	443	121	568	241	391	106	156	74
360	445	121	548	233	393	106	153	69



Slika 13: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, ki so bili 30 min izpostavljeni 0,01% PLL z MM 30-70 kDa. Osenčen del na grafu predstavlja časovni interval izpostavljenosti tkiva PLL.

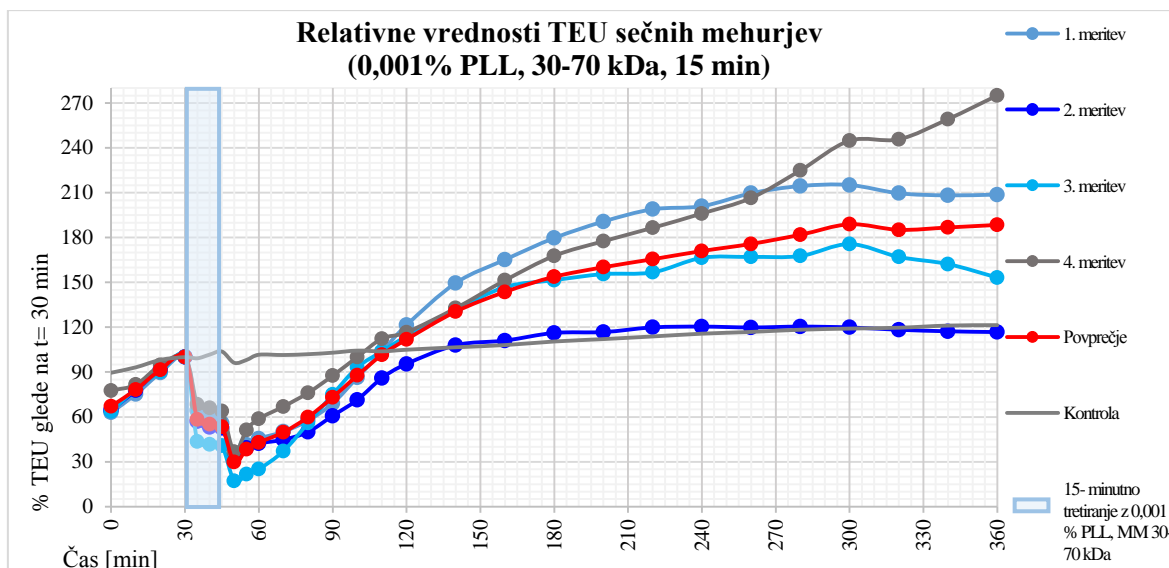
Povprečna vrednost TEU je v času predinkubacije naraščala, nato pa je takoj po menjavi pufru z 0,01% PLL (30-70 kDa) strmo padla na 36% vrednosti in v času tretiranja s PLL ves čas počasi padala, do najmanj 17% vrednost. V času regeneracije je povprečna vrednost TEU naraščala in dosegla vrednosti kontrole v 240 minuti.

0,001% PLL (30-70 kDa), 15 min

Preglednica VII in slika 14 prikazujeta absolutne in relativne vrednosti TEU urotelija sečnega mehurja po 15- minutni izpostavitvi 0,001% PLL z MM 30-70 kDa.

Preglednica VII: Absolutne in relativne vrednosti TEU stene sečnega mehurja po 15-minutni izpostavitvi 0,001% PLL z MM 30-70 kDa. Modro obarvane celice označujejo interval, v katerem je bilo tkivo izpostavljeno PLL. A- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, R- relativna vrednost TEU, POV- povprečje relativnih vrednosti TEU, SD- standardni odklon relativnih vrednosti TEU.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		3. meritev		4. meritev		POV P [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	160	63	184	64	259	64	126	78	67	7
10	191	75	222	78	319	79	132	82	78	3
20	227	90	261	92	366	90	153	95	91	2
30	254	100	285	100	406	100	162	100	100	0
35	163	64	163	57	177	44	111	68	58	11
40	150	59	151	53	169	42	107	66	55	10
45	142	56	150	53	166	41	104	64	53	10
50	83	33	93	32	70	17	59	37	30	9
55	105	41	112	39	88	22	83	51	38	12
60	116	46	121	42	102	25	95	59	43	14
70	127	50	128	45	151	37	108	67	50	13
80	146	58	143	50	227	56	123	76	60	11
90	175	69	173	61	305	75	142	88	73	11
100	219	86	204	71	378	93	162	100	88	12
110	263	104	245	86	422	104	182	112	101	11
120	308	121	272	95	463	114	189	117	112	11
140	380	150	308	108	534	131	215	133	130	17
160	420	165	317	111	597	147	245	151	144	23
180	456	180	331	116	616	152	272	168	154	28
200	484	191	333	117	632	156	288	178	160	32
220	505	199	342	120	637	157	302	187	166	35
240	510	201	343	120	676	166	318	196	171	37
260	532	210	342	120	679	167	334	206	176	42
280	545	214	343	120	681	168	364	225	182	48
300	547	215	342	120	714	176	396	245	189	54
320	532	210	337	118	679	167	398	246	185	55
340	529	208	334	117	659	162	420	259	187	61
360	530	209	333	117	623	153	445	275	188	69



Slika 14: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, ki so bili 15 min izpostavljeni 0,001% PLL z MM 30-70 kDa. Osenčen del na grafu predstavlja časovni interval izpostavljenosti tkiva PLL.

Povprečna vrednost TEU je v času predinkubacije naraščala nato pa je takoj po menjavi pufru z 0,001% PLL (30-70 kDa) strmo padla, na 58% vrednosti in v času tretiranja s PLL ves čas počasi padala, do najmanj 30% vrednost. V času regeneracije je povprečna vrednost TEU naraščala in dosegla vrednosti kontrole v 110 minuti.

0,001% PLL (30-70 kDa), 30 min

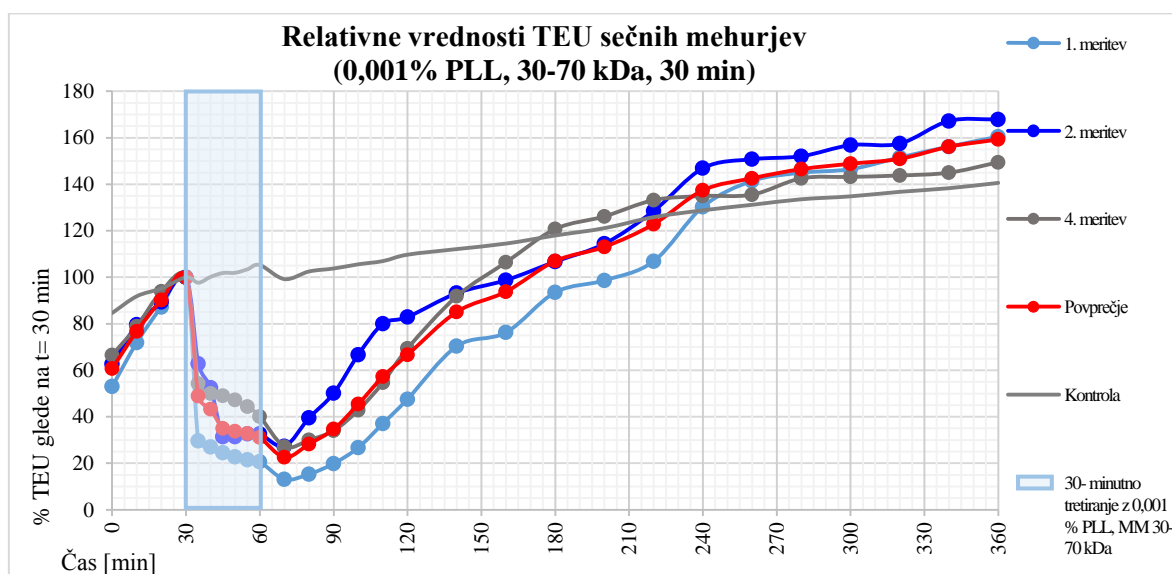
Preglednica VIII in slika 15 prikazujeta absolutne in relativne vrednosti TEU urotelija sečnega mehurja po 30- minutni izpostavitvi 0,001% PLL z MM 30-70 kDa.

Preglednica VIII: Absolutne in relativne vrednosti TEU stene sečnega mehurja po 30-minutni izpostavitvi 0,001% PLL z MM 30-70 kDa. Modro obarvane celice označujejo interval, v katerem je bilo tkivo izpostavljeno PLL. A- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, R- relativna vrednost TEU, POVP- povprečje relativnih vrednosti TEU, SD- standardni odklon relativnih vrednosti TEU.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		4. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	337	53	179	63	283	67	61	7
10	457	72	228	80	336	79	77	4
20	555	87	256	89	400	94	90	3
30	636	100	286	100	426	100	100	0
35	189	30	180	63	231	54	49	17
40	172	27	150	53	213	50	43	14
45	156	25	90	31	209	49	35	13
50	145	23	90	31	201	47	34	12
55	137	22	93	33	189	44	33	11
60	131	21	93	33	171	40	31	10

Nadaljevanje preglednice VIII:

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		4. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
70	83	13	78	27	116	27	23	8
80	97	15	113	40	128	30	28	12
90	126	20	143	50	145	34	35	15
100	170	27	191	67	183	43	45	20
110	236	37	229	80	233	55	57	22
120	302	48	237	83	296	69	67	18
140	447	70	267	93	391	92	85	13
160	485	76	283	99	453	106	94	16
180	594	94	305	107	514	121	107	14
200	627	99	327	114	537	126	113	14
220	679	107	368	129	567	133	123	14
240	828	130	420	147	575	135	137	9
260	899	141	431	151	577	136	143	8
280	921	145	435	152	607	143	147	5
300	931	146	449	157	610	143	149	7
320	963	152	451	157	612	144	151	7
340	993	156	479	167	618	145	156	11
360	1020	160	481	168	637	149	159	9



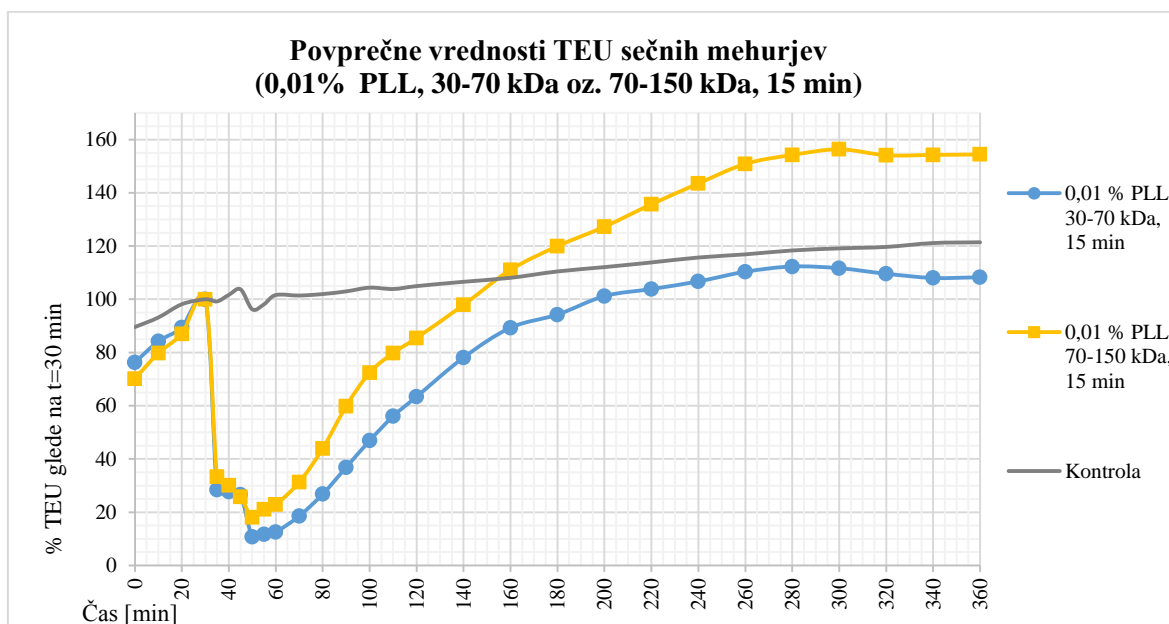
Slika 15: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, ki so bili 30 min izpostavljeni 0,001% PLL z MM maso 30-70 kDa. Osenčen del na grafu predstavlja časovni interval izpostavljenosti tkiva PLL.

Povprečna vrednost TEU je v času predinkubacije naraščala nato pa je takoj po menjavi pufra z 0,001% PLL (30-70 kDa) strmo padla, na 49% vrednosti in v času tretiranja s PLL ves čas počasi padala, do najmanj 23% vrednost. V času regeneracije je povprečna vrednost TEU naraščala in dosegla vrednosti kontrole v 220 minuti.

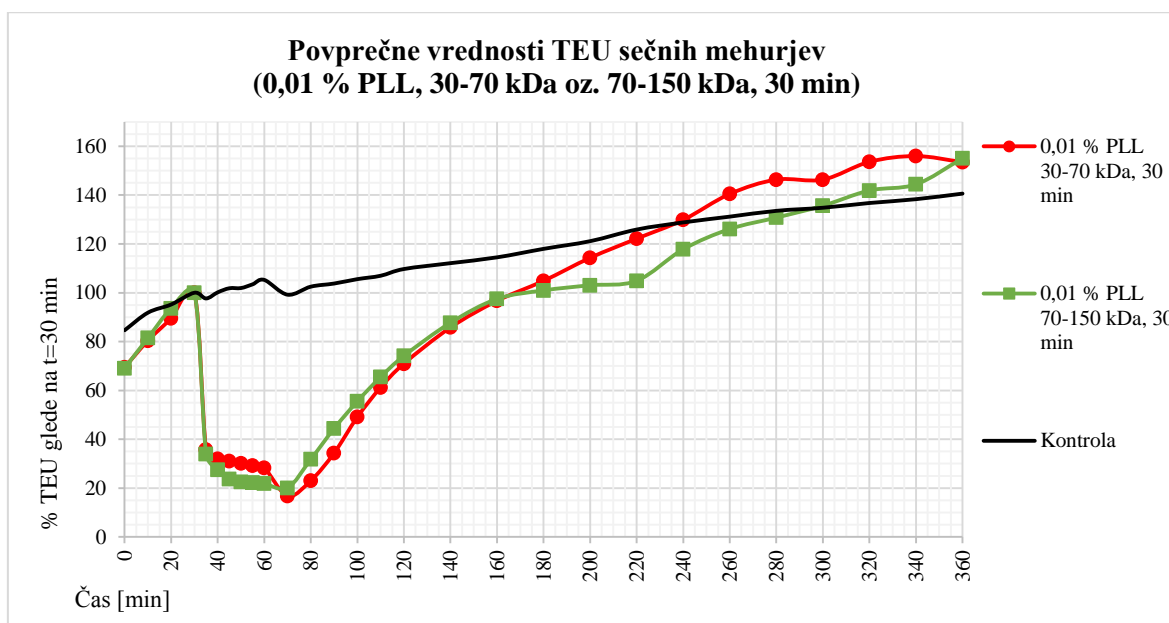
4.1.3. Primerjava rezultatov poskusov s PLL

Vpliv molekulske mase PLL na vrednosti TEU

Sliki 16 in 17 prikazujeta povprečne vrednosti TEU sten sečnih mehurja po 15 oz. 30 min izpostavitvi urotelija 0,01% PLL z različnimi MM (30-70 kDa in 70-150 kDa).



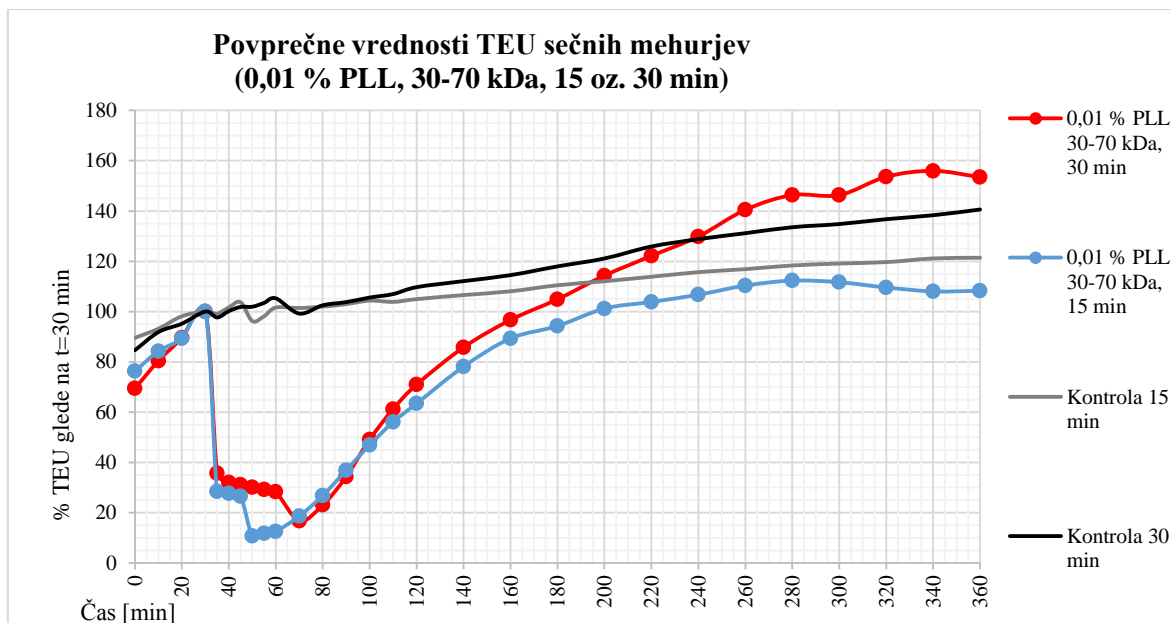
Slika 16: Povprečne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, ki so bili 15 min izpostavljeni 0,01% PLL z MM 30-70 kDa oz. 70-150 kDa.



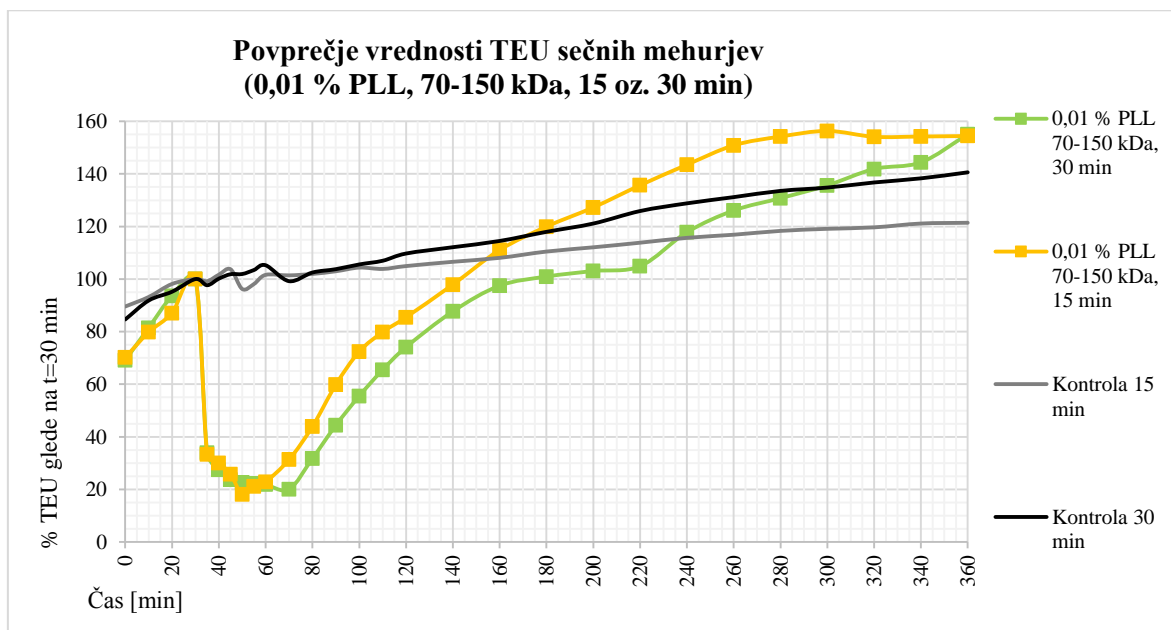
Slika 17: Povprečne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, ki so bili 30 min izpostavljeni 0,01% PLL z MM 30-70 kDa oz. 70-150 kDa.

Vpliv časa izpostavitve tkiva PLL na vrednosti TEU

Sliki 18 in 19 prikazujeta povprečne vrednosti TEU sten sečnih mehurjev po 15 in 30 min izpostavitvi urotelija 0,01% PLL z različnimi MM (30-70 kDa in 70-150 kDa).



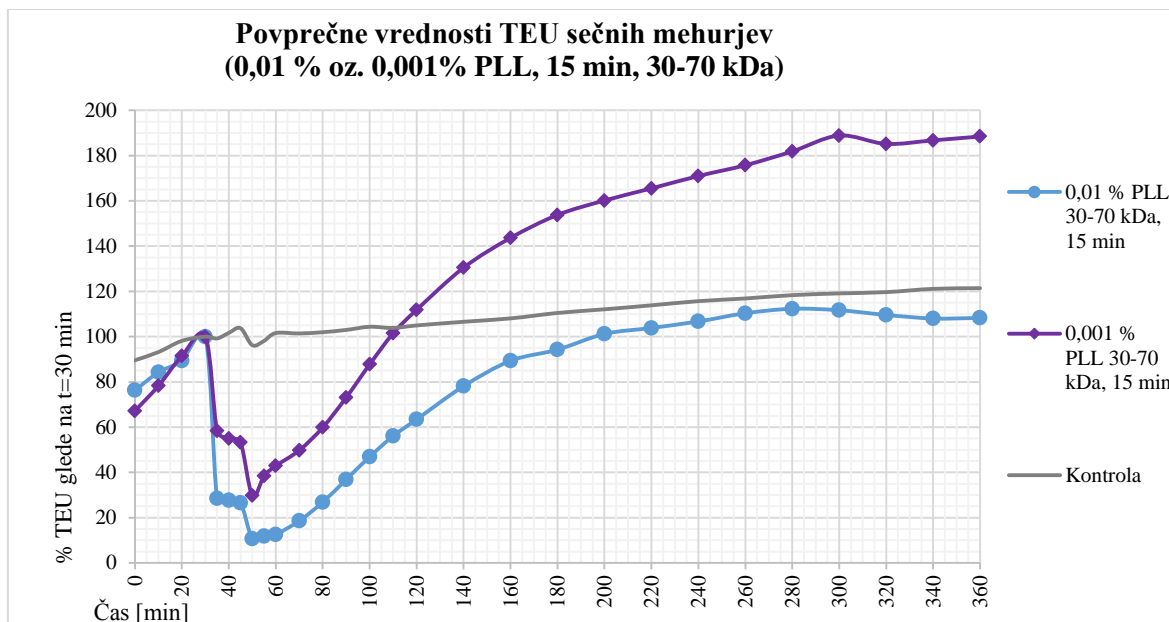
Slika 18: Povprečne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, ki so bili 15 oz. 30 min izpostavljeni 0,01% PLL z MM 30-70 kDa.



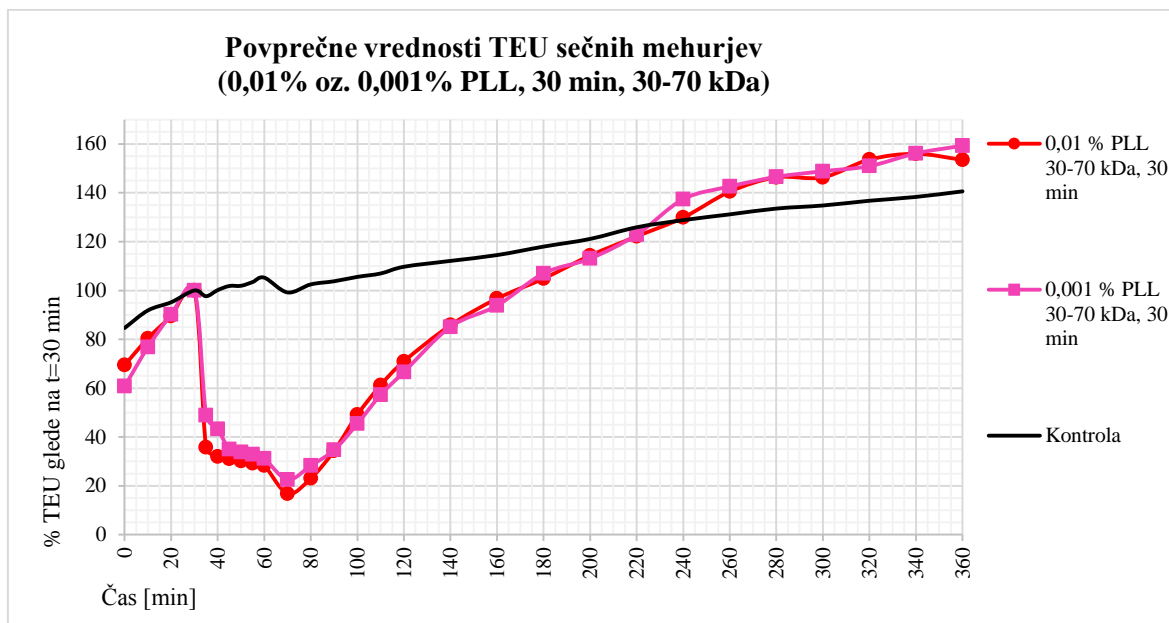
Slika 19: Povprečne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, ki so bili 15 oz. 30 min izpostavljeni 0,01% PLL z MM 70-150 kDa.

Vpliv koncentracije PLL na vrednosti TEU

Sliki 20 in 21 prikazujeta povprečne vrednosti TEU sten sečnih mehurjev po 15 oz. 30 min izpostavitvi urotelija PLL z MM 30-70 kDa in z različnimi koncentracijami (0,01% in 0,001%).



Slika 20: Povprečne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, ki so bili 15 min izpostavljeni 0,01% in 0,001% PLL z MM 30-70 kDa.



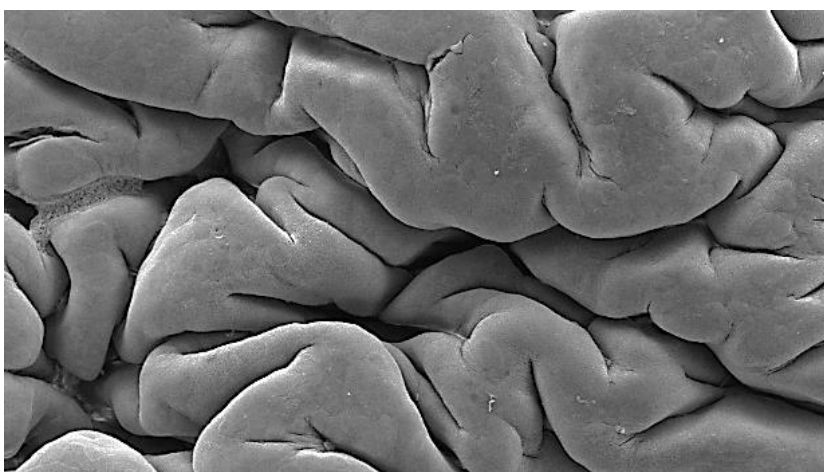
Slika 21: Povprečne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, ki so bili 30 min izpostavljeni 0,01% in 0,001% PLL z MM 30-70 kDa.

4.2. Rezultati elektronsko mikroskopske analize urotelija podgan v pogojih *ex vivo*

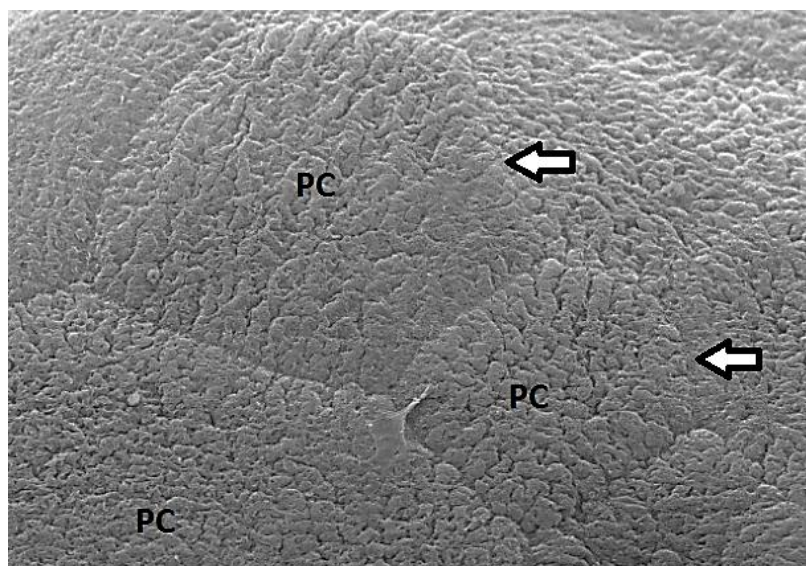
Za ugotavljanje učinkov PLL na urotelij sečnega mehurja podgan smo uporabili vrstični elektronski mikroskop (SEM) in presevni elektronski mikroskop (TEM). Na osnovi mikroskopske analize urotelija z obema vrstama elektronske mikroskopije smo ugotavljali obsežnost luščenja urotelijskih celic po izpostavitvi urotelija PLL *ex vivo* in sposobnost regeneracije urotelija po odstranitvi PLL *ex vivo*. Oboje smo primerjali pri dveh koncentracijah PLL in sicer pri 0,01% in pri 0,001% PLL z MM 30-70 kDa. Za to primerjavo smo se odločili na podlagi rezultatov meritev TEU, ker nismo opazili značilnih razlik med nižjo in višjo MM in časom tretiranja. Največja razlika v izmerjenih vrednostih TEU je bila med obema koncentracijama. Elektronsko mikroskopsko analizo smo naredili v treh časovnih točkah (slika 7 v poglavju Materiali in metode). Časovna točka T1 predstavlja začetek tretiranja tkiva s PLL po 30 minutah predinkubacije v PBS 7,4, T2 predstavlja konec 15- minutnega tretiranja tkiva s PLL (v kontrolnih poskusih s PBS 6,5) in T3 predstavlja konec 315- minutne regeneracije tkiva v PBS 7,4 ter hkrati končno točko poskusa (po 360 min).

4.2.1. Časovna točka T1

Površina urotelija pregledana s SEM v točki T1 je bila intaktna, površinske celice heksagonalne oblike so bile tesno skupaj, medcelični stiki med njimi niso bili prekinjeni in luščenja urotelija ni bilo (sliki 22 in 23).



Slika 22: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T1. Intaktna površina urotelija brez luščenja. SEM, povečava: x 377.

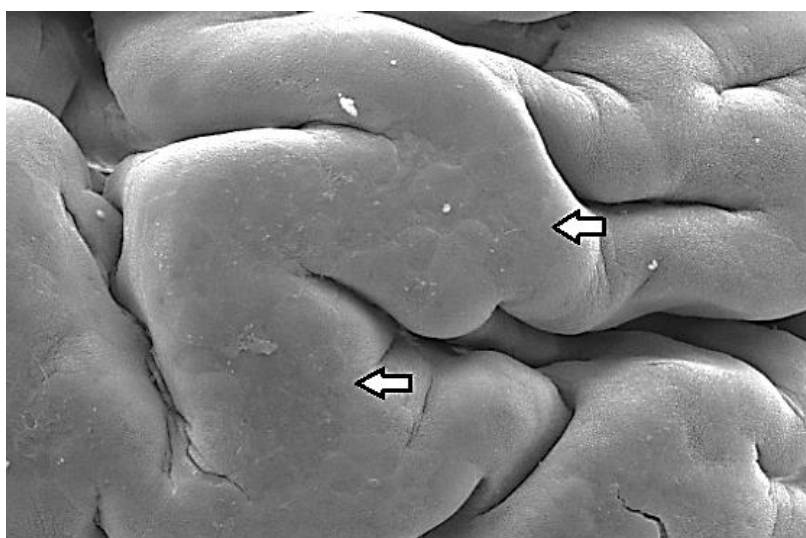


Slika 23: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T1. Na površini urotelija so površinske celice (PC) heksagonalne oblike z značilno školjkasto nagubano površino in dobro razvitimi tesnimi stiki med njimi (*puščice*). SEM, povečava: x 3650.

4.2.2. Časovna točka T2

Kontrolni poskusi s PBS 6,5

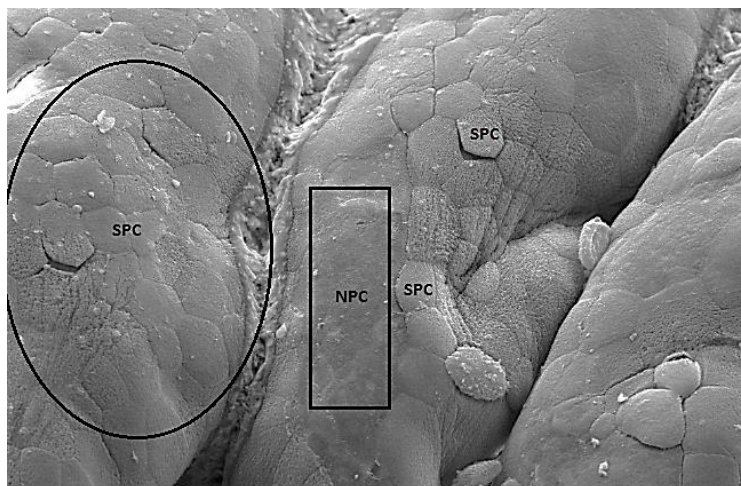
V kontrolnem poskusu smo urotelij sečnega mehurja podgane izpostavili PBS 6,5 za 15 min in s tem ugotavljali vpliv medija, v katerem smo raztapljali PLL, na samo tkivo. S SEM smo zasledili nepoškodovano površino urotelija brez luščenja urotelijskih celic, tesni stiki med površinskimi celicami so bili dobro razviti in se niso prekinjali (slika 24).



Slika 24: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T2 po 15- minutni izpostavitvi PBS 6,5. Površina urotelija je intaktna in brez luščenja, vidne so površinske celice in meje med njimi (*puščice*). SEM, povečava: x 427.

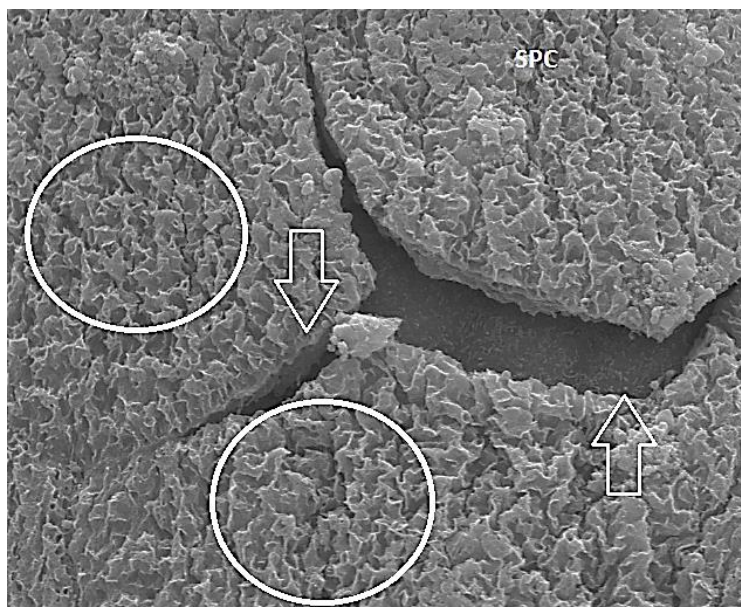
Poskusi z 0,001% PLL

Na površini urotelija so bila vidna manjša območja, kjer so se odluščile »stare« površinske celice (SPC). Na teh predelih so se na površini urotelija izpostavile vmesne celice, ki smo jih poimenovali »nove« površinske celice (NPC). Nekroze ali apoptoze urotelijskih celic nismo opazili (slik 25).



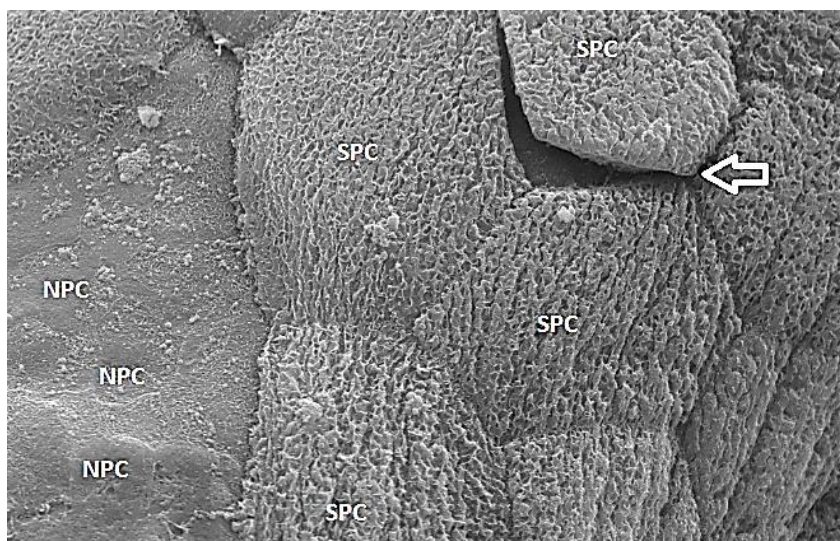
Slika 25: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T2 po 15- minutni izpostavitvi 0,001% PLL. Območja urotelija s SPC (označeno z elipso) in manjša odluščena območja z izpostavljenimi NPC (označeno s pravokotnikom). SEM, povečava: x 1160.

S SEM smo opazili tudi prekinjanje tesnih stikov med SPC in posledično začetek luščenja teh celic (slika 26).

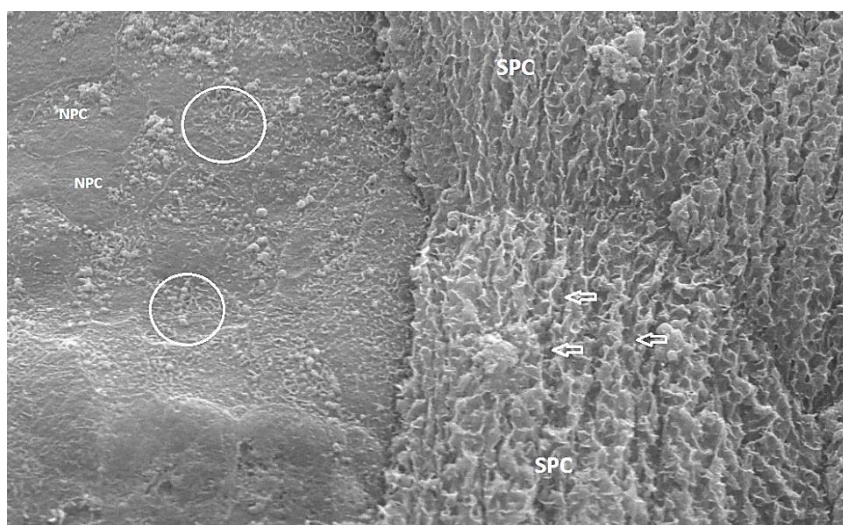


Slika 26: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T2 po 15- minutni izpostavitvi 0,001% PLL. Vidno prekinjanje tesnih stikov (*puščici*) med SPC, ki imajo značilen nazobčan videz površine (označeno s krogi). SEM, povečava: x 11300.

Na odlučenih predelih urotelija so se na površini izpostavile NPC, ki so v primerjavi s SPC manjše in na nizki stopnji diferenciacije. Na njihovih apikalnih površinah smo zato zasledili mikrovile in neskljenjene vrvičaste grebene (sliki 27a, 27b).

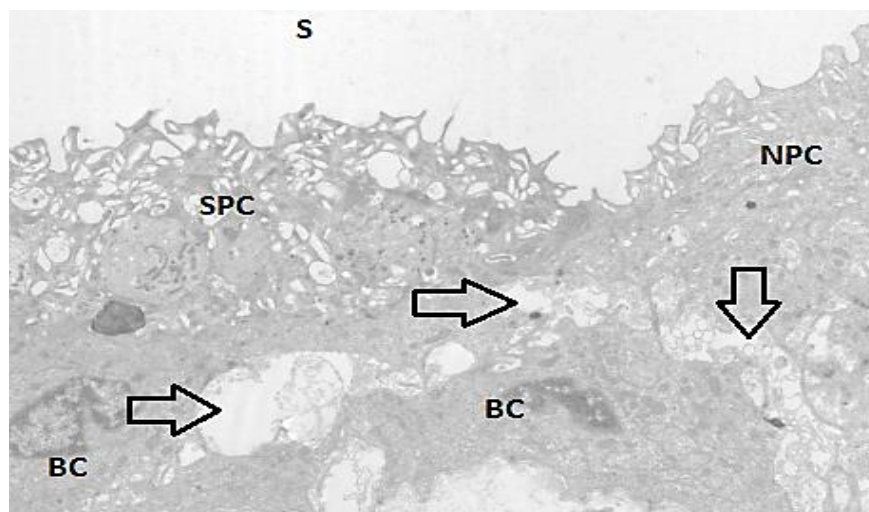


Slika 27a: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T2 po 15- minutni izpostavitvi 0,001% PLL. Meja med odlučenim delom urotelija z izpostavljenimi NPC in neodlučenim delom s SPC na površini urotelija. Puščica kaže mejo med SPC s prekinjenimi tesnimi stiki. SEM, povečava: x 5440.



Slika 27b: Urotelij sečnega mehurja podgane v T2 po 15- minutni izpostavitvi 0,001% PLL. Na apikalni površini NPC vidni mikrovili in neskljenjeni vrvičasti grebeni (označeno s krogi). Na površini visoko diferencirane SPC vidni značilni mikrogrebeni in plaki (puščice). SEM, povečava: x 5440.

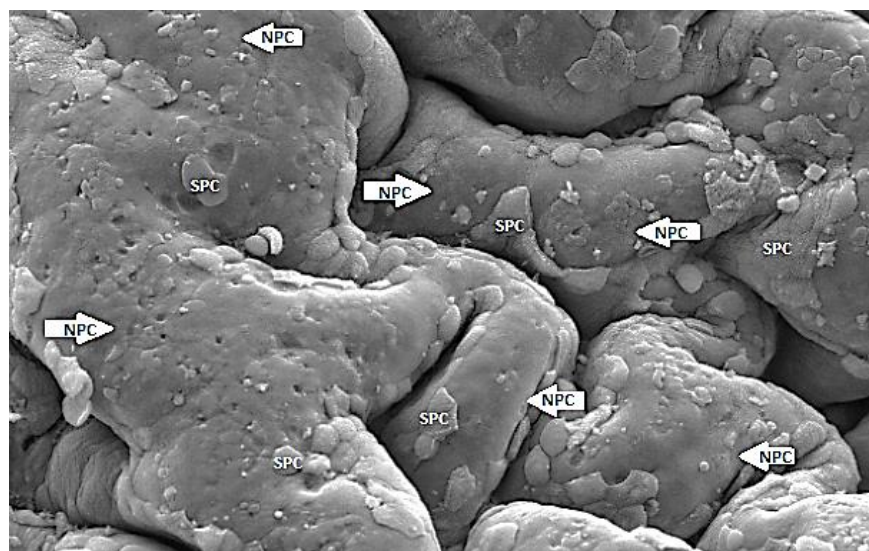
S TEM smo ugotavljali delovanje 0,001% PLL v globino urotelija in potrdili rezultate analize s SEM, da je urotelij na odlučenih predelih dvoskladen ter da se luščijo izključno površinske celice. Dodatno pa smo s TEM ugotovili, da se medcelični stiki prekinjajo tudi v globljih celičnih skladih urotelija in ne le med površinskimi celicami (slika 28).



Slika 28: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T2 po 15- minutni izpostavitvi 0,001% PLL. Meja med triskladnim (na levi strani slike) in odluščenim dvoskladnim predelom urotelija (na desni strani slike). Triskladni urotelij gradijo površinske celice (SPC), vmesne celice (VC) in bazalne celice (BC), odluščeni urotelij pa nove površinske celice (NPC) in bazalne celice (BC). Med VC in BC ter med NPC in BC so povečani medcelični prostori (puščice) zaradi prekinjenih medceličnih stikov. TEM, povečava: x 2600.

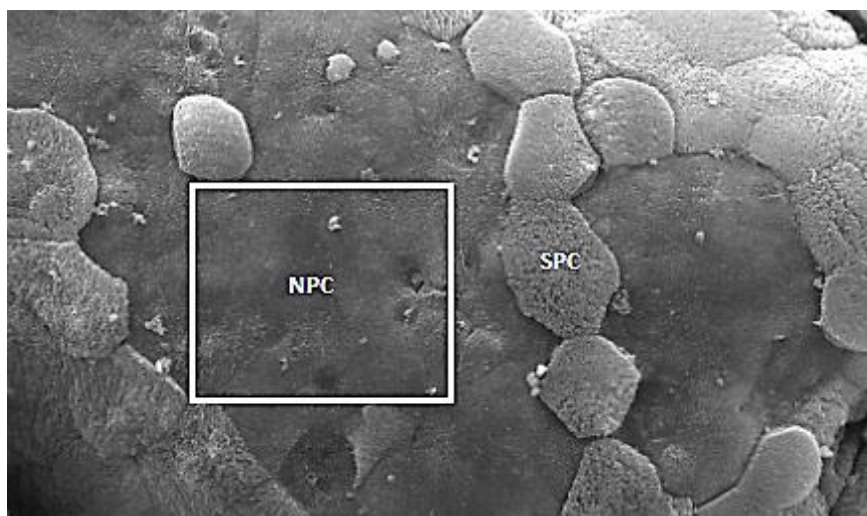
Poskusi z 0,01% PLL

S SEM smo ugotovili, da je večina površine urotelija odluščena, in da so prisotne le še manjše skupine SPC. Nekroze ali apoptoze urotelijskih celic nismo opazili (slika 29).

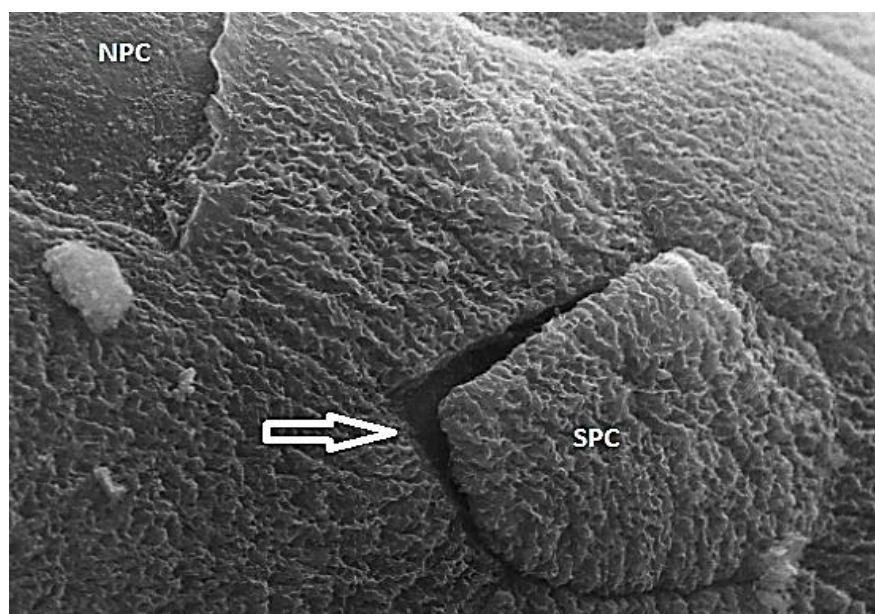


Slika 29: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T2 po 15- minutni izpostavitvi 0,01% PLL. Na površini urotelija je malo SPC, prevladuje odluščena površina z izpostavljenimi NPC (puščice). Na površini urotelija ni prisotnih apoptotskih ali nekrotskih celic. SEM, povečava: x 832.

S SEM smo opazili, da luščenje ne sega v globino urotelija, saj so se zaradi prekinjanja tesnih stikov med površinskimi celicami odluščile le SPC in so se na odluščeni površini izpostavile NPC, ki so v intaktnem uroteliju vmesne celice (sliki 30 in 31).



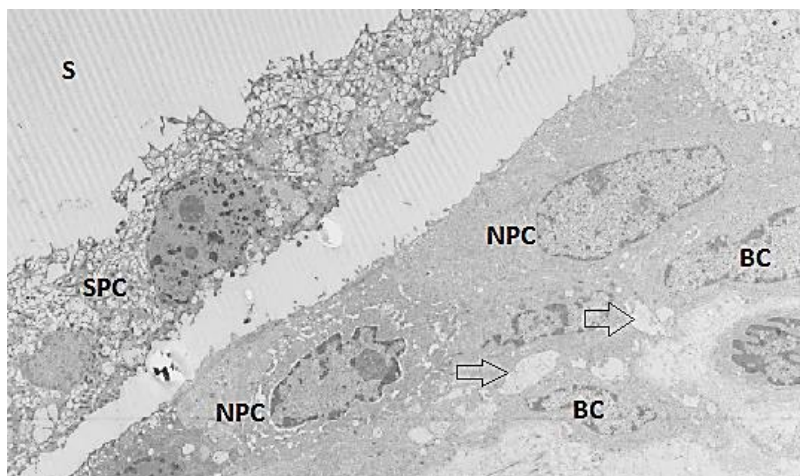
Slika 30: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T2 po 15- minutni izpostavitvi 0,01% PLL. Površina urotelija z izpostavljenimi NPC (označeno s pravokotnikom) kot posledica odluščenja SPC. SEM, povečava: x 855.



Slika 31: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T2 po 15- minutni izpostavitvi 0,01% PLL. Prekinjeni tesni stiki (puščica) in začetek luščenja posamezne SPC. NPC-nova površinska celica. SEM, povečava: x 4580.

S TEM smo preverjali, ali 0,01% PLL lušči tudi globlje ležeče urotelijske celice in na ta način povzroča tudi globlje poškodbe urotelija. Ugotovili smo, da se tudi s to koncentracijo PLL luščijo le površinske celice in da je odluščen urotelij dvoskladen. V notranjosti

dvoskladnega epitelijskega tkiva smo opazili prekinjene medcelične stike in zato povečane medcelične prostore tako med NPC kot med BC (slika 32).

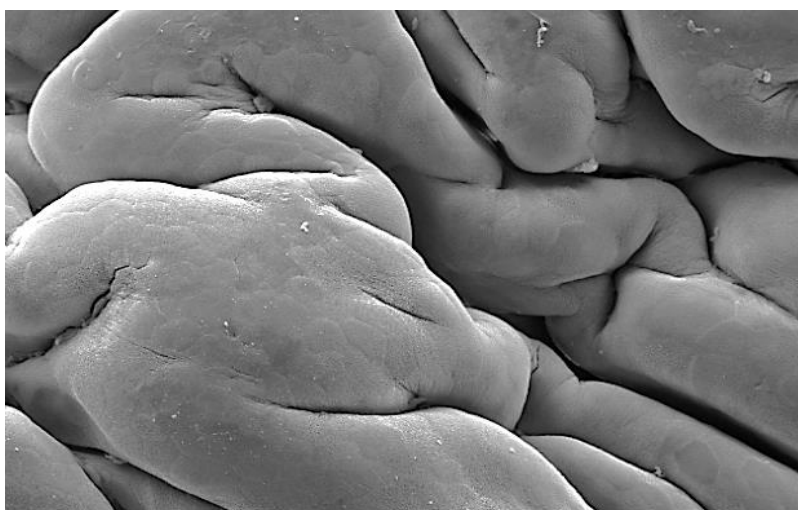


Slika 32: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T2 po 15- minutni izpostavitvi 0,01% PLL. Na sliki je predel dvoskladnega urotelija iz novih površinskih celic (NPC) in bazalnih celic (BC), v svetlini pa odluščena SPC. Med urotelijskimi celicami so vidni povečani medcelični prostori (*puščice*). TEM, povečava: x 1450.

4.2.3. Časovna točka T3

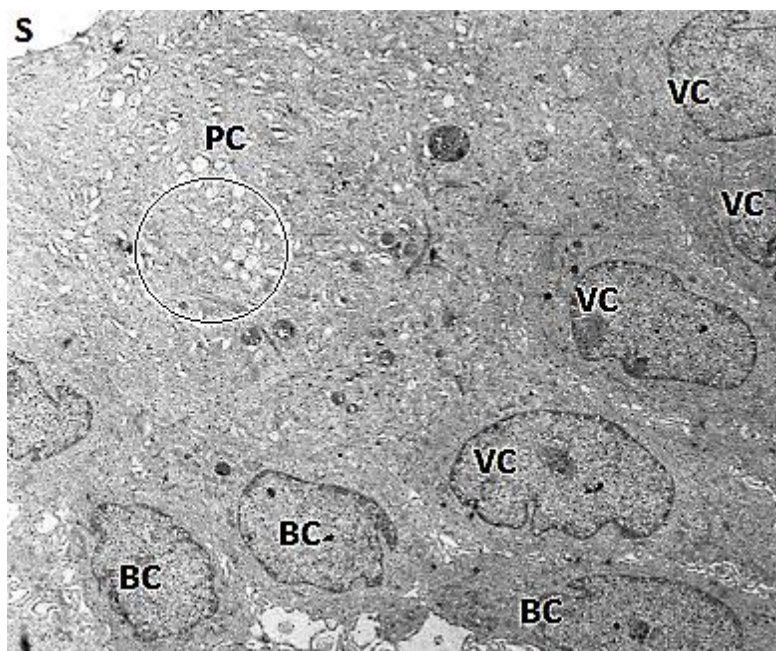
Kontrolni poskusi s PBS 6,5

V kontrolnih poskusih smo urotelij sečnega mehurja podgane najprej izpostavili PBS 6,5 za 15 min, nato pa za 315 min še PBS 7,4. S SEM smo opazili, da je v T3 površina urotelija intaktna, brez znakov luščenja, površinske celice so bile na visoki stopnji diferenciacije, tesni stiki med njimi so bili dobro razviti (slika 33).

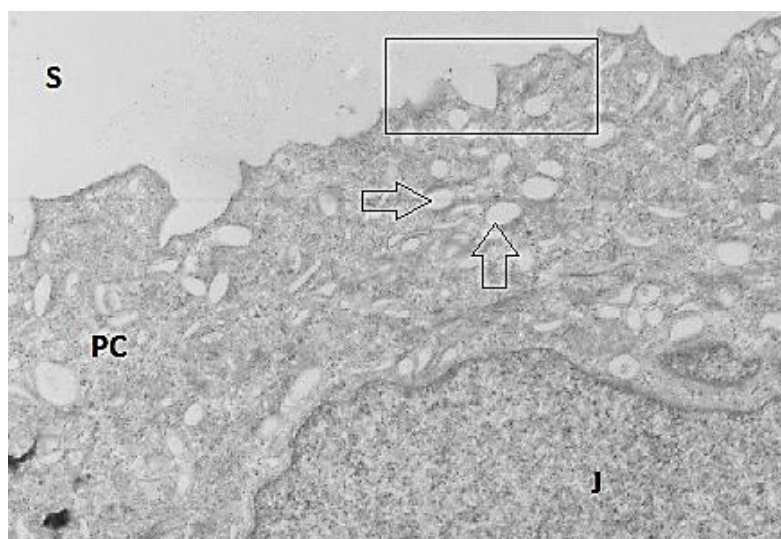


Slika 33: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T3 po 15- minutni izpostavitvi PBS 6,5. Površina urotelija je nepoškodovana, z dobro vidnimi mejami me površinskimi celicami. Luščenje urotelijskih celice ni prisotno. SEM, povečava: x 421.

S TEM smo potrdili, da je zgradba urotelija nespremenjena in da je urotelij triskladen in da ga gradijo velike površinske celice (PC) s številnimi fuziformnimi vezikli, vmesne celice (VC) in bazalne celice (BC), ki ležijo tik nad bazalno lamino (sliki 34 in 35).



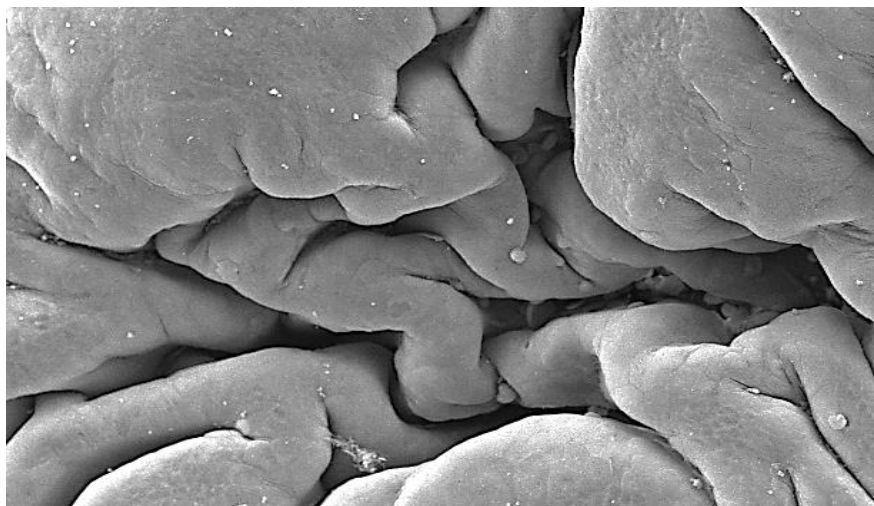
Slika 34: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T3 po 15- minutni izpostavitvi PBS 6,5. Urotelij je triskladen. Vidne so površinske celice (PC), ki imajo v citoplazmi številne fuziformne vezikle (označeno s krogom) in mejijo na svetlino mehurja (S). Pod PC ležijo vmesne celice (VC) in bazalne celice (BC). TEM, povečava: x 1450.



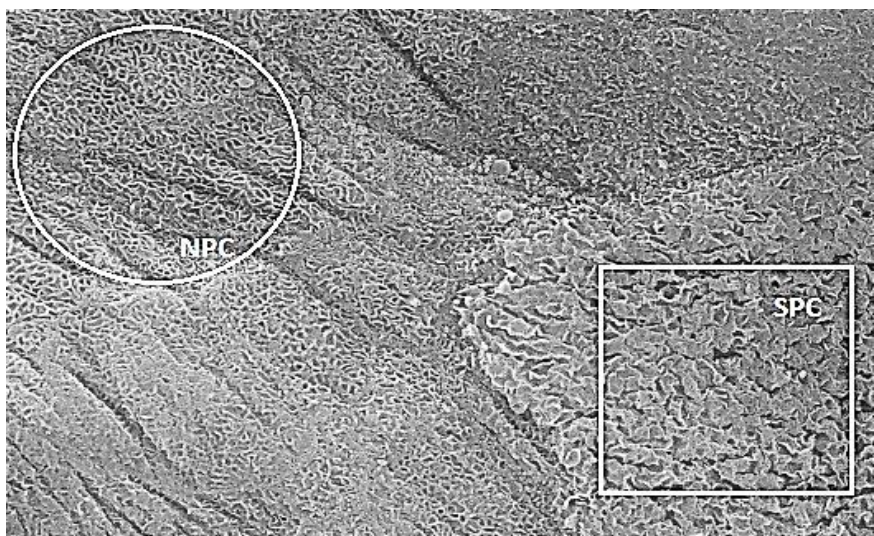
Slika 35: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T3 po 15- minutni izpostavitvi PBS 6,5. Del površinske celice (PC) z jedrom (J), značilno nazobčano apikalno plazmalemo s plaki (označeno s pravokotnikom) in številnimi fuziformnimi vezikli (puščici). TEM, povečava: x 5800.

Poskusi z 0,001% PLL

S SEM smo zasledili nepoškodovano površino urotelija, ki so jo gradile SPC, ki se niso odluščile in NPC, ki pa so bile na višji stopnji diferenciacije kot v časovni točki T2 takoj po luščenju. Apikalna plazmalema NPC je bila izoblikovana v sklenjene vrvičaste grebene, ponekod pa so se že pojavljali plaki in školjkasta nazobčanost, ki je značilna za visoko diferencirane površinske celice urotelija (sliki 36 in 37).

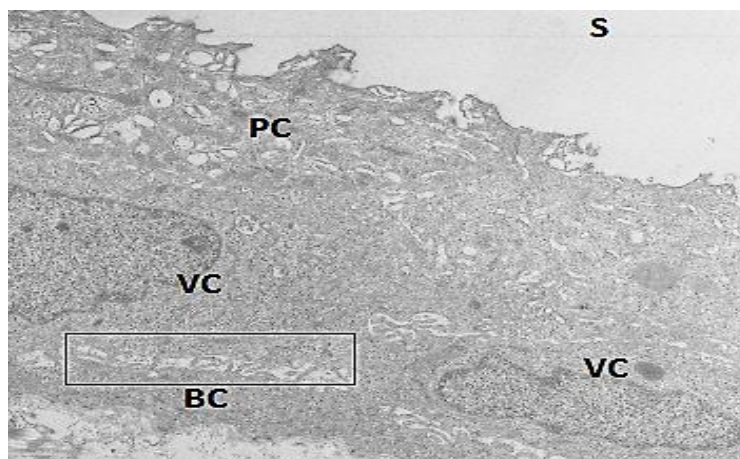


Slika 36: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T3 po 15- minutni izpostavitvi 0,001% PLL. Luščenja urotelijskih celic ni in površina urotelija je nepoškodovana. SEM, povečava: x 464.



Slika 37: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T3 po 15- minutni izpostavitvi 0,001% PLL. Površinske celice imajo različno izoblikovano apikalno plazmalemo, ker so na različnih stopnjah diferenciacije. Na površini NPC, ki še ni končno diferencirana, so sklenjeni vrvičasti grebeni (označeno s krogom), na površini končno diferencirane SPC pa je apikalna plazmalema značilnega, školjkasto nazobčanega videza (označeno s kvadratom). SEM, povečava: x 8560.

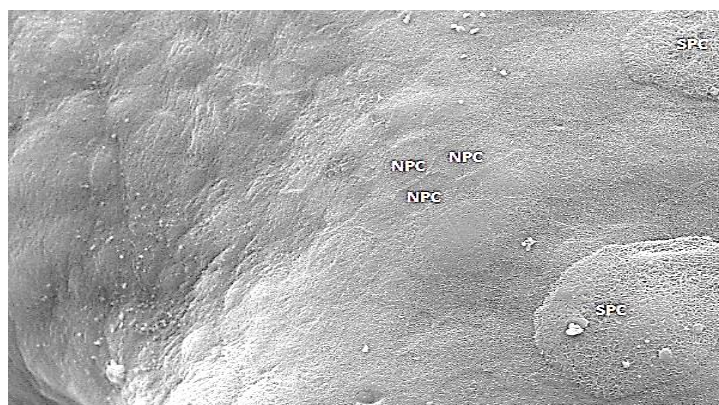
S TEM smo opazovali strukturo urotelija in stopnjo diferenciacije površinskih celic ter s tem posredno stopnjo regeneracije urotelija. Ugotovili smo, da je urotelij triskladen in da so površinske celice že na visoki stopnji diferenciacije. V notranjosti urotelija smo opazili rahlo povečane medcelične prostore med vsemi celicami zaradi šibkejših medceličnih stikov (slika 38).



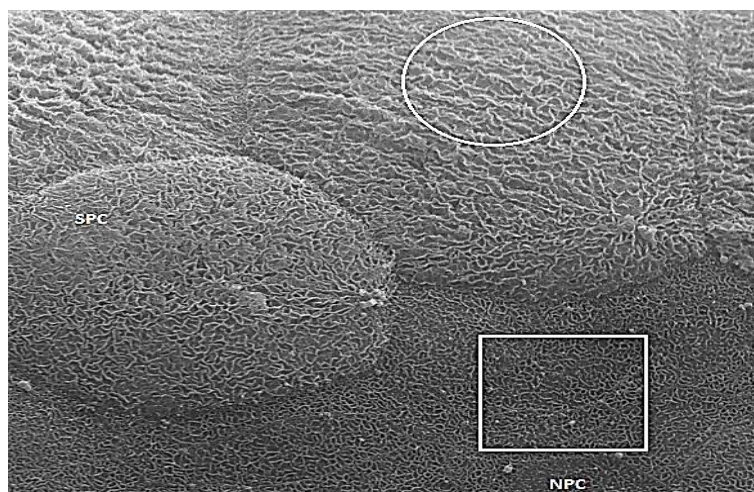
Slika 38: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T3 po 15- minutni izpostavitvi 0,001% PLL. Triskladni urotelij je sestavljen iz površinskih celic (PC), vmesnih celic (VC) in bazalnih celic (BC). Površinska celica na visoki stopnji diferenciacije z nazobčano apikalno plazmalemo in številnimi fuziformnimi vezikli. Med celicami so rahlo povečani medcelični prostori (označeno s pravokotnikom). TEM, povečava: x 2600.

Poskusi z 0,01% PLL

S SEM smo na površini urotelija opazili, da prevladujejo NPC, ki so bile na višji stopnji diferenciacije kot v časovni točki T2 po tretiranju s PLL. NPC so bile manjše od SPC, njihova apikalna plazmalema pa je bila izoblikovana v nesklenjene ali sklenjene vrvičaste grebene (sliki 39 in 40).

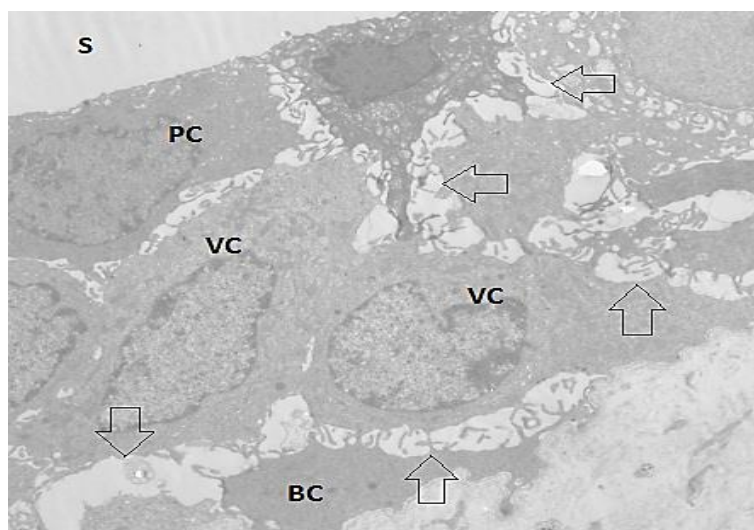


Slika 39: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T3 po 15- minutni izpostavitvi 0,01% PLL. Številne nove površinske celice (NPC), ki so manjše od starih površinskih celic (SPC) in z drugačno apikalno površino kot SPC. SEM, povečava: x 3300.



Slika 40: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T3 po 15- minutni izpostavitvi 0,01% PLL. Različne stopnje diferenciacije površinskih celic urotelija od končno diferencirane SPC s školjkasto nazobčano apikalno plazmalemo (označeno s krogom) do NPC na nižji stopnji diferenciacije s sklenjenimi in nesklenjenimi vrvičastimi grebeni na površini NPC (označeno s kvadratom). SEM, povečava: x 9310.

S TEM smo proučevali zgradbo urotelija ter stopnjo diferenciacije površinskih celic, da bi posredno ugotovili stopnjo regeneracije urotelija. Urotelij je ponovno triskladen, vendar so površinske celice na nižji stopnji diferenciacije kot v časovni točki T3 v poskusih z 0,001% PLL. Kljub obnovljeni zgradbi urotelija smo med vsemi celicami opazili močno povečane medcelične prostore kot posledico šibkih ali prekinjenih medceličnih stikov (slika 41).



Slika 41: Urotelij sečnega mehurja podgane *ex vivo* v T3 po 15- minutni izpostavitvi 0,01% PLL. Triskladni urotelij sestavljen iz PC, VC in BC. Zelo razširjeni medcelični prostori med vsemi urotelijskimi celicami (puščice). TEM, povečava: x 1950.

5. RAZPRAVA

Sečni mehur sesalcev ima nekatere edinstvene anatomske lastnosti, ki ustvarjajo učinkovito bariero za prehajanje toksičnih snovi iz urina v kri. Odlične barierne lastnosti zagotavlja specifična zgradba urotelija, ki je sestavljen iz treh celičnih skladov in sicer bazalnih celic, ki ležijo tik ob bazalni lamini, vmesnih celic in velikih površinskih celice. Te celice imajo apikalno membrano značilno nagubano in oblikovano v plake, kar preprečuje transcelularni transport ter omogoča prilagajanje površine urotelija polnjenju in praznjenju mehurja. Barierna funkcija urotelija je povezana tudi s tesnimi stiki med površinskimi celicami in s plastjo glikozamonoglikanov na luminalni površini (5). Nekateri bolezni sečnega mehurja kot npr. bakterijski cistitis in površinski rak sečnega mehurja ne moremo vedno uspešno pozdraviti s sistemsko terapijo, zato se v ta namen uporablja intravezikalna dostava zdravilnih učinkovin, pri kateri s pomočjo katetra apliciramo visoke koncentracije učinkovine direktno v sečni mehur (55). Za zdravljenje bakterijskega cistitisa in površinskega raka sečnega mehurja se uporabljajo različna luščilna sredstva, npr. targetin, mitomicin C in hitosan (na živalskih modelih), s čimer se odluščijo iz urotelija rakave celice oz. celice z namnoženimi bakterijami, ki so zaščitene pred delovanjem protimikrobnih učinkovin in so glavni vir ponavljajočih okužb (21, 22, 25). V fizioloških pogojih se urotelij počasi obnavlja, saj ima nizko proliferacijsko aktivnost. V primeru inducirane luščenja se proliferacijska aktivnost urotelija poveča, zato je obnova tkiva hitra in učinkovita (27).

V naši raziskavi smo želeli dokazati luščilno delovanje PLL *ex vivo* na sečnih mehurjih podgan ter obnovitveno sposobnost urotelija po odstranitvi PLL s površine tkiva. PLL je kationski biorazgradljiv polimer, ki ima zaradi protoniranih amino skupin pozitiven naboj v širokem pH območju (31). Na podlagi različnih študij sklepamo, da se PLL podobno kot ostali polikationi (hitosan, poli-L-arginin) zaradi pozitivnega naboja veže na negativno nabite površine celic ter povzroča prekinjanje tesnih stikov med njimi in s tem poveča prepustnost tkiva (24, 39, 40, 42, 43). V naši nalogi smo želeli ugotoviti optimalne pogoje za luščilno delovanje PLL, zato smo pri poskusih spreminjali čas delovanja PLL na tkivo (15 ali 30 minut) ter koncentracijo (0,01% in 0,001%) in MM PLL (30-70 kDa, 70-150 kDa). Prepustnost stene sečnega mehurja pod vplivom PLL smo vrednotili z metodo merjenja TEU *ex vivo* v dvoprostorskih difuzijskih celicah *EasyMountTM*. Za merjenje TEU smo sečne mehurje podgan prepolovili in vsako polovico vpeli v samostojno difuzijsko

celico. Pri tem smo ugotovili, da se upornost enega sečnega mehurja podgane lahko zelo razlikuje od upornosti sečnega mehurja druge podgane. Opazili smo tudi razlike v TEU med eno in drugo polovico istega sečnega mehurja. Vrednosti so se gibale med 50 in 500 Ωcm^2 , zato smo izmerjene absolutne vrednosti TEU preračunali v relativne vrednosti, da smo lahko primerjali podatke med seboj. Problem nizkih začetnih absolutnih vrednostih TEU je v tem, da so imele te bistveno manjši razpon za padec vrednosti TEU. Pri merjenju TEU smo zato izločili nekatere meritve, kjer je imelo tkivo že na začetku zelo nizke vrednosti TEU ($<50 \Omega\text{cm}^2$). Iz literature je znano, da so vrednosti TEU urotelija v fizioloških pogojih nekaj 1000 do nekaj 10.000 Ωcm^2 (5, 6), v naših poskusih pa smo izmerili upornosti stene sečnih mehurjev, ki so znašale nekaj 100 Ωcm^2 . Domnevamo, da je do nižjih vrednosti TEU prišlo zato, ker je bilo tkivo v fazi priprave podvrženo stresnim dejavnikom, kot sta razrez in menjava okolja. V fazi predinkubacije in inkubacije smo sečne mehurje navajali na pogoje *ex vivo* testiranja, zato smo jih inkubirali v PBS s pH 7,4 segretem na 37 °C, da smo se čim bolj približali fizioloških pogojem. V obdobju predinkubacije so vrednosti TEU naraščale, kar pomeni, da so bili izbrani pogoji ugodni za tkivo. Poleg tega je bila površina tkiva, ki je bila v naših poskusih v stiku z donorsko raztopino, zelo majhna (0,0707 cm^2), kar bi tudi lahko bil vzrok za dobljene vrednosti TEU, a smo bili pri izbiri nastavka za tkivo omejeni z velikostjo sečnega mehurja. Po delovanju PLL smo pričakovali padec TEU, ki bi dokazal luščilno delovanje PLL in posledično večjo prepustnost oz. manjšo upornost urotelija. Po odstranitvi PLL pa smo pričakovali dvig vrednosti TEU, kar bi pomenilo, da se je urotelij uspešno obnavljal v pogojih *ex vivo*.

Na podlagi rezultatov meritev TEU smo pri izbranih pogojih analizirali tudi strukturo urotelija s presevnim (TEM) in vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) in sicer v treh izbranih časovnih točkah (T1, T2, T3). Časovna točka T1 je v naših poskusih predstavljala čas po končani 30- minutni predinkubaciji, T2 čas po končanem delovanju PLL na tkivo, časovna točka T3 pa je označevala čas po končanem obdobju regeneracije tkiva ter hkrati konec poskusov. Površino urotelija smo opazovali s SEM, ultrastrukturo tkiva pa s TEM.

S kontrolnimi meritvami TEU smo želeli dokazati, da medij, v katerem smo raztapljali PLL in medij, ki smo ga uporabili v obdobju predinkubacije in regeneracije, ne vplivata na barierno funkcijo stene sečnih mehurjev podgan. Pri merjenju TEU smo sečne mehurje v difuzijskih celicah še pred izpostavitvijo PLL 30 min inkubirali v PBS s pH 7,4, da se je

tkivo navadilo na pogoje testiranja. Nato je sledilo 30 minutno obdobje predinkubacije v katerem pa smo že merili vrednosti TEU. PBS s pH 7,4 smo uporabili na donorski strani tudi v obdobju regeneracije tkiva po končanem tretiranju s PLL. Ugotovili smo, da so vrednosti TEU v času predinkubacije in regeneracije ves čas naraščale, torej PBS 7,4 ni vplival na zmanjšanje upornosti urotelija (preglednica I in II, sliki 8 in 9). Z elektronsko mikroskopsko analizo smo tkivo tudi morfološko analizirali v časovni točki T1 in T3. S SEM smo ugotovili, da je bila površina urotelija v obeh časovnih točkah homogene strukture, brez luščenja urotelijskih celic, površinske celice so bile na visoki stopnji diferenciacije in tesni stiki med njimi niso bili prekinjeni (slike 22, 23, 33). S TEM smo potrdili, da je bil urotelij v T1 in T3 intakten in enake strukture kot *in vivo* (slika 34).

Za pripravo raztopin PLL smo uporabili PBS s pH 6,5, za katerega smo se odločili na podlagi topnosti in stopnje ionizacije PLL, fizioloških pogojev v sečnem mehurju in rezultatov predhodnih študij (31, 32, 34, 47, 50). V kontrolnih poskusih smo ugotovili, da so vrednosti TEU pri 15 in 30- minutni izpostavitvi tkiva PBS 6,5 ves čas poskusa počasi naraščale. Vrednosti TEU so nekoliko padle le ob menjavi pufrov (za največ 12%), kar je verjetno posledica trenutne spremembe pogojev na površini stene sečnega mehurja med samim procesom menjave raztopin na donorski strani difuzijske celice. Sam PBS 6,5 torej ne zmanjša upornosti urotelija (preglednici I in II, sliki 8 in 9). Tkivo smo po 15- minutni izpostavitvi PBS 6,5 ovrednotili tudi morfološko z elektronsko mikroskopsko analizo v časovni točki T2. Površina urotelija po pregledu s SEM je bila nepoškodovana in homogene strukture, tesni stiki med površinskimi celicami so bili dobro razviti in niso bili prekinjeni (slika 24). Na osnovi meritev TEU in elektronske mikroskopske analize tkiva lahko zaključimo, da PBS 7,4 in PBS 6,5 nista imela vpliva na bariero in strukturo urotelija. Tako smo tudi dokazali, da smo izbrali ustrezne puferske raztopine za poskuse v dvoprostorskih difuzijskih celicah.

V predhodnih raziskavah je številnim raziskovalcem uspelo dokazati vezavo PLL na negativno nabite površine različnih epitelijev in celičnih linij. Ugotovljeno je bilo protitumorsko in protimikrobno delovanje PLL ter pospeševanje absorpcije zdravilnih učinkovin. V literaturi je tudi opisano delovanje PLL na tesne stike in povečano prepustnost celičnih membran (31, 34, 36, 41, 45, 48), a mehanizem delovanja kationskih polimerov še ni popolnoma pojasnjen. Predvidevajo, da lahko različna MM, koncentracija in strukturna konformacija molekule PLL vplivajo na gostoto naboja kar lahko vpliva na

integriteto celičnih membran in posledično na prepustnost (42, 43, 44). Bolj natančen mehanizem odpiranja tesnih stikov so do sedaj pojasnili le pri delovanju hitosana na celičnih linijah Caco-2. *In vitro* raziskava je pokazala vezavo hitosana na integrinske receptorje v apikalni celični membrani, kar sproži kaskado reakcij in povzroči fosforilacijo tirozinskih kinaz, ki nato preko drugih signalnih molekul vplivajo na prekinitev tesnih stikov med celicami (56).

Pri vrednotenju rezultatov smo se opirali tudi na podobne raziskave, ki so jih naredili z drugimi polikationskimi polimeri. Poli-L-arginin prav tako kot PLL sodi med aminokislinske polimere in se uporablja v farmaciji kot pomožno snov za povečevanje absorpcije zdravilnih učinkovin ter kot bioadhezivno sredstvo. Tudi PLA se kot polikation veže na negativno nabito površino sluznic, s čimer lahko izboljša prehod zdravilnih učinkovin z delovanjem na tesne stike in povečanjem prepustnosti celičnih membran (38, 39, 40). Tudi kationski polimer hitosan so preizkušali v študijah *ex vivo* ter *in vivo* in ugotavljali vpliv časa tretiranja in koncentracije hitosana na različne epitelije. V eni od raziskav so ugotovili, da hitosan učinkovito in kontrolirano odlušči urotelij sečnega mehurja podgan v odvisnosti od njegove koncentracije in časa delovanja (10).

Iz naših rezultatov je razvidno, da čas tretiranja tkiva ter koncentracija in MM PLL vplivata na vrednosti TEU stene sečnega mehurja. Najprej smo ugotavljali vpliv MM, pri čemer smo urotelij izpostavili 0,01% PLL MM 30-70 kDa in 70-150 kDa za 15 ali 30 min (sliki 16 in 17). Pri 15- minutnem tretiranju smo opazili podoben učinek višje in nižje MM PLL, saj je v obeh primerih vrednost TEU po delovanju PLL padla za približno 70% vrednosti. Do razlike je prišlo v času regeneracije, saj je povprečna vrednost TEU pri PLL z višjo MM dosegla vrednosti kontrole že v 160 min, medtem ko se je pri PLL z nižjo MM vrednosti kontrole le približala v 280 minuti. V primeru 30 minutnega delovanja je vrednost TEU po delovanju PLL z višjo in nižjo MM padla za približno 65%. Do razlik je zopet prišlo v času regeneracije, ko je pri PLL z nižjo MM povprečna vrednost TEU dosegla vrednosti kontrole v 240 min, po delovanju PLL z višjo MM pa v 320 min. Regeneracija je torej potekala hitreje po delovanju PLL z nižjo MM, kar je ravno obratno kot pri 15 min tretiraju tkiva. Sklepamo lahko, da je bilo delovanje PLL v času tretiranja z nižjo in višjo MM podobno, v času regeneracije pa je obnova urotelija potekala različno hitro, vendar je bila v obeh primerih uspešna. V literaturi smo zasledili veliko študij, v katerih so ugotovili vpliv MM polikationskih polimerov na prepustnost različnih epitelijev

(41, 42, 45, 48). Na Caco-2 celični liniji so ugotovili, da je bil PLL z majhno MM (30 kDa) in 0,01% koncentracijo pri povečanju paracelularnega prehajanja enako učinkovit kot PLL z visoko MM (300 kDa) pri petkrat nižji koncentraciji (0,002%) (42). Symonds P. v svoji raziskavi ugotavlja, da PLL z večjo MM (27,4 kDa) bolj poveča prepustnost celičnih membran in povzroči večji odstotek sproščenega citokroma iz različnih celičnih linij, kot PLL z manjšo MM (2,9 kDa) (45). Arnold in sodelavci so ovrednotili citotoksični učinek PLL pri različnih MM (13, 35, 60 in 70 kDa) in ugotovili, da ta pada skupaj z manjšanjem MM (48). Pri merjenju TEU endotelijskih celic govejih pljuč so ugotovili, da PLL in PLA z MM večjo od 11 kDa zmanjšajo prepustnost endotelija za približno 70%. PLL z MM 7,3 kDa in monomeri arginina in lizina niso vplivali na vrednosti TEU pljučnega endotelija (41). Na podlagi naših rezultatov merjenja TEU torej ne moremo trditi, kakšen vpliv ima različna MM PLL na prepustnost urotelija. Lahko da je bila razlika med obema MM PLL, ki smo ju uporabili v raziskavi, premajhna, da bi lahko imela značilno različen vpliv na prepustnost stene sečnega mehurja.

Ugotavljali smo tudi vpliv časa izpostavitve tkiva PLL na vrednosti TEU oz. na prepustnost stene sečnega mehurja. Primerjali smo 15- in 30- minutno tretiranje urotelija z 0,01% PLL (30-70 kDa in 70-150 kDa) (slika 18 in 19). Pri nižji MM smo ugotovili, da je 15- minutno delovanje PLL zmanjšalo povprečno vrednost TEU na najmanj 27% in to že takoj po izpostavitvi tkiva PLL in se tekom 15- minutnega delovanja ni bistveno spremenila. Pri 30- minutnem delovanju PLL enake MM je vrednost TEU takoj po izpostavitvi tkiva PLL padla na 36% in tekom časa tretiranja postopoma padala na najmanj 28% vrednosti. V času regeneracije je povprečna vrednost TEU po 15- minutnem delovanju PLL skoraj dosegla vrednosti kontrole v 280 minuti, po 30- minutnem delovanju pa je dosegla vrednosti kontrole v 240 min. Pri višji MM PLL je povprečna vrednosti TEU pri 15- minutnem delovanju takoj po izpostavitvi tkiva PLL padla na 33% vrednosti in tekom časa tretiranja padla na najmanj 26%. Pri 30- minutnem delovanju PLL so bile vrednosti TEU zelo podobne tistim po 15- minutnem tretiranju, saj je povprečna vrednost TEU takoj po delovanju PLL padla na 34% in tekom časa tretiranja postopoma padala do 22% vrednosti. V času regeneracije je povprečna vrednost TEU prej dosegle vrednosti kontrole po 15- minutnem delovanju PLL (160 min) kot po 30- minutnem delovanju PLL (320 min).

Pri obeh testiranih časih je PLL pričakovano zmanjšal TEU stene sečnega mehurja, v obdobju regeneracije pa so se vrednosti TEU približale ali vrnile na vrednosti kontrole. Različen čas izpostavitve tkiva PLL ni bistveno vplival na zmanjšanje prepustnosti stene sečnega mehurja v obdobje tretiranja. Deloma je bila vidna razlika v hitrosti regeneracije, a vpliv ni bil enoten. Pri nižji MM je regeneracija TEU potekla hitreje pri 30-min tretiranju, pri višji MM pa pri 15-min tretiranju. Z našimi poskusi torej nismo ugotovili pomembne razlike v vrednostih TEU glede na čas delovanja PLL za razliko od raziskav s hitosanom, kjer je imel čas ključno vlogo pri delovanju hitosana na urotelij sečnega mehurja podgan. Pri poskusih z 0,5% in 0,05% disperzijo hitosana se je urotelij uspešno regeneriral le v primeru 15- minutnega delovanja. Po 30 in 60 minutah delovanja hitosana se vrednosti TEU niso vrnile na začetne vrednosti (100%) (10, 25).

Pri pregledu literature smo ugotovili pomemben vpliv koncentracije polikationskih polimerov pri delovanju na tesne stike celic in prepustnost celičnih membran, zato smo z merjenjem TEU ugotavljali tudi vpliv koncentracije PLL na prepustnost urotelija. Uporabili smo 0,01% PLL in 0,001% PLL z MM 30-70 kDa (sliki 20 in 21). Vpliv koncentracije PLL smo vrednotili pri delovanju PLL v dveh časovnih obdobjih. Po 15- minutnem delovanju PLL z višjo koncentracijo je povprečna vrednost TEU padla za dobrih 70%, medtem, ko je povprečna vrednost TEU po delovanju nižje koncentracije padla le za dobrih 40%. V času regeneracije je povprečna vrednost TEU po delovanju nižje koncentracije prej dosegla vrednosti kontrole (120 min), po delovanju višje koncentracije se je povprečna vrednost TEU približala vrednosti kontrole v 280 min. Na podlagi rezultatov lahko rečemo, da je v primeru 15- minutnega tretiranja višja koncentracija PLL povzročila večjo prepustnost urotelija in posledično je bila njegova regeneracija počasnejša. Po 30- minutnem delovanju je povprečna vrednost TEU v primeru višje koncentracije PLL hitro padla za 70% vrednosti in se tekom obdobja tretiranja ni veliko znižala. Pri nižji koncentraciji PLL je povprečna vrednost TEU najprej padla za dobrih 50%, vendar je do konca obdobja tretiranja padla na skoraj enako vrednost kot pri tretiranju z višjo koncentracijo (za 69 %). V obdobju regeneracije se je tkivo v primeru obeh uporabljenih koncentracij obnovilo enako uspešno in sicer sta obe povprečni vrednosti TEU dosegli vrednosti kontrole v 240 minuti. Rezultati po 30- minutnem tretiranju niso pokazali razlik v delovanju višje in nižje koncentracije PLL. Regeneracija urotelija je bila enako uspešna po delovanju obeh koncentracij.

Ugotovljene razlike po 15- minutnem delovanju PLL z višjo in nižjo koncentracijo lahko povežemo z izsledki iz literature, kjer so ugotavljali vpliv koncentracije različnih polikationov na prepustnost celičnih linij in epitelijev (39, 41, 48). V raziskavi na izoliranem tkivu zajčjega nosnega epitelija so ugotovili, da se je permeabilnostni koeficient za fluorescentno označeni dekstrana MM 4,4 kDa povečal z večanjem koncentracije PLA v primerjavi s kontrolo in sorazmerno se je nižala vrednost TEU (39). Na HeLa človeških celičnih linijah se je PLL z MM 35 kDa pri koncentraciji 25 µg/ml izkazal za manj citotoksičnega, kot PLL s koncentracijo 50 µg/ml ali 75 µg/ml (48).

Rezultati merjenja TEU so nam dali iztočnico za morfološko analizo urotelija sečnih mehurjev podgan *ex vivo*. Za morfološko analizo tkiva smo izbrali poskuse s 15- minutnim delovanjem z 0,01% in 0,001% PLL z MM 30-70 kDa. Meritve TEU namreč niso pokazale značilnih razlik v vrednostih TEU niti med obema MM PLL niti v 15- oz. 30- minutnem delovanju PLL. Največja razlika v vrednostih TEU se je pokazala med obema koncentracijama PLL.

Po delovanju nižje koncentracije PLL smo s SEM v časovni točki T2 (slika 25) ugotovili, da je PLL povzročil luščenje manjših predelov urotelija oz. ponekod luščenje le posameznih površinskih celic. Površinsko luščenje urotelija po delovanju PLL ni bilo množično, zato smo opazili tudi večje predele urotelija, kjer so še bile pritrjene stare površinske celice. Analiza s TEM nam je pokazala, da je PLL deloval tudi v globino urotelija, kar je bilo presenetljivo glede na predhodno analizo s SEM, kjer smo ugotovili luščenje po površini, brez vidnih globljih poškodb urotelija. S TEM smo ugotovili, da je urotelij dvoskladen, torej je PLL odluščil površinske celice, kar smo ugotovili že s SEM. Vendar smo med posameznimi celicami opazili nekoliko razširjene medcelične prostore, kar pomeni, da je PLL ponekod deloval tudi na prekinjanje medceličnih stikov v globljih plasteh urotelija (slika 28).

V primeru višje koncentracije PLL smo s SEM v T2 (slika 29 in 30) ugotovili, da je bil velik del površine urotelija odluščen in smo zato zasledili le posamezne stare površinske celice. S TEM smo potrdili, da je bil urotelij dvoskladen, vendar pa je PLL deloval tudi v globino urotelija, saj smo opazili veliko razširjenih medceličnih prostorov med bazalnimi in novimi površinskimi celicami (slika 32).

Morfološka analiza urotelija v časovni točki T2 je torej pokazala, da je bilo po delovanju PLL pri obeh koncentracijah inducirano luščenje le površinskih celic, vendar je bilo pri

nižji koncentraciji PLL luščenje manj obsežno kot pri višji koncentraciji PLL. Analiza s TEM je razkrila, da je PLL deloval tudi v globino in prekinjal medcelične stike tudi med bazalnimi celicami, kar po analizi s SEM nismo pričakovali. V različnih literaturnih virih smo zasledili, da se PLL »veže« na površino celic oz. sluznic, ki imajo negativni naboj in zato posledično še izboljša oz. olajša pritrnitev bakterijskih ali rakavih celic na površino tkiva (49, 50). Z elektronsko mikroskopsko analizo urotelija sečnega mehurja podgan v *ex vivo* pogojih lahko trdimo, da nismo opazili »vezave« PLL na površino urotelija, temveč smo nedvoumno dokazali, da PLL deluje luščilno na urotelijske celice.

V časovni točki T3 smo analizirali obnovo urotelija po delovanju obeh koncentracij PLL in primerjali slike s kontrolnimi poskusi. Po delovanju nižje koncentracije PLL smo s SEM ugotovili, da je bila površina urotelija nepoškodovana in brez luščenja, pri manjši povečavi zelo podobna površini urotelija v kontrolnem poskusu (slika 36). Pri večji povečavi pa smo opazili različno velike površinske celice, ki so bile na različnih stopnjah diferenciacije, zato smo na podlagi analize s SEM sklepali, da je obnova urotelija v pogojih *ex vivo* potekla, vendar diferenciacija novih površinskih celic še ni dosegla končne stopnje (slika 37). Analiza urotelija s TEM je potrdila regeneracijo urotelija po delovanju manjše koncentracije PLL, saj je bil urotelij v T3 ponovno triskladen. Tudi ob koncu regeneracije smo še ponekod opazili rahlo povečane medcelične prostore, vendar so bili ti manjši kot v časovni točki T2 (slika 38). Po delovanju PLL z višjo koncentracijo smo s SEM v T3 ugotovili, da so bile na površini urotelija vidne predvsem nove površinske celice (slika 39). Te so bile manjše in na nižji stopnji diferenciacije (slika 40) kot površinske celice v T3 po delovanju nižje koncentracije PLL. Kljub temu lahko na osnovi rezultatov analize s SEM trdimo, da je obnova urotelija v pogojih *ex vivo* tudi po delovanju višje koncentracije PLL potekala, saj so bile nove površinske celice na višji stopnji diferenciacije kot v T2. S TEM smo v T3 proučili zgradbo urotelija in stopnjo diferenciacije površinskih celic in ugotovili, da je urotelij ponovno triskladen, površinske celice pa so bile na nižji diferenciacijski stopnji kot v T3 po delovanju PLL nižje koncentracije. Vendar pa zaradi ponovne vzpostavitve triskladnega urotelija lahko trdimo, da je obnova urotelija potekala (slika 42).

Namen naše magistrske naloge je bil, da ugotovimo vpliv PLL na barierno funkcijo urotelija sečnega mehurja podgan v pogojih *ex vivo* in poiščemo dejavnike za optimalno delovanje PLL glede na čas tretiranja, MM in koncentracijo PLL. S pomočjo merjenja TEU in elektronsko mikroskopsko analizo lahko trdimo, da PLL prekinja medcelične stike

med urotelijskimi celicami in torej deluje luščilno na urotelij. Obnova urotelija po induciranjem luščenju s PLL je v pogojih *ex vivo* potekla, saj smo zasledili znake povečane proliferacije in napredujoče diferenciacije urotelijskih celic. Čas delovanja in MM PLL nista bistveno vplivala na porušitev in kasnejšo ponovno vzpostavitev barierne funkcije urotelija. Dokazali pa smo, da je vpliv PLL na barierno funkcijo urotelija odvisen od koncentracije. PLL višje koncentracije je bolj povečal prepustnost urotelija in povzročil bolj obsežno luščenje površinskih celic. PLL z manjšo koncentracijo je tudi povečal prepustnost urotelija, vendar je bilo luščenje manj obsežno. Obnova urotelija v pogojih *ex vivo* je v obeh primerih potekla, vendar pa je po delovanju PLL z višjo koncentracijo pričakovano dosegla nižjo stopnjo kot po delovanju PLL z nižjo koncentracijo.

Dokazali smo, da je 0,01% PLL z MM 30-70 kDa učinkovito in varno luščilno sredstvo za urotelij že po 15 minutah delovanja. Rezultati nakazujejo možnost uporabe PLL kot pomožnega terapevtskega sredstva, ki bi v prihodnosti nadomestil toksični targesin ali predstavljal dobro alternativo mitomicinu C. Seveda pa bi bilo potrebno rezultate naših poskusov v pogojih *ex vivo* potrditi in nadgraditi še s poskusi na živalskih modelih *in vivo*.

6. SKLEP

Z merjenjem TEU in elektronsko mikroskopsko analizo urotelija sečnega mehurja podgan v pogojih *ex vivo* smo ugotovili:

- V pogojih *ex vivo* je PLL pri obeh preizkušeni molekularni masi, koncentraciji ali časih tretiranja tkiva povečal prepustnost stene sečnega mehurja podgan. Povečana prepustnost je posledica prekinjanja medceličnih stikov med urotelijskimi celicami in luščilnega delovanja na urotelij sečnega mehurja podgan.
- Obnova urotelija po inducirani luščenju s PLL je v pogojih *ex vivo* potekla v vseh poskusih, saj smo zasledili znake povečane proliferacije in napredujoče diferenciacije urotelijskih celic. V obdobju regeneracije so se vrednosti TEU približale ali celo presegle vrednosti kontrole.
- Različna molekularna masa PLL (30-70 kDa in 70-150 kDa) ter čas tretiranja urotelija s PLL (15 in 30 min) niso bistveno vplivali na zmanjšanje prepustnosti stene sečnega mehurja v obdobje tretiranja.
- Dokazali smo, da je vpliv PLL na barierno funkcijo urotelija odvisen od koncentracije PLL. Po 15- minutnem delovanju je 0,01% PLL bolj povečal prepustnost urotelija, deloval na medcelične stike v globljih plasteh urotelija in povzročil obsežnejše luščenje površinskih celic kot 0,001% PLL. Obnova urotelija v pogojih *ex vivo* je v obeh primerih potekla, vendar pa je po delovanju PLL z nižjo koncentracijo pričakovano dosegla višjo stopnjo kot po delovanju PLL z višjo koncentracijo.
- 0,01% PLL z MM 30-70 kDa se je izkazal za optimalno luščilno sredstvo, saj v 15 minutah učinkovito odlušči le površinsko plast urotelija brez globokih poškodb urotelija, zato se lahko urotelij hitro začne obnavljati, tudi v pogojih *ex vivo*.

7. LITERATURA

1. Eroschenko PV: diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations, 10th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005: 324-327.
2. Pleskovič ZR, Dahmane GR, Živin MA: Histologija, Univerza v Ljubljani, Visoka šola za zdravstvo, Ljubljana, 2006: 57-60.
3. Martinčič ŠD, Cör A, Cvetko E, Marš T: Anatomija, histologija in fiziologija, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2007: 144, 145.
4. Mescher AL: Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition, McGraw Hill Professional, ZDA, 2009: 332-348.
5. Lewis SA: Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278(6): F867-F874.
6. Kreft ME, Hudoklin S, Jezernik K, et al.: Formation and maintenance of blood – urine barrier in urothelium. *Protoplasma* 2010; 246(1): 3-14.
7. Hicks RM: The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1975; 50(6): 215-246.
8. Podobnik B: Povečanje permeabilnosti stene sečnega mehurja prašiča s hitosanom in vpliv kalcijevih ionov, Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2005
9. Stabellini G, Calastrini C, Gilli P, Bedani PL: Urinary glycosaminoglycans in recurrent urinary tract infections in kidney transplant patients. *Biomed Pharmacother.* 1999; 53(5-6): 274-277.
10. Veranič P, Erman A, Kerec-Kos M et al.: Rapid differentiation of superficial urothelial cells after chitosan-induced desquamation. *Histochem Cell Biol* 2009; 131(1): 129-139.
11. Kerec M, Bogataj M, Veranič P, et al.: Permeability of pig urinary bladder wall: the effect of chitosan and the role of calcium. *Eur J Pharm Sci* 2005; 25(1): 113-121.
12. Žakelj S: Permeabilnost nekaterih spojin skozi tanko črevo podgane v različnih pogojih »in vitro«. Doktorska disertacija 2006; Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.
13. He L, Yin Y, Li T, Huang R, Xie M, Wu Z, Wu G: Use of the Ussing chamber technique to study nutrient transport by epithelial tissues. *Frontiers in Bioscience* 2013; 18(4): 1266-1274.

14. Ussing HH, Zerahn K: Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circulated isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 1950; 23: 110-127.
15. Grass GM, Sweetana SA: In vitro measurement of gastrointestinal tissue permeability using a new diffusion cell. *Pharm Res.* 1988; 5(6): 372-376.
16. Edwards MJ: Apoptosis, the heat shock response, hyperthermia, birth defects, disease and cancer. Where are the common links? *Cell Stress Chaperones* 1998; 3(4): 213-220.
17. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* 1980; 68: 251-306.
18. Jezernik K, Veranič P, Sterle M: Celična biologija, Učbenik za študente Medicinske fakultete, DZS, Ljubljana, 2012: 189-191.
19. Jezernik K, Sterle M: Differentiation of superficial cells of urinary bladder epithelium during pre- and postnatal development of the mouse. *Periodicum Biologorum* 1992; 94(2): 127-132.
20. Erman A, Zupančič D, Jezernik K: Apoptosis and desquamation of urothelial cells in tissue remodeling during rat postnatal development. *J Histoche Cytochem* 2009; 57(8): 721-730.
21. Veranič P: Uropatogena *Escherichia coli* – priložnostni znotrajcelični parazit. *Med razgledi* 2008; 47(3): 251-257.
22. Verweij J, Pinedo HM: Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations. *Anticancer Drugs* 1990; 1(1): 5-14.
23. Di Stasi SM, Giannantoni A, Stephen RL, et al.: Intravesical electromotive mitomycin C versus passive transport mitomycin C for high risk superficial bladder cancer: A prospective randomized study. *J Urol* 2003; 170(3): 777-782.
24. Chen CY, Chung YC: Antibacterial characteristic and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresour Technol* 2008; 99(8): 2806-2814.
25. Keler E: Barierna funkcija urotelija podgan po delovanju luščilnih sredstev, Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2016
26. Staack A, Hayward SW, Baskin LS, Cunha GR: Molecular, cellular and developmental biology of urothelium as a basis of bladder regeneration. *Differentiation* 2005; 73(4):121-133.

27. Erman A, Kerec Kos M, Žakelj S, Resnik N, Romih R, Veranič P: Correlative study of functional and structural regeneration of urothelium after chitosan-induced injury. *Histochem Cell Biol.* 2013; 140(5): 521-531.
28. Krafts PK: Tissue repair, The hidden drama. *Organogenesis.* 2010; 6(4): 22.
29. de Boer WI, Schuller AG, Vermey M, van der Kwast TH: Expression of growth factors and receptors during specific phases in regenerating urothelium after acute injury in vivo. *Am J Pathol.* 1994; 145(5): 1199-1207.
30. Hicks RM: The fine structure of the transitional epithelium of rat ureter. *J Cell Biol.* 1965; 26(1): 25-48. 5–233.
31. Shih IL, Shen MH, Van YT: Microbial synthesis of poly(ϵ -lysine) and its various applications. *Bioresource Technology* 2006; 97(9): 1148–1159.
32. Shima S, Matsuoka H, Iwamoto T, Sakai H: Antimicrobial action of epsilon-poly-L-lysine. *J Antibiot* 1984; 37(11): 1449-1455.
33. Internetni vir: <https://en.wikipedia.org/wiki/Polylysine>; 2.9.2016.
34. Morga M , Adameczyk Z , Gödrich S , Oćwieja M , Papastavrou G: Monolayers of poly-L-lysine on mica – Electrokinetic characteristics. *Journal of Colloid and Interface Science* 2015; 456: 116-124.
35. Internetni vir: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p6282?lang=en®ion=SI&cm_sp=Insite-_-prodRecCold_xviews-_-prodRecCold10-8; 15.9.2016.
36. Kočevar N, Čemažar M, Serša G: Gensko zdravljenje raka (Cancer gene therapy). *Farmaceutski vestnik* 2010; 61: 14–22.
37. Menger FM, Seredyuk VA, Kitaeva MV, Yaroslavov AA, Melik-Nubarov NS: Migration of poly-L-lysine through a lipid bilayer. *J Am Chem Soc* 2003; 125(10): 2846-2847.
38. Mirtič J, Kogej K, Gašperlin M, Lapanje A, Kristl J: Polielektrolitni kompleksi kot osnova za načrtovanje novih nanodelcev in nanooblog. *Farmaceutski vestnik* 2016; 4: 310–317.
39. Ohtake K, Maeno T, Ueda H, Natsume H, Morimoto Y: Poly-L-arginine predominantly increases the paracellular permeability of hydrophilic macromolecules across rabbit nasal epithelium in vitro. *Pharm Res.* 2003; 20(2): 153-60.
40. Shahana S, Kampf C, Roomans GM: Effects of the cationic protein poly-L-arginine on airway epithelial cells in vitro. *Mediators Inflamm.* 2002; 11(3): 141–148.

41. Dull RO, Dinavahi R, Schwartz L, Humphries DE, Berry D, Sasisekharan R, Garcia JG: Lung endothelial heparan sulfates mediate cationic peptide-induced barrier dysfunction: a new role for the glycocalyx. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 285(5): 986-995.
42. Ranaldi G, Marigliano I, Vespignani I, Perozzi G, Sambuy Y: The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 cell line(1). *J Nutr Biochem.* 2002; 13(3): 157-167.
43. Xu Z1, Zhang C, Zhang Y, Yang X: Europium complexes as novel indicators of paracellular diffusion. *Chem Biodivers.* 2012; 9(9): 1916-1922.
44. Hamano Y, Kito N, Kita A, et al: ϵ -Poly-L-Lysine Peptide Chain Length Regulated by the Linkers Connecting the Transmembrane Domains of ϵ -Poly-L-Lysine Synthetase. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80(16): 4993–5000.
45. Symonds P, Clifford MJ, Christy HA; et al: Low and high molecular weight poly(L-lysine)s/poly(L-lysine)-DNA complexes initiate mitochondrial-mediated apoptosis differently. *FEBS letters.* 2005; 579(27): 6191-6198.
46. Al-Jamal KT, Al-Jamal WT, Akerman S, et al: Systemic antiangiogenic activity of cationic poly-L-lysine dendrimer delays tumor growth. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107(9): 3966-3971.
47. Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Krieglstein J, et al: In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 2003; 24(7): 1121-1131.
48. Arnold LJ, Dagan A, Gutheil J, et al: Antineoplastic activity of poly(L-lysine) with some ascites tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(7): 3246–3250.
49. Chan ES, Patel AR, Smith AK, et al: Optimizing orthotopic bladder tumor implantation in a syngeneic mouse model. *J Urol.* 2009; 182(6): 2926-2931.
50. Mazia D, Schatten G, Sale W: Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J Cell Biol.* 1975; 66(1): 198-200.
51. Hyldgaard M, Mygind T, Vad BS, et al: The Antimicrobial Mechanism of Action of Epsilon-Poly-L-Lysine. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80(24): 7758–7770.
52. Bo T, Liu M, Zhong C, et al: Metabolomic analysis of antimicrobial mechanisms of ϵ -poly-L-lysine on *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem.* 2014; 62(19): 4454-4465.

53. Ye R, Xu H, Wan C, et al: Antibacterial activity and mechanism of action of ϵ -poly-L-lysine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 439(1): 148-153.
54. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, et al: TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom*. 2015; 20(2): 107-126.
55. GuhaSarkar S, Banerjee R: Intravesical drug delivery: Challenges, current status, opportunities and novel strategies. *J Control Release* 2010; 148(2): 147-159.
56. Hsu LW, Lee PL, Chen CT, et al: Elucidating the signaling mechanism of an epithelial tight-junction opening induced by chitosan. *Biomaterials* 2012; 33(26): 6254-6263.