

EVA KELER

**BARIERNA FUNKCIJA UROTELIJA PODGAN
PO DELOVANJU LUŠČILNIH SREDSTEV**

MAGISTRSKA NALOGA

**BARRIER FUNCTION OF RAT UROTHELIUM
AFTER TREATMENT WITH EXFOLIATING
INDUCERS**

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 smo opravili na Inštitutu za biologijo celice na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se vsem, ki so bili udeleženi v nastajanju magistrske naloge, predvsem pa mentoricama za vso zavzetost in pomoč.

Izjava

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

Eva Keler

Ljubljana, 2016

VSEBINA

1. UVOD	1
1.1. Sečni mehur.....	1
1.2. Urotelij.....	2
1.3. Transepitelijska električna upornost.....	4
1.4. Vnetje sečnega mehurja.....	4
1.5. Rak sečnega mehurja.....	6
1.6. Luščenje in povzročitelji luščenja	7
1.6.1. Targesin.....	8
1.6.2. Mitomicin C	9
1.6.3. Hitosan	10
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. Analiza morfologije tkiva	25
4. REZULTATI.....	27
4.1. Rezultati meritev transepitelijske električne upornosti stene sečnega mehurja podgan	27
4.1.1. Rezultati kontrolnih poskusov	27
4.1.2. Rezultati poskusov s targesinom.....	28
4.1.3. Rezultati poskusov z mitomicinom C	30
4.1.4. Rezultati poskusov s hitosanom.....	32
4.1.4.1. Rezultati poskusov z 0,5-% hitosanom	32
4.1.4.2. Rezultati poskusov z 0,05-% hitosanom	34
4.2. Rezultati mikroskopske analize urotelija <i>ex vivo</i>	36
4.2.1. Rezultati kontrolnih poskusov (izpostavitve urotelija PBS 4,5).....	37
4.2.1.1. Časovna točka T1.....	37
4.2.1.2. Časovna točka T2.....	37
4.2.2. Rezultati poskusov s targesinom.....	38
4.2.2.1. Časovna točka T2.....	38
4.2.2.2. Časovna točka T3.....	39
4.2.3. Rezultati poskusov z mitomicinom C	41

4.2.3.1.	Časovna točka T2.....	41
4.2.3.2.	Časovna točka T3.....	42
4.2.4.	Rezultati poskusov s hitosanom.....	43
4.2.4.1.	Rezultati poskusov s 15-minutnim delovanjem 0,5-% hitosana.....	43
4.2.4.1.1.	Časovna točka T2.....	43
4.2.4.1.2.	Časovna točka T3.....	44
4.2.4.2.	Rezultati poskusov s 15-minutnim delovanjem 0,05-% hitosana.....	45
4.2.4.2.1.	Časovna točka T2.....	45
4.2.4.2.2.	Časovna točka T3.....	46
4.2.4.3.	Rezultati poskusov s 30-minutnim delovanjem 0,05-% hitosana.....	47
4.2.4.3.1.	Časovna točka T2.....	47
4.2.4.3.2.	Časovna točka T3.....	48
4.2.4.4.	Rezultati poskusov s 60-minutnim delovanjem 0,05-% hitosana.....	49
4.2.4.4.1.	Časovna točka T2.....	49
4.2.4.4.2.	Časovna točka T3.....	50
5.	RAZPRAVA.....	52
6.	SKLEP.....	62
7.	LITERATURA.....	63
8.	PRILOGE.....	I

POVZETEK

Urotelij sečnega mehurja predstavlja krvno-urinsko pregrado med urinom v svetlini sečnega mehurja in krvjo v kapilarah lamine proprije. Neprepustnost zagotavlja apikalna plazmalema visoko diferenciranih površinskih celic in tesni stiki med njimi. Prekinjanje stikov in posledično luščenje urotelijskih celic lahko namensko sprožimo z luščilnimi sredstvi. Tako se v terapiji bakterijskega cistitisa kot luščilec uporablja targesin, v terapiji površinskega raka sečnega mehurja pa citostatik mitomicin C. Kot učinkovito luščilno sredstvo se je na živalskih modelih izkazal tudi polimer hitosan, katerega učinek je odvisen od koncentracije in časa delovanja. Z našim delom smo želeli dokazati, da je hitosan ob izbiri ustrezne kombinacije časa delovanja in koncentracije učinkovitejše luščilno sredstvo od targesina in mitomicina C ter da po sproženi poškodbi s hitosanom sledi hitra obnova urotelija.

V *ex vivo* poskusih smo v dvoprostornih difuzijskih celicah merili transepitelijsko električno upornost stene sečnega mehurja podgan in tako posredno vrednotili njeno prepustnost, nato pa smo tkivo analizirali še z vrstično in presevno elektronsko mikroskopijo. V času tretiranja s targesinom je upornost stene sečnega mehurja narasla, kar se ni skladalo z rezultati mikroskopske analize, s katero smo opazili neenakomerno odluščen urotelij, hkrati pa je regeneracija urotelija potekala najpočasneje. Tudi mitomicin C je odluščil urotelij neenakomerno, zato se je kljub hitro obnovljeni krvno-urinski barieri po poškodbi tudi ta luščilec izkazal za manj učinkovitega. Hitosan se je izkazal za najučinkovitejše luščilno sredstvo, a sta stopnja luščenja in kasnejša regeneracija urotelija odvisni od koncentracije in časa delovanja. Tako se je 0,5-% koncentracija hitosana izkazala za neprimerno, saj je pri vseh časih tretiranja povzročila luščenje globljih skladov urotelija vse do bazalnih celic. Urotelij se je v globino luščil tudi v primeru 60-minutnega delovanja 0,05-% hitosana in poškodba je bila tako velika, da se je med regeneracijo razvila hiperplazija urotelija, ki lahko vodi v nastanek neoplastičnih sprememb. Po 15-minutnem delovanju 0,05-% koncentracije hitosana je urotelij odluščen le mestoma in zato premalo učinkovito, a je posledično v fazi regeneracije krvno-urinska pregrada najhitreje ponovno vzpostavljena.

Rezultati našega dela kažejo, da je najbolj optimalna kombinacija koncentracije in časa delovanja hitosana 30-minutno delovanje in 0,05-% koncentracija, saj le-ta učinkovito odlušči vse površinske celice, čemur sledi tudi hitra regeneracija urotelija. Tako lahko zaključimo, da bi 30-minutna intravezikalna aplikacija 0,05-% hitosana lahko služila kot uspešna pomožna terapija bakterijskega cistitisa in površinskega raka sečnega mehurja.

Ključne besede: urotelij, luščenje, transepitelijska električna upornost, targesin, mitomicin C, hitosan.

ABSTRACT

The urothelium represents a permeability barrier between the urine in the lumen and the blood in the capillaries of lamina propria, which is provided by the apical plasma membrane of highly differentiated superficial cells and tight junctions between them. Several substances can be used to induce disassembling of tight junctions, which in turn triggers exfoliation of the urothelial cells. While targesin is used as an inducer of urothelial exfoliation in treating bacterial cystitis, the cytostatic agent mitomycin C is used in treating superficial bladder cancer. Polymer chitosan has proven to be a successful inducer of urothelial exfoliation on animal models. The aim of our work was to determine the best combination of time and concentration of chitosan for efficient exfoliation of urothelium and subsequent fast recovery after the injury in comparison to targesin and mitomycin C.

In *ex vivo* experiments, transepithelial electrical resistance of rat urinary bladder wall was measured in side-by-side diffusion chambers to evaluate the permeability of the urothelial tissue. After that, the tissue was analyzed with a scanning and transmission electron microscopy. In the presence of targesin, the transepithelial electrical resistance increased despite the exfoliation detected by microscopy analysis. The exfoliation was not homogenous and the regeneration was slow. Fast recovery of the blood-urine barrier was detected after mitomycin C treatment; nevertheless, mitomycin C was shown as an inappropriate exfoliating inducer due to its inability to induce homogenous exfoliation of the urothelium. Chitosan was found as the most effective exfoliating inducer; however, its effectiveness and the speed of regeneration after the injury was time- and concentration-dependent. 0.5% chitosan was too aggressive since the urothelium was deeply exfoliated and intermediate or even basal cells were seen on the urothelial surface. Intense exfoliation of deeper cell layers of the urothelium was also detected after 60-min treatment with 0.05% chitosan, leading into hyperplastic urothelium during regeneration period. Hyperplasia being a common preneoplastic response, this combination of time and concentration of chitosan was revealed as inappropriate for potential clinical use. A 15-min treatment with 0.05% chitosan was also an inappropriate combination, since the urothelium was exfoliated non-homogeneously; consequently, with this combination the blood-urine barrier was the first to be established among all treatments.

We can conclude that the 30-min of 0.05% chitosan is the optimal combination of time and concentration, as it homogeneously exfoliated the urothelium and its subsequent regeneration was fast. This combination could be used as a successful auxiliary therapy of bacterial cystitis and superficial bladder cancer, thus replacing targesin and mitomycin C.

Key words: urothelium, transepithelial electrical resistance, exfoliation, targesin, mitomycin C, chitosan.

SEZNAM OKRAJŠAV

A	absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja
KST	kratkostični tok
MCC	raztopina mitomicina C
MIRSM	mišično invazivni rak sečnega mehurja
PBS 7,4	fosfatni pufer s pH 7,4
PBS 4,5	fosfatni pufer s pH 4,5
POVP	povprečje vseh relativnih TEU ob določenem času
PRSM	površinski rak sečnega mehurja
R	relativna vrednost TEU stene sečnega mehurja (% TEU glede na t= 30 min)
SEM	vrstični elektronski mikroskop
SD	standardni odklon povprečja relativnih TEU ob določenem času
T1	časovna točka 1 (t= 30 min, konec predinkubacijske dobe)
T2	časovna točka 2 (t= 45, 60 oz. 90 min, 15, 30 oz. 60 min po izpostavljenosti urotelija posamezni učinkovini)
T3	časovna točka 3 (t= 360 min, konec poskusa)
TAR	koloidna raztopina targesina
TEM	presevni elektronski mikroskop
TEP	transepitelijski potencial
TEU	transepitelijska električna upornost
UPEC	uropatogena <i>Escherichia coli</i>
0,5-% HIT	disperzija hitosana z 0,5-% koncentracijo
0,05-% HIT	disperzija hitosana z 0,05-% koncentracijo

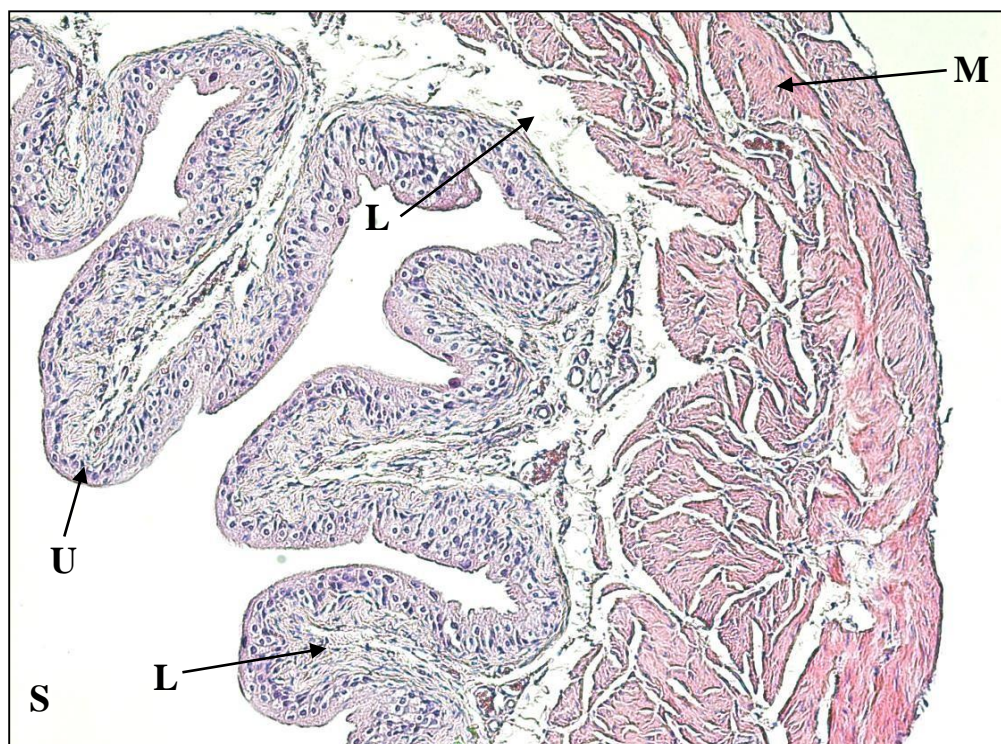
1. UVOD

1.1. Sečni mehur

Sečni mehur (lat. *vesica urinaria*) je votel, mišičast organ, ki skupaj z ledvicama, sečevodoma in sečnico sestavlja sistem sečil (1).

Steno sečnega mehurja sestavljajo tri plasti (slika 1):

- sluznica, ki obdaja svetlino sečnega mehurja in jo tvorita prehodni epitelij, imenovan urotelij, ter lamina proprija,
- mišična plast in
- seroza (2).



Slika 1: Prerez sečnega mehurja. U- urotelij, L- lamina proprija, M- mišična plast, S- svetlina mehurja.

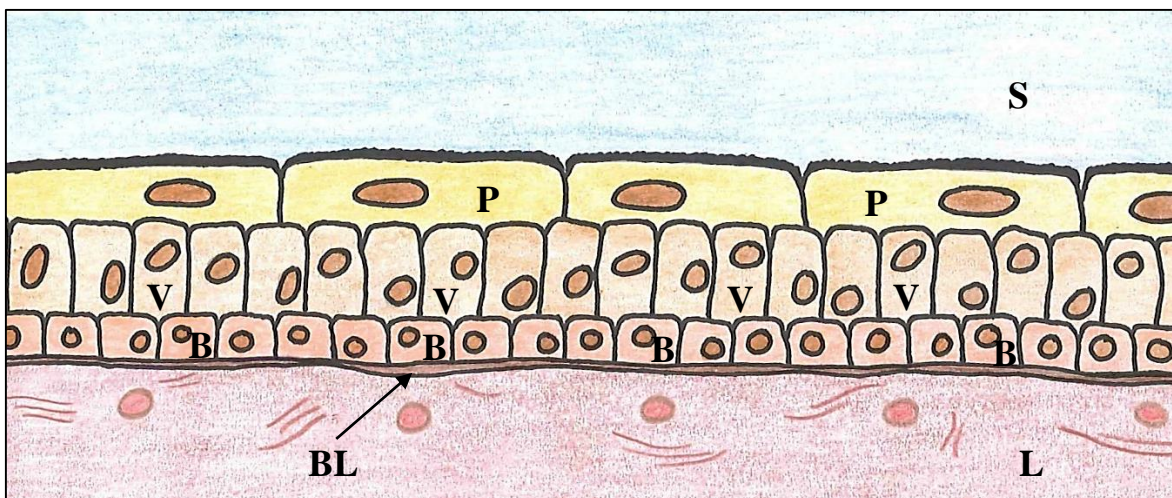
Naloga sečnega mehurja sesalcev je zbiranje urina ali seča, ki nastaja v ledvicah s filtracijo krvi (1). Urin vsebuje odpadne produkte telesa (strupene presnovke, sečnino, vodo, amonijeve ione, protone...), ki se morajo izločiti iz organizma (3). Med zbiranjem urina se sečni mehur razteza, ko se urin izloči, pa se mehur močno skrči (4).

1.2.Urotelij

Epitelij sečnega mehurja – urotelij obdaja svetlino sečnega mehurja in predstavlja krvno-urinsko pregrado, ki je najtesnejša pregrada v človeškem organizmu (5). Njena naloga je onemogočanje prehajanja snovi iz urina v kapilare, ki so v lamini propriji ter izgubljanje vode in ionov iz urotelija v hipertonični urin (4).

Urotelij sestavljajo trije celični skladi (slika 2):

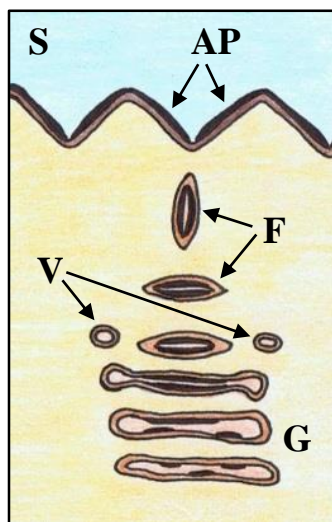
- Bazalne celice; ležijo tik ob bazalni lamini. So majhne, kubične oblike in od vseh urotelijskih celic na najnižji stopnji diferenciacije.
- Vmesne (intermediarne) celice; ležijo nad bazalnimi celicami. V primerjavi z bazalnimi so večje (10 μm), kubične ali visokoprizmatske in delno diferencirane.
- Površinske (dežnikaste) celice; mejijo na svetlino mehurja in so v stiku z urinom. So največje urotelijske celice (20–100 μm), ploščate in heksagonalne oblike ter na najvišji stopnji diferenciacije (4, 5).



Slika 2: Shematski prikaz urotelija. Urotelij sestavljajo trije skladi celic: površinske celice (*P*), ki mejijo na svetlino sečnega mehurja (*S*), vmesne celice (*V*) in bazalne celice (*B*). Bazalne celice ležijo ob bazalni lamini (*BL*), ta pa meji na lamino proprijo (*L*) (4). Avtor: Eva Keler; Povzeto po Hicks RM: The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. Biol Rev Camb Philos Soc 1975; 50(6): 215–246.

Naloga krvno-urinske pregrade je preprečevanje transcelularnega in paracelularnega prehajanja molekul. Transcelularno prehajajo molekule skozi celično plazmalemo, kar je v uroteliju preprečeno zaradi posebne strukture apikalne plazmaleme površinskih celic (3). Le ta je zgrajena iz odebeljenih rigidnih predelov – plakov, ki so debeli 12 nm in so ločeni s tanjšimi medplaknimi predeli debeline 7–10 nm. Takšna zgradba apikalne plazmaleme daje

apikalni površini urotelija značilen školjkast videz. Plaki predstavljajo 73–90 % celotne apikalne površine. Zgrajeni so iz specifično urejenih transmembranskih proteinov uroplakinov. Uroplakini se sintetizirajo na ribosomih endoplazmatskega retikuluma, nato pa se modificirajo v dobro razvitem Golgijevem aparatu, od katerega potujejo proti površini celice v obliki specifičnih fuziformnih veziklov (slika 3). Fuziformni vezikli so vretenaste oblike, njihova naloga pa je povečanje površine urotelija ob raztezanju mehurja. Takrat se fuziformni vezikli površinskih celic zlijejo z apikalno plazmalemo in jo na ta način povečajo (4, 6). Apikalno plazmalemo površinskih celic prekriva plast glikozaminoglikanov, ki dajejo apikalni plazmalemi negativen naboj (4, 7).



Slika 3: Povečanje površine urotelija ob raztezanju sečnega mehurja. V Golgijevem aparatu (*G*) poteka modifikacija proteinov uroplakinov, ki v obliki fuziformnih veziklov (*F*) potujejo proti apikalni plazmalemi (*AP*) in se zlijejo z njo. *S*- svetlina mehurja, *V*- vezikli. Avtor: Eva Keler; Povzeto po Hicks RM: The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. Biol Rev Camb Philos Soc 1975; 50(6): 215–246.

Paracelularni transport je difuzija snovi po medceličnem prostoru. V uroteliju je ta način prehajanja molekul in ionov iz urina v tkivo preprečen z močnimi tesnimi stiki, ki povezujejo površinske celice med seboj (6, 8). Tesni stiki so medcelični stiki, ki obkrožajo vrhove posameznih površinskih celic in spenjajo lateralne plazmaleme sosednjih celic. Sestavlja jih gosta mreža citosolnih in transmembranskih proteinov ter elementi citoskeleta (6, 9). Med pomembnejše transmembranske proteine tesnih stikov sodijo okcludini in klavdini (6, 10).

1.3. Transepitelijska električna upornost

Prepustnost epitelijev lahko ovrednotimo z merjenjem transepitelijske električne upornosti. Na ta način neposredno ovrednotimo intaktnost bioloških barier v organizmu. Transepitelijska električna upornost (TEU) je definirana kot upornost tkiva za prehajanje elektrolitov in nanoelektrolitov (7). TEU lahko merimo v dvoprostornih difuzijskih celicah, s katerimi pa lahko spremljamo tudi druge elektrofiziološke parametre:

- transepitelijski potencial (TEP), ki nam pove ali je tkivo živo in
- kratkostični tok (KST), ki nam poda količino celokupnega naboja ionov, ki so se aktivno transportirali preko tkiva v enoti časa (11).

Višina TEU je obratno sorazmerna s prehajanjem ionov, kar pomeni, da večji kot je prehod ionov preko epitelija, nižja je TEU. Glede na izmerjeno TEU epitelije razdelimo v dve skupini, prepustne in tesne. Epitelije, ki imajo TEU nižjo od $500 \Omega\text{cm}^2$, označimo za prepustne, epitelije s TEU višjo od $500 \Omega\text{cm}^2$ pa za tesne epitelije (7). Urotelij sečnega mehurja je najbolj neprepusten epitelij v človeškem telesu, saj je njegova upornost 100-krat večja v primerjavi z upornostjo črevesnega epitelija (preglednica I) (6, 7, 9). Izmerjene vrednosti permeabilnosti sečnega mehurja za prehod nekaterih sestavin urina kot so sečnina, amonijevi ioni, voda in protoni so izjemno nizke, kar potrjuje dobro pregradno funkcijo urotelija sečnega mehurja (7).

Preglednica I: Transepitelijska električna upornost posameznih bioloških pregrad v človeškem organizmu (2, 4, 6).

Pregrada	Transepitelijska električna upornost [Ωcm^2]
Urin – kri	~10.000
Tanko črevo – kri	<100
Možgani – kri	1000–2000

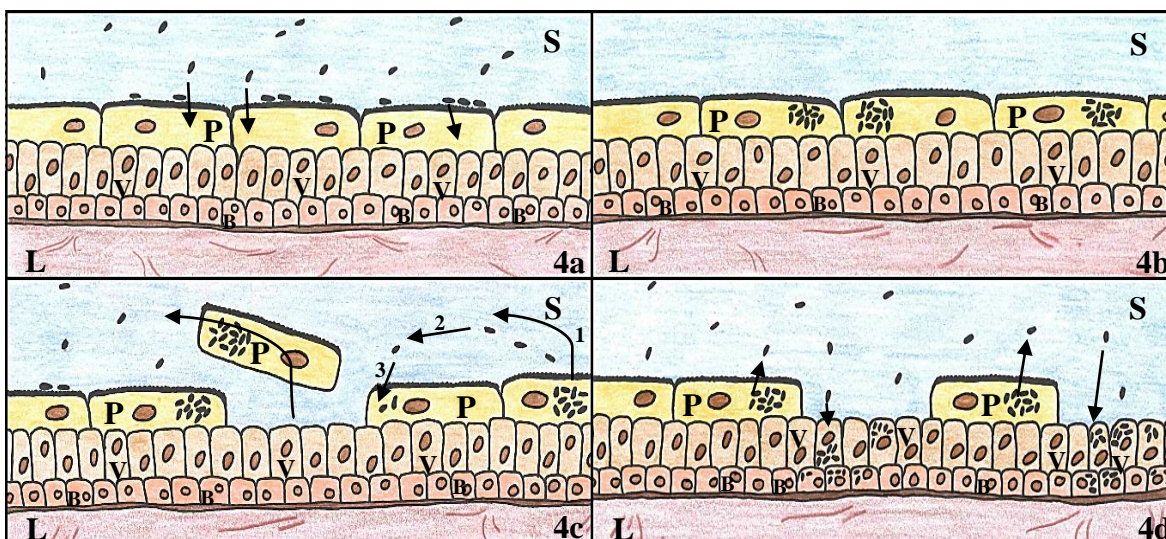
1.4. Vnetje sečnega mehurja

Vnetje sečnega mehurja imenujemo cistitis. Kadar okužbo povzročijo bakterije, govorimo o bakterijskem cistitisu, ki je pri ljudeh druga najpogostejša bakterijska infekcija takoj za okužbami dihal (12). Simptomi bakterijskega cistitisa so boleče uriniranje (disurija), potreba

po pogostem uriniranju manjših količin seča, pojav krvi v urinu in ostra bolečina po končanem uriniranju (13, 14).

Patofiziološki mehanizem bakterijskega cistitisa poteka v štirih zaporednih stopnjah. V prvi stopnji bakterijska infekcija povzroči luščenje celic urotelija. To zmanjša barierno funkcijo urotelija in omogoči povečan prehod snovi iz hipertoničnega urina v urotelijske celice. Povečan vstop kalijevih ionov povzroči depolarizacijo živčnih in mišičnih celic, kar se klinično kaže kot disurija in povečana frekvenca uriniranja. Sledi druga stopnja, v kateri se zaradi vnetja urotelija spremeni diferenciacija celic, sinteza uroplakinov in proteinov tesnih stikov okludinov je nenormalna, kar vodi v še večjo prepustnost urotelija. V tretji stopnji pride do razširitve vnetja na okoliško tkivo, upočasni pa se tudi proliferacija celic. V zadnji, četrti stopnji se kot posledica vnetnih procesov poveča aktivnost živčnih končičev, kar se sčasoma lahko razvije v nevrogeno vnetje. Pri tem pride do poškodbe živčnih končičev in znižanja praga občutljivosti na dražljaje (13).

Bakterijski cistitis v 90 % povzroči okužba z uropatogeno bakterijo *Escherichia coli* (UPEC) (12). Pri ženskah je obolevnost pogostejša zaradi krajše razdalje med danko, ki je vir okužbe, in sečnico, ki je vstopno mesto za bakterije. Za infekcijo so značilne številne ponovitve in v kar 70 % primerov okužbe je isti sev UPEC, ki je povzročil prvo okužbo, povzročil tudi kasnejše okužbe (12, 15, 16). Dokazano je, da je UPEC tudi po prenehanju znakov akutne okužbe še vedno prisotna v sečnem mehurju, vendar preide v fazo mirovanja. UPEC se po vstopu v sečni mehur najprej pritrdijo na apikalno plazmalemo površinskih urotelijskih celic, kar je ključno za uspešnost okužbe (slika 4a). Nato sledi vstop skozi apikalno plazmalemo v citosol urotelijske celice, kjer se pričnejo bakterije intenzivno deliti. Po 6–8 urah se začnejo združevati v urejene skupke in razmnoževanje se upočasni (slika 4b). 12–16 ur po okužbi se začnejo iz skupkov odcepljati posamezne bakterije, ki iz površinskih celic zopet preidejo v svetlino mehurja (slika 4c). Ponovno se pritrdijo na druge urotelijske celice in razvojni krog se ponovi. Izstop bakterij iz površinskih urotelijskih celic povzroči prekinjanje tesnih stikov med celicami in posledično luščenje le teh. Okužene odlučene celice se iz sečnega mehurja odstranijo s tokom urina. Na površini urotelija se razgalijo vmesne celice, v katere lahko UPEC vstopijo, vendar se v njih ne razmnožujejo, pač pa preidejo v mirujoče stanje in so vzrok za ponavljajoče infekcije (slika 4d). Znotraj urotelijskih celic je UPEC varna pred imunskim odzivom in protimikrobnimi zdravilnimi učinkovinami (12, 15, 17).



Slika 4: Shematski prikaz nastanka bakterijskih združb v uroteliju, ki so razlog ponavljajočih epizod bakterijskega cistitisa. a) Bakterije se najprej pritrdijo na apikalno plazmalemo površinskih celic (*P*) in prodrejo v njeno notranjost. **b)** Bakterije se po intenzivnih delitvah znotraj površinske celice združijo v skupke. **c)** Bakterije se odcepijo od skupkov znotraj površinske celice, izstopijo v svetlino sečnega mehurja (*S*) ter okužijo še neokužene površinske celice. Okužene celice se odluščijo s površine urotelija in razgalijo se vmesne celice urotelija (*V*). **d)** Bakterije lahko vstopijo v razgaljene vmesne celice in nato še v bazalne celice, kjer tvorijo mirujoče bakterijske združbe. Le-te so vir ponavljajočih infekcij. *B*- bazalne celice, *L*- lamina proprija. Avtor: Eva Keler; Povzeto po Veranič P: Uropatogena *Escherichia coli* – priložnostni znotrajcelični parazit. Med razgl 2008; 47(3): 251–257.

Terapija bakterijskega cistitisa je v celoti uspešna samo v primeru odstranitve okuženih urotelijskih celic, sicer se okužbe ponavljajo (12, 17). V te namene se v klinični praksi uporablja intravezikalna aplikacija targesina (12).

1.5. Rak sečnega mehurja

Rak sečnega mehurja se pogosteje pojavlja v moški populaciji, saj je razmerje pojavnosti med moškimi in ženskami 3:1 (18). Leta 2012 je bil pri moških med vsemi na novo odkritimi raki rak sečnega mehurja na devetem mestu po pogostosti (3,1 % vseh rakov) (19). Pogosteje se razvije pri starejši populaciji, 80 % obolelih je starih med 50 in 80 let (18).

Najpomembnejši dejavniki tveganja za nastanek raka sečnega mehurja so kajenje, dolgotrajno uživanje analgetika fenacetina, izpostavljenost kemikalijam (predvsem tistim, ki se uporabljajo v lesni, gumarski in plastični industriji) ter kronično vnetje mehurja (18, 20). Znaki raka sečnega mehurja kot so prisotnost krvi v urinu in boleče ter pogosto uriniranje so zelo podobni simptomom cistitisa ali vnetja prostate, kar oteži postavitve diagnoze (18, 21). Poznamo več tipov raka sečnega mehurja. Najpogostejši je površinski rak sečnega mehurja

(PRSM), saj predstavlja kar 75 % vseh oblik rakavih obolenj sečnega mehurja. PRSM je maligna tvorba, ki je omejena samo na zgornje plasti stene mehurja in sega najgloblje do lamine proprije (18, 22). Prognoza PRSM je v večini primerov dobra in ni življenjsko ogrožajoča. Rak pa se kljub uspešnemu prvotnemu zdravljenju pogosto ponovi, v roku 6–12 mesecev pri kar 50 % bolnikov in v 10 letih pri več kot 75 % bolnikov (18, 21, 22). Kadar PRSM ne zdravimo, lahko pride do razširitve raka na mišične plasti mehurja in s tem do nastanka mišično-invazivnega raka sečnega mehurja (MIRSM), ki pogosto metastazira predvsem v limfno tkivo. Napredovanje PRSM v MIRSM se zgodi pri enem od petih bolnikov (18, 21).

Pri bolnikih s PRSM se v klinični praksi odstrani maligne celice s kirurškim posegom imenovanim transuretralna resekcija. Posegu sledi intravezikalna kemoterapija s citostatiki ali imunoterapija s cepivom proti tuberkulozi z bacilom Calmette-Guérin. Bacil Calmette-Guérin v mehurju sproži imunski odziv, ki s protitelesi in vnetnimi mediatorji uniči rakave celice. Kemoterapija s citostatiki je najpogosteje uporabljena terapija pri zdravljenju PRSM, med citostatiki pa se najpogosteje uporabljajo mitomicin C, doksorubicin, epirubicin, gemcitabin in valubicin (18, 20, 21).

1.6. Luščenje in povzročitelji luščenja

Luščenje urotelija je proces prekinjanja celičnih stikov, ki mu sledi odlučanje celic. Predstavlja naraven proces v razvoju urotelija in njegov obrambni odziv na različne signale notranjega ali zunanega izvora, npr. pri bakterijskem cistitisu (23, 24). Urotelij je v fizioloških pogojih stabilno tkivo, odporno na mehanske sile. Določeni stresni dejavniki kot so neprestana in dolgotrajna izpostavitve živali osvetlitvi, vročina, stresni hormoni in endotoksini pa povzročijo luščenje urotelija (23, 24). Odlučijo se lahko posamezne površinske celice ali skupine površinskih celic. Najprej se zrahljajo tesni stiki med površinskimi celicami, s čimer se poveča prepustnost krvno-urinske pregrade. To omogoča prehajanje hipertoničnega urina v medcelične prostore urotelija, ki se s tem povečajo. Na povečano prepustnost urotelija odgovori organizem s sproščanjem proteolitičnih encimov. Ti povzročijo prekinitev še tistih stikov, ki celice povezujejo med seboj v urejeno strukturo in celice se odlučijo iz urotelija (25, 26).

Če stresni dejavniki urotelija ne uničijo popolnoma, se urotelij zelo hitro obnovi (23, 24). Obnova urotelija obsega intenzivno proliferacijo in diferenciacijo bazalnih celic v vmesne celice ter vmesnih celic v površinske celice. Diferenciacija vmesnih celic v površinske se odraža v spreminjanju apikalne površine. Na nizki stopnji diferenciacije imajo površinske celice na svoji apikalni površini številne mikrovile, v nadaljnjem procesu diferenciacije se apikalna površina oblikuje v vrvičaste grebene, ki so najprej nesklenjeni, kasneje pa se sklenejo. Na končni stopnji diferenciacije površinskih urotelijskih celic se izoblikuje apikalna plazmalema, ki je značilno školjkasto nagubana. V fizioloških razmerah je obnova urotelija dolgotrajen proces (pri uroteliju miši skoraj leto), saj je urotelij zelo stabilno tkivo z zelo nizko proliferacijsko aktivnostjo. V primeru poškodbe urotelija pa obnova tkiva poteče zelo hitro (v nekaj dneh), da se krvno-urinska pregrada čim hitreje ponovno vzpostavi (4, 26). Pri namerno povzročnem luščenju urotelija pogosto pride do vnetja, hiperplazije ali nekroze urotelijskih celic (8). Nekroza je patološka oblika celične smrti, ki jo lahko povzročijo različni zunanji in notranji dejavniki (spremenjene razmere v okolju, mehanska poškodba, virusna okužba, strupi...). Pri nekrozi celice se najprej poškoduje plazmalema, s čimer se poveča njena prepustnost za vodo in ione. Celotna celica z organeli nabrekne in na koncu počí. S tem se vsebina celice sprosti v zunajcelični prostor, kjer encimi poškodujejo številne sosednje celice. Nekroza tako vedno zajame večje število celic in sproži vnetni odgovor v tkivu (27).

V klinični praksi se kot sredstvi za povzročitev luščenja urotelijskih celic uporabljata targesin in mitomicin C, na živalskih modelih pa se je za uspešno luščilno sredstvo izkazal hitosan (6, 8, 28).

1.6.1. Targesin

Targesin (lat. *Targesinum*) je koloidna raztopina srebra s sledovi taninov (29, 30). Je temno sive do temno rjave barve, brez ali z rahlim značilnim vonjem (31). Targesin deluje antiseptično, zato se pogosto uporablja kot dezinfekcijsko sredstvo. Spada med oligodinamične spojine, katerih učinkovitost temelji na srebrovem ionu Ag^+ , ki ireverzibilno poškoduje encime plazmaleme evkariontskih in prokariontskih celic (32).

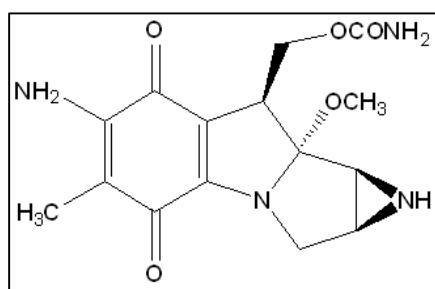
Uporaba targesina je bila pred petdesetimi leti precej bolj razširjena kot danes. V različnih koncentracijah so ga vgrajevali v farmacevtske oblike in uporabljali za zdravljenje številnih težav. V obliki tablet in svečk se je targesin zaradi adstringentnega delovanja uporabljal pri

driskah, zaradi antiflogističnega in protibakterijskega delovanja pa pri številnih vnetjih. Za vnetje očne in nosne sluznice so se uporabljale kapljice, pri vnetju kože mazila in pri vnetjih sečnega mehurja ter nožnice raztopine s targesinom (30).

Danes zaradi široke rabe protimikrobnih učinkovin uporaba targesina ni več tako pogosta. Ohranila se je v oftalmologiji in otorinolaringologiji in sicer v obliki kapljic, ki vsebujejo 0,5–4 % srebra (33). Zaradi njegovega luščilnega delovanja in oligodinamičnega delovanja na bakterijo *Escherichia coli* ga uporabljajo tudi urologi kot sredstvo pri zdravljenju bakterijskega cistitisa (34, 35).

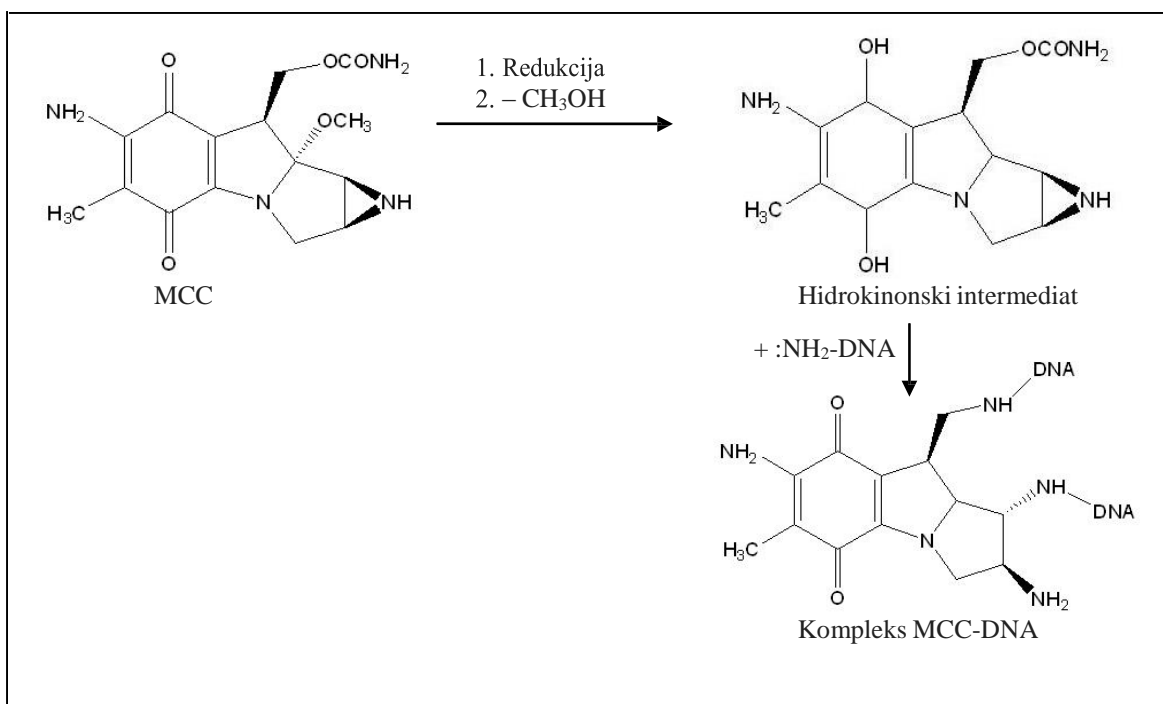
1.6.2. Mitomicin C

Mitomicin C (MCC) je citostatik (slika 5), ki je v uporabi že več kot 30 let (36). Poznamo več njegovih dimerov, ki imajo podobne oz. izboljšane učinke (npr. mitomicin A, mitomicin 8, mitomicin 9) (37).



Slika 5: Kemijska struktura mitomicina C (38).

Mehanizem delovanja MCC temelji na kovalentni vezavi z DNA (slika 6). Za delovanje je nujna kaskada reakcij, ki reducirajo kinonski obroč. Dobimo močno reaktiven hidrokinonski intermediat, ki ima dve elektrofilni mesti in ima veliko afiniteto do molekule DNA, ki jo alkilira in prečno premreži (38, 39). Poškodovana DNA vodi celico v apoptozo. Apoptoza je programirana celična smrt, ki jo sproži sama celica ob poškodbi dednega materiala, da se celica ne deli naprej (40). Celica ubije samo sebe s kontroliranim, genetsko vodenim procesom, katerega značilni morfološki znaki so zaobljenje celice ter zgostitev citoplazme in kromatina. Apoptotska celica v sklepnih fazah razpade na apoptotska telesca, ki jih fagocitirajo makrofagi ali sosednje celice, ki jih znotrajcelično razgradijo. Apoptotska smrt zajame le posamezne celice brez sprožitve vnetnega odziva v tkivu (27).

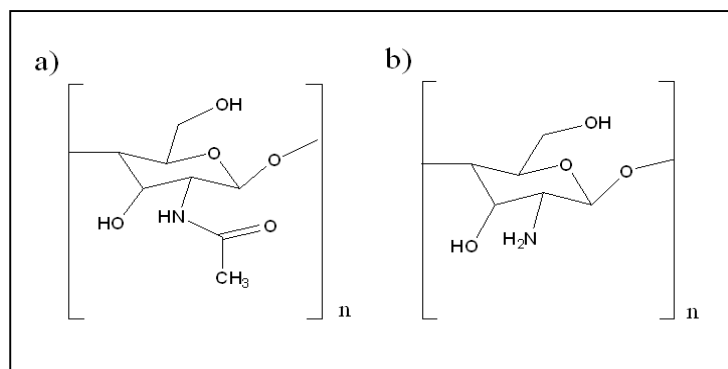


Slika 6: Mehanizem kovalentne vezave MCC z DNA (38).

MCC se uporablja v terapiji različnih rakavih boleznih (rak sečnega mehurja, dojke, prostate, materničnega vratu, trebušne slinavke, želodca). Njegov najpogostejši neželeni učinek je levkopenija, redkeje tudi trombocitopenija, anoreksija in slabost (37, 41). MCC je najpogosteje uporabljen citostatik v terapiji PRSM. Urologi ga aplicirajo s katetrom neposredno v sečni mehur po odstranitvi rakavega tkiva s transuretralno resekcijo (18, 42).

1.6.3. Hitosan

Hitosan je nizko toksičen, biorazgradljiv, biokompatibilen, linearen kationski polisaharid, ki ga sestavljajo monomeri glukoamina in N-acetilglukoamina (slika 7). Pridobivajo ga z delnim deacetiliranjem hitina, katerega največkrat ekstrahirajo iz zunanega ogrodja nekaterih rakov in žuželk (43, 44, 45, 46).



Slika 7: Monomerne enote, ki sestavljajo hitosan: a) N-acetilglukozamin in b) glukozamin (46).

Fizikalno-kemijske lastnosti hitosana so odvisne od molekulske mase polimera in stopnje acetilacije; acetilna skupina je vezana na amino skupino glukozamina. S spreminjanjem molekulske mase vplivamo na viskoznost disperzije hitosana, s stopnjo acetilacije pa na gostoto naboja in s tem na njegovo topnost. Hitosan je zaradi šibkih bazičnih lastnosti (pKa vrednosti glukozaminske enote hitosana je 6,2–7,0) topen v kislinskih vodnih medijih, kjer pride do protoniranja amino skupine (43, 44, 45, 47).

Uporaba hitosana je iz dneva v dan širša. Pogosto ga najdemo v prehranskih dopolnilih za hujšanje, saj naj bi z vezavo maščobnih kislin, trigliceridov in žolčnih kislin zmanjšal njihovo absorpcijo v črevesju, obenem pa je zaradi velikosti polimera onemogočena njegova sistemska absorpcija (48). Hitosan se uporablja tudi v razvoju farmacevtskih oblik za izdelavo matriksa nanodelcev, mikrosfer, hidrogelov... V hitosanski matriks delca lahko vgradimo zdravilno učinkovino, ki se nato iz njega počasi sprošča. Lastnosti kot so poroznost, velikost in oblika delcev med drugim vplivajo na profil sproščanja vgrajene zdravilne učinkovine. Te lastnosti lahko v primeru uporabe polimernega matriksa iz hitosana spreminjamo s spreminjanjem molekulske mase in stopnje acetilacije (topnosti), s čimer dosežemo želeni profil sproščanja zdravilne učinkovine (46, 49, 50).

Od molekulske mase in stopnje acetilacije hitosana pa niso odvisne samo njegove fizikalno-kemijske lastnosti, pač pa tudi njegovo delovanje na biološke sisteme (45). Polikationske lastnosti hitosana omogočajo njegovo interakcijo z negativno nabito površino različnih sluznic v organizmu. To daje hitosanu lastnosti pospeševalca absorpcije, saj se poveča prepustnost epiteljskega tkiva, kar pospeši absorpcijo (43, 44, 47, 48, 51). Hitosan se s tem namenom preiskuje kot ena izmed pomožnih snovi v razvoju farmacevtskih oblik za peroralno aplikacijo zdravilnih učinkovin, ki se slabo absorbirajo iz prebavnega trakta (48, 51).

Dokazano je, da hitosan poveča prepustnost epitelijev z vplivanjem na tesne stike (6, 8, 48, 51). Ta splošna trditev pa ne velja za urotelij, saj je dokazano, da višje koncentracije hitosana povzročijo luščenje urotelija, medtem ko nižje koncentracije pri časovno kratki izpostavljenosti sicer vplivajo na tesne stike urotelija, vendar se prepustnost za modelno učinkovino pri teh koncentracijah značilno ne poveča. S spreminjanjem časa izpostavljenosti tkiva in koncentracije hitosana lahko torej vplivamo na delovanje hitosana na urotelij sečnega mehurja (6, 9, 43).

Hitosan izkazuje tudi protimikrobno, antioksidativno, imunostimulacijo in protitumorsko delovanje (44, 45, 52). Zaradi protimikrobnih lastnosti služi hitosan kot osnova za razvoj materialov v krvnem, tkivnem in kostnem bioinženiringu, saj je učinkovit proti bakterijam, kvasovkam, glivam in algam. Predlagani so trije možni mehanizmi protimikrobnega delovanja:

- Interakcija hitosan – membrana celice. Pozitivno nabit hitosan reagira z elektro-negativno membrano celice mikroorganizma. Zaradi nasprotnega naboja teh dveh površin se med njima vzpostavijo elektrostatske sile, ki spremenijo prevodnost in prepustnost celice za elektrolite in nujno potrebne snovi (glukozo, aminokisliline...). Posledično se poruši osmotsko ravnovesje v celici mikroorganizma, kar onemogoči njegovo razmnoževanje in razrast.
- Interakcija hitosan – DNA. Pozitivno nabit hitosan reagira z negativno nabito DNA mikroorganizma po vstopu v citosol celice. Med hitosanom in DNA se vzpostavijo elektrostatske sile in delovanje DNA je moteno, to pa vodi celico mikroorganizma v smrt (28, 45, 52).
- Interakcija hitosan – kovinski ioni. Pri pH 7 do 9 ima hitosan deprotonirane amino skupine in hidroksilne skupine, kar omogoči kompleksiranje kovinskih ionov med verige hitosana. S keliranjem nujno potrebnih kovinskih ionov hitosan onemogoči njihovo uporabo za normalen razvoj, zato celica mikroorganizma propade (45).

Med opisanimi mehanizmi protimikrobnega delovanja hitosana sta prva in druga hipoteza najbolj sprejeti, najverjetneje pa gre za kombinacijo vseh treh mehanizmov v različnih obsegih. Dokazana je bila tudi povezava med protimikrobno učinkovitostjo ter molekulske mase, stopnjo acetilacije in koncentracijo hitosana. Protimikrobna učinkovitost se zmanjšuje z večanjem molekulske mase in tudi z večanjem koncentracije hitosana. To je najverjetneje posledica zmanjšanja fleksibilnosti polimernih verig in tvorbe skupkov, s čimer se zmanjša površina, ki je na razpolago za tvorbo interakcij hitosana z membrano celice. Prav tako se

protimikrobna učinkovitost zmanjšuje z večanjem stopnje acetilacije amino skupin hitosana. Več kot je amino skupin acetiliranih, manjša je gostota kationskega naboja hitosana in interakcije z negativno nabito membrano celice so šibkejše (28, 45, 52).

Hitosanu je bilo dokazano tudi protitumorsko delovanje, vendar točen mehanizem zaenkrat še ni znan. Proučevali so protitumorsko delovanje hitosana na rakave celice jeter, kolona, materničnega vratu in sečnega mehurja, študije pa so potekale na izoliranih celičnih linijah (44, 53, 54). Predlagan mehanizem protitumorskega delovanja hitosana na celice PRSM temelji na interakciji pozitivno nabitega hitosana z negativno nabito membrano rakave celice. Pri tem pride do reorganizacije citoskeleta rakave celice in sprememb v delovanju encimov sklopljenih s citoskeletom. Nepravilno delovanje encimov nato povzroči apoptotsko smrt rakavih celic PRSM (44, 53). Čeprav se hitosan samostojno še ne uporablja v terapiji raka sečnega mehurja, pa je že bila dokazana boljša učinkovitost zdravljenja PRSM z uporabo znanih protitumorskih učinkovin, vgrajenih v dostavni sistem iz hitosana (55, 56).

2. NAMEN DELA

Pri zdravljenju bakterijskega cistitisa in raka sečnega mehurja imajo pomembno vlogo luščilci urotelijskih celic, s katerimi lahko odstranimo okužene oz. rakave urotelijske celice. V klinični praksi je poleg nizke toksičnosti zelo pomembna učinkovitost luščenja urotelijskih celic in nato čim hitrejša obnova urotelija. Namen magistrskega dela je ugotoviti kako učinkovito različna luščilna sredstva odstranijo urotelijske celice sečnega mehurja podgan, kako vplivajo na hitrost obnove urotelija po sproženi poškodbi ter kakšna je barierna funkcija urotelija tekom teh dveh procesov. Kot luščilna sredstva bomo uporabili targesin in mitomicin C, ki se že uporabljata v klinični praksi in hitosan, ki se je kot učinkovito luščilno sredstvo izkazal na živalskih modelih.

Vpliv luščilnih sredstev na barierno funkcijo urotelija podgan bomo ovrednotili *ex vivo* z merjenjem transepiteljske električne upornosti stene sečnega mehurja podgan v dvoprostornih difuzijskih celicah. Morfološke spremembe urotelija bomo analizirali še z vrstično in presevno elektronsko mikroskopijo takoj po koncu izpostavitve tkiva posameznemu luščilnemu sredstvu in po zaključku obdobja regeneracije. V poskusih bomo pri vseh treh luščilnih sredstvih spreminjali čas izpostavljenosti urotelija luščilnemu sredstvu. V poskusih s hitosanom bomo spreminjali tudi koncentracijo polimera, medtem ko bomo v primeru mitomicina C in targesina uporabili raztopine takšnih koncentracij kot se uporabljajo v klinični praksi.

Cilj magistrskega dela je dokazati, da je med primerjanimi luščilnimi sredstvi hitosan najbolj učinkovit in da hkrati omogoča tudi najhitrejšo obnovo barierne funkcije urotelija, pri čemer želimo določiti optimalni čas izpostavljenosti tkiva hitosanu in optimalno koncentracijo hitosana. Oba podatka sta namreč ključnega pomena za morebitno uporabo hitosana v klinični praksi.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

Luščilna sredstva

- 2-% Targesin, Lekarna Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, Ljubljana, Slovenija
- Mitomycin-C Kyowa™, prašek za pripravo raztopine za injiciranje, Kyowa Hakko Kirin UK, Berkshire, Združeno kraljestvo (raztopina za injiciranje s koncentracijo 0,5 mg/mL pripravljena v Lekarni Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, Ljubljana, Slovenija)
- hitosanijev klorid (v nadaljevanju hitosan), Protasan CI 213, 86-% deacetilacija, NOVAMATRIX, Drammen, Norveška
- hitosanijev klorid, 88,8-% deacetilacija, Kraeber&Co GMBH, Ellerbek, Nemčija

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
- aceton, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- etanol 96-%, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija

Plini

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

Tkivo

- sečni mehurji podgan (linija HsdRccHan Wistar, ženski spol), Medicinska fakulteta UL, Medicinski eksperimentalni center, Ljubljana, 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 4,00 ± 0,02 (20 °C), Barcelona, Španija
- puferska raztopina Panreac pH 5,00 ± 0,02 (20 °C), Barcelona, Španija
- puferska raztopina Panreac pH 7,00 ± 0,02 (20 °C), Barcelona, Španija
- puferska raztopina Panreac pH 8,00 ± 0,02 (20 °C), Barcelona, Španija
- 1-% ozmijev tetroksid, 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
- 25-% vodna raztopina glutaraldehida, Serva, Heidelberg, Nemčija
- paraformaldehid, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- saharoza, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemčija

Aparature

- analizna tehtnica AG245, Mettler Toledo, Schwanenbach, Švica
- pH meter MH5750 Iskra, Kranj, Slovenija
- magnetno mešalo HI 190M, Hanna Instruments, Smithfield, 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
- termostatirana vodna kopel M3 LAUDA, Lauda-Königshofen, Nemčija
- digitalni termometer Testo-926, GmB&Co., Lenzkirch, Nemčija
- digitalni thermometer EN13485, TFA Dostmann GmbH&Co. KG, Wertheim-Reicholzheim, Nemčija
- avtomatska pipeta 2500 µL, 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, Jeol JSM 840 A, Jeol, Tokio, Japonska
- vrstični elektronski mikroskop, TESCAN VEGA 3, Tescan Orsay Holding, Brno, Češka
- presevni elektronski mikroskop, Jeol 100 CX, Jeol, Tokio, Japonska

3.1.1. Raztopine

Izotonični fosfatni pufer

Za pripravo izotoničnega fosfatnega pufera s pH 7,4 (PBS 7,4) smo na analizni tehnični zatehtali 1,190 g dinatrijevega hidrogenfosfata dodekahidrata, 0,095 g kalijevega dihidrogenfosfata in 4,000 g natrijevega klorida. Zatehte smo kvantitativno prenesli v bučko in dopolnili z destilirano vodo do oznake 0,5 L. Ko so se vse soli raztopile, smo pufru umerili pH na vrednost 7,4 z 1-molarno raztopino klorovodikove kisline, oz. z 1-molarno raztopino natrijevega hidroksida. Tako pripravljen pufer smo hranili pri 4 °C.

Fosfatni pufer s pH 4,5 (PBS 4,5) smo pripravili po enaki recepturi kot PBS 7,4, le da smo mu z 1-molarno raztopino klorovodikove kisline pH umerili na vrednost 4,5. Pufer smo hranili pri 4 °C.

Disperzije hitosana

Preučevali smo vpliv dveh različnih koncentracij hitosana in sicer 0,5-% in 0,05-% (ut/vol). Za pripravo 0,5-% disperzije smo zatehtali 125,0 mg hitosana, pri 0,05-% disperziji pa 12,5 mg hitosana. Zatehtan hitosan smo kvantitativno prenesli v 25 mL bučko in s predhodno pripravljenim PBS 4,5 dopolnili do oznake. Da se je hitosan popolnoma dispergiral, smo disperzijo mešali čez noč. Pred njegovo uporabo smo preverili pH in ga v primeru odstopanja umerili z 1-molarno raztopino klorovodikove kisline oz. 1-molarno raztopino natrijevega hidroksida na vrednost 4,5.

0,2-molaren kakodilatni pufer s pH 7,4

Pri pripravi raztopine natrijevega kakodilata smo na analizni tehtnici zatehtali 8,590 g natrijevega kakodilata, ga kvantitativno prenesli v 200 mL bučko in jo z destilirano vodo dopolnili do oznake. Mešali smo toliko časa, da se je sol popolnoma raztopila. Nato smo v 250 mL bučko odpipetirali 62,50 mL pripravljene raztopine natrijevega kakodilata in 3,37 mL 0,2-molarne klorovodikove kisline ter jo z destilirano vodo dopolnili do oznake. Tako pripravljen kakodilatni pufer smo hranili pri 4 °C.

Fiksativ za pripravo tkiva pri vrstičnem elektronskem mikroskopiranju

Pri pripravi fiksativa smo najprej zatehtali 20,0 g paraformaldehida in ga kvantitativno prenesli v litersko bučko. Vanjo smo odpipetirali še 18,87 mL 25-% vodne raztopine glutaraldehida in dopolnili do oznake z 0,2-molarnim kakodilatnim pufrom s pH 7,4. Fiksativ smo hranili pri 4 °C.

Fiksativ za pripravo tkiva pri presevnem elektronskem mikroskopiranju

Najprej smo zatehtali 45,0 g paraformaldehida in ga kvantitativno prenesli v litersko bučko. Dodali smo 18,87 mL 25-% vodne raztopine glutaraldehida in bučko dopolnili do oznake z 0,2-molarnim kakodilatnim pufrom. Pripravljen fiksativ smo hranili pri 4 °C.

0,33-molarna raztopina saharoze v 0,2-molarnem kakodilatnem pufu (pH 7,4)

Za pripravo 0,33-molarne raztopine saharoze v 0,2-molarnem kakodilatnem pufu s pH 7,4 smo zatehtali 112,959 g saharoze, jo kvantitativno prenesli v litersko bučko in jo dopolnili do oznake z 0,2-molarnim kakodilatnim pufrom (pH 7,4). Tako pripravljeno raztopino smo hranili pri 4 °C.

3.1.2. Tkivo

Sečni mehur podgan

Sečne mehurje smo izolirali iz samic podgan linije HsdRccHan Wistar na Medicinski fakulteti UL, ki ima dovoljenje za delo na izoliranih tkivih in organih ter v ta namen usmrčenih laboratorijskih podganah. Potrdilo št. U34401-4/2013/3 je izdala Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin.

Podgane so bile pred usmrtitvijo nastanjene v prostoru s sobno temperaturo, 55±10-%

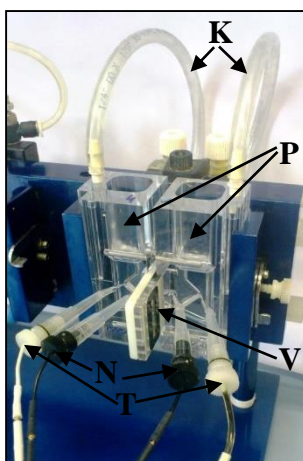
vlačnostjo in 12-urnim dnevnim in 12-urnim nočnim ciklom. Vodo in hrano so dobivale v normalnih količinah. Podgane smo usmrtili z inhalacijo v CO₂ in jim po odprtju abdominalne votline izrezali sečne mehurje. Sečne mehurje smo do začetka poskusov hranili v celičnem mediju na sobni temperaturi.

3.2. Metode

3.2.1. Merjenje TEU

Hans H. Ussing in Karl Zehrahn sta za proučevanje aktivnega transporta natrijevih ionov skozi izolirano žabjo kožo razvila t.i. Ussingove difuzijske celice. Z njimi sta spremljala difuzijo ionov in spojin skozi vpeto tkivo ter neposredno zaradi aktivnega transporta ionov tudi potencial in električni tok (57, 58). Kasneje sta George M. Grass in Stephanie A. Sweetana optimizirala Ussingovo difuzijsko celico za proučevanje difuzije zdravilnih učinkovin skozi vpeto tkivo in te celice imenujemo Sweetana/Grass celice. Sestavljene so iz vstavka s tkivom, ki ima na vsaki strani en predelek komore, ki je prepihan s plinom. Kasnejše modifikacije Sweetana/Grass celic so omogočile spremljanje elektrofizioloških parametrov vpetega tkiva in takšne celice so tudi *EasyMountTM* dvoprostorne difuzijske celice, ki smo jih uporabili v naših poskusih. Z njimi lahko vrednotimo različne lastnosti tkiva, kot so permeabilnost, pomen prenašalnih proteinov za absorpcijo učinkovin, metabolizem spojin v tkivu (11). Dvoprostorno difuzijsko celico *EasyMountTM* sestavljajo (slika 8):

- dva predelka komore,
- nastavek za tkivo,
- dve tokovni elektrodi,
- dve napetostni elektrodi in
- kanal za prepihanje s plinom (9).



Slika 8: Dvoprostorna difuzijska celica *EasyMount*TM. *K*- kanal za prepihanje s plinom, *P*- predelka komore, *V*- nastavek za tkivo, *N*- napetostni elektrodi, *T*- tokovni elektrodi.

V enem predelku komore je donorska raztopina, ki je v stiku z urotelijem sečnega mehurja, v drugem predelku pa je seroza sečnega mehurja v stiku z akceptorsko raztopino, t.i. inkubacijskim medijem. Obe raztopini ves čas prepihujemo s karbogenom, ki je zmes ogljikovega dioksida in kisika, kar omogoča oksigenacijo tkiva ter mešanje raztopine v komori. Pomembno je tudi vzdrževanje konstantne temperature s termostatsko vodno kopeljo med 36 in 37 °C (11).

Elektrofiziološki parametri

Z dvoprostornimi difuzijskimi celicami lahko merimo različne elektrofiziološke parametre:

Transepitelijski potencial (TEP) predstavlja potencial elektrokemijskega gradienta, ki ga ustvari vpet epitelij z aktivnim transportom ionov. Izmerimo ga lahko z elektrodami, ki imajo kompenzirano pozitivno oz. negativno asimetrijo ob toku 0,0 μA (s kompenzacijo izničimo napetost zaradi asimetrije med elektrodama). Izmerjen potencial predstavlja razliko med potencialom na sluznični in potencialom na serozni strani, zato potencial na serozni strani ozemljimo in tako merimo le potencial sluznične strani (11).

Nevitalno tkivo ni sposobno ustvariti elektrokemijskega gradienta, zato nam TEP kaže stopnjo vitalnosti tkiva. To je za meritve v difuzijskih celicah zelo pomembno, saj poskusi *ex vivo* lahko trajajo tudi več ur (11).

Kratkostični tok (KST) je potreben električni tok, ki teče skozi tkivo, da TEP doseže vrednost 0. Vrednost KST predstavlja celokupen transport ionov skozi epitelij, vendar moramo biti pazljivi, da je upornost raztopine kompenzirana (11).

Transepitelijska električna upornost (TEU) je upornost tkiva za prehajanje elektrolitov in nanoelektrolitov (7). Merimo jo tako, da napetost spremenimo za znano vrednost in merimo spremembo toka. TEU nato izračunamo po Ohmovem zakonu z enačbo 1:

$$TEU = (\Delta U_t / \Delta I_t) A \quad [\Omega \text{ cm}^2] \quad \text{Enačba 1}$$

U_t – Napetost ob času t [mV]

I_t – Tok ob času t [μ A]

A – Površina vpetega tkiva, ki je v stiku z raztopino [cm^2]

TEU je obratno sorazmerna s prehajanjem ionov in je sestavljena iz transcelularnega in paracelularnega prehoda (11). Ker je urotelij najbolj neprehoden epitelij v človeškem telesu, pričakujemo, da bo njegova TEU zelo velika (4). Če se poruši integriteta tkiva, je prehod skozi tkivo olajšan, zaradi česar pride tudi do zmanjšanja TEU (11).

Priprava difuzijskih celic

TEU smo merili z dvoprostornimi difuzijskimi celicami *EasyMountTM*. Raztopine imajo svojo lastno električno upornost, ki smo jo izmerili pred pričetkom poskusov s tkivom in jo upoštevali v nadaljnjih izračunih, saj bi bila v nasprotnem primeru izmerjena TEU tkiva vsota upornosti celotne stene sečnega mehurja in raztopin. Umeriti smo morali PBS 7,4 in PBS 4,5, celični medij, raztopino targesina, raztopino mitomicina C ter 0,05-% in 0,5-% disperziji hitosana. Umerjanje aparature ter kompenzacija upornosti raztopin je potekala po naslednjem postopku:

1. Vse potenciometre na aparaturi smo naravnali na 0,0.
2. Celice s praznimi vstavki za tkivo smo pritrdili na stojala za celice.
3. Vključili smo napetostno tokovni izvir in vodno kopel, ter počakali 10 min, da se je vodna kopel segrela.
4. Elektrode smo sprali s prečiščeno vodo in z njimi opremili celice. Napetostne elektrode smo namestili v odprtine bližje tkiva, tokovne elektrode pa v odprtine, ki so bile bolj oddaljene od tkiva.
5. 2–3 mL raztopine, ki smo jo umerjali, smo dali v vsak predelek komore.
6. Priključili smo dotok karbigena (95-% kisik, 5-% ogljikov dioksid).
7. Upravljalce, na katerih so izhodi za elektrode, smo nastavili na OPERATE.
8. Nastavili smo FUNCTION na OPEN ter METER na VOLTAGE. Izmerjena napetost je bila posledica asimetrije med elektrodama. Če je bila absolutna vrednost asimetrije višja od 10 mV, takšne asimetrije ni bilo možno kompenzirati,

zato smo zamenjali elektrodi. Za kompenzacijo negativne asimetrije smo nastavili OFFSET na minus (-), za kompenzacijo pozitivne asimetrije pa na plus (+). Z OFFSET potenciometrom smo naravnali napetost na 0,0 mV.

9. METER smo nastavili na CURRENT ter pritisnili testni gumb PUSH TO ADJUST. Tok, ki smo ga izmerili, je moral biti stabilen, njegova vrednost pa med 60 in 68 μA . Če je bil tok manjši ali če je padal, smo uporabili novi tokovni elektrodi. Včasih je bilo že dovolj, če smo med seboj zamenjali levo in desno tokovno elektrodo.
10. Upornost raztopine smo kompenzirali tako, da smo nastavili METER na VOLTAGE in med držanjem gumba PUSH TO ADJUST s potenciometrom FLUID RES COMPENSATION nastavili potencial na vrednost 0,0.
11. Nastavili smo FUNCTION na CLAMP ter METER na CURRENT, odčitali KST in izračunali električno upornost raztopine.

Po koncu umerjanja vseh raztopin smo sprane celice napolnili s PBS 7,4 in s tako pripravljenimi celicami počakali na prihod sečnih mehurjev.

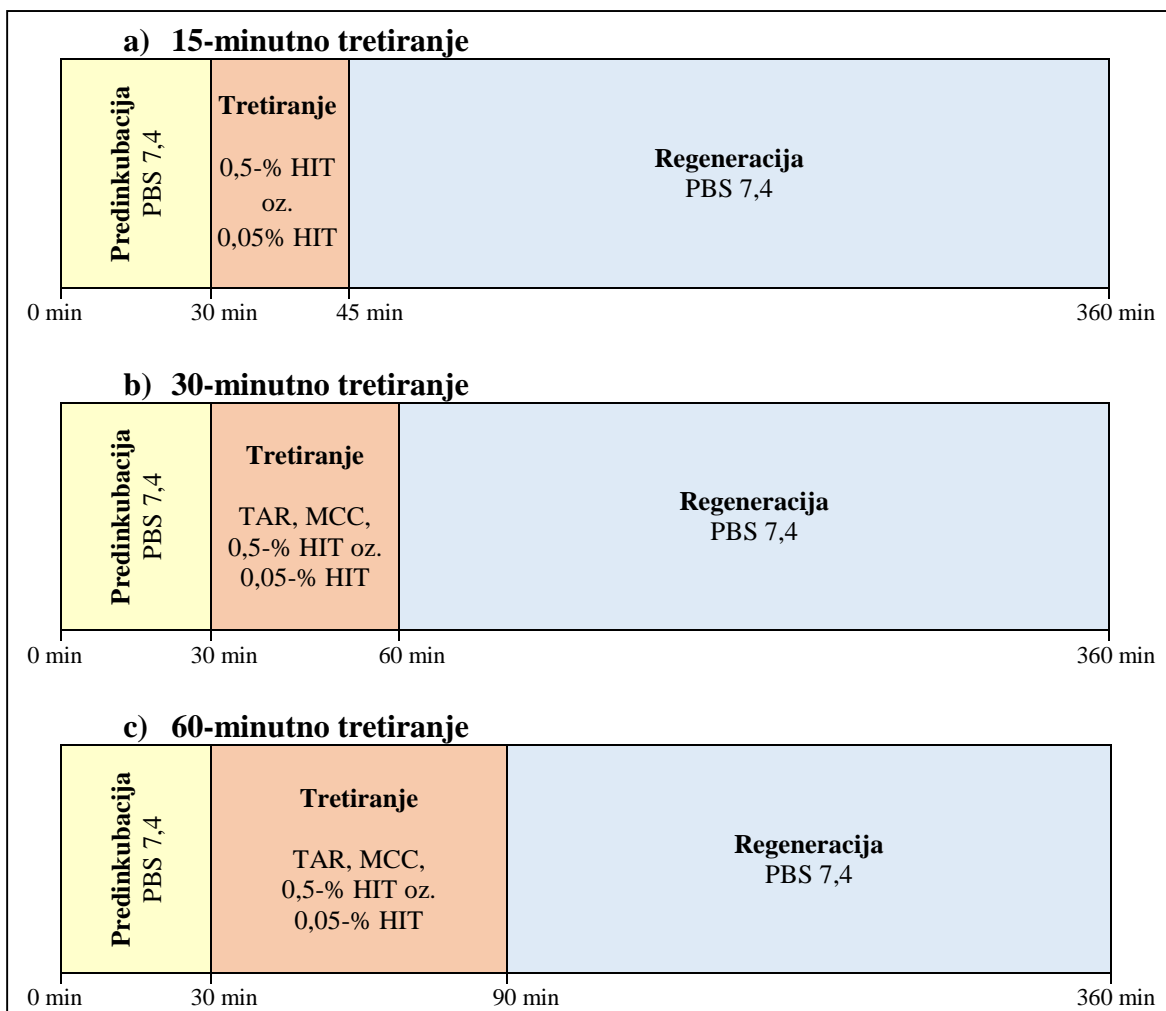
Priprava tkiva

Izolirane sečne mehurje podgan smo v celičnem mediju pri sobni temperaturi takoj prenesli iz Medicinske fakultete UL na Fakulteto za farmacijo UL, kjer smo jim odstranili odvečno vezivo ter jih prepolovili. Vsako polovico sečnega mehurja podgane smo nato vpeli v odprtino na nastavku za tkivo in nastavek vstavili med dva predelka komore. Na vsaki strani nastavka za tkivo je bila točno določena površina stene sečnega mehurja v stiku z raztopinama. Urotelij sečnega mehurja je bil v stiku z donorsko raztopino, seroza pa z akceptorsko raztopino.

Merjenje elektrofizioloških parametrov za vrednotenje TEU urotelija

Ko smo imeli v celici nastavek s sečnim mehurjem, smo na akceptorsko in donorsko stran dvoprostorne difuzijske celice dali 2,5 mL ustrezne raztopine. Na akceptorski strani je bil ves čas merjenja TEU celični medij, na donorski strani pa smo menjavali raztopine kot prikazuje slika 9. 30 min preden smo začeli z odčitavanjem elektrofizioloških parametrov smo sečni mehur inkubirali v PBS 7,4 na donorski strani in celičnim medijem na akceptorski strani, da se je tkivo privadilo na pogoje v difuzijski celici. Nato smo začeli z odčitavanjem elektrofizioloških parametrov in prvo obdobje, ki je trajalo 30 min, označili kot čas

predinkubacije. Sledilo je različno dolgo obdobje tretiranja urotelija z izbrano raztopino luščilnega sredstva (15 min, 30 min ali 60 min) in nato še obdobje regeneracije v PBS 7,4 do konca poskusa, ki se je končal pri 360 min.



Slika 9: Prikaz menjave raztopin na donorski strani difuzijskih celic. Na akceptorski strani je bil ves čas poskusa (360 min) celični medij. TAR- raztopina targesina, MCC- raztopina mitomicina C, 0,5-% HIT- disperzija hitosana z 0,5-% koncentracijo, 0,05-% HIT- disperzija hitosana z 0,05-% koncentracijo, PBS 7,4- fosfatni pufer s pH 7,4.

V obdobju predinkubacije (prvih 30 min) smo elektrofiziološke parametre odčitavali vsakih 10 minut, naslednjih 30 minut pa vsakih 5 minut. Sledilo je odčitavanje parametrov na 10 minut vse do 120 minute poskusa, nato pa na 20 minut vse do konca poskusa (t=360 min).

Elektrofiziološke parametre smo odčitavali po naslednjih korakih:

- Odčitanje TEP: Nastavili smo FUNCTION na OPEN ter METER na VOLTAGE.
- Odčitanje KST: Nastavili smo FUNCTION na CLAMP ter METER na CURRENT (11).

Med vsako menjavo raztopine v donorskem predelku komore 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 raztopine, ki je sledila po načrtu, prikazanem na sliki 9. Pri menjavi raztopine luščilnega sredstva za PBS smo komoro dvakrat sprali z destilirano vodo in nato še enkrat s fosfatnim pufrom (pH 7,4).

Predhodno smo pripravili dva fosfatna puфра po enaki recepturi, enega smo umerili na pH 7,4, drugega na pH 4,5. PBS 7,4 smo uporabili pri vseh poskusih kot donorsko raztopino v obdobju predinkubacije in regeneracije, saj je optimalno fiziološko sprejemljiv. Poleg tega smo PBS 7,4 uporabili pri kontrolnih poskusih za luščilni sredstvi targesin in mitomicin C kot donorsko raztopino v obdobju tretiranja, saj je najbolj podoben medijem, v katerih sta bila raztopljena targesin in mitomicin C.

Hitosan je zaradi svojih šibkih bazičnih lastnosti v nevtralnem in bazičnem mediju netopen, zato je PBS 7,4 za hitosan neprimeren disperzni medij (9). Pri pripravi disperzije hitosana smo tako uporabili PBS 4,5, ki so ga uporabili tudi že v predhodnih raziskavah s hitosanom na uroteliju in je znotraj fizioloških vrednosti pH urina (6, 8, 9, 43). PBS 4,5 smo uporabili tudi pri kontrolnih poskusih za hitosan kot donorsko raztopino v obdobju tretiranja. Tkivo smo v kontrolnih poskusih izpostavili PBS 4,5 za 60 minut, saj je to najdaljše obdobje, ko je bil pri poskusih s hitosanom urotelij izpostavljen relativno nizki pH vrednosti.

Po končanem poskusu smo nastavke s tkivom vzeli iz difuzijske celice in tkivo zavrgli oziroma odvzeli za analizo z elektronsko mikroskopijo. Elektrode smo sprali s prečiščeno vodo in jih shranili v 3-molarnem kalijevem kloridu v hladilniku. Celice in nastavke za tkivo smo očistili v ultrazvočnih kadičkah, na koncu pa smo jih sprali še s prečiščeno vodo. Sušili smo jih pri sobni temperaturi (11).

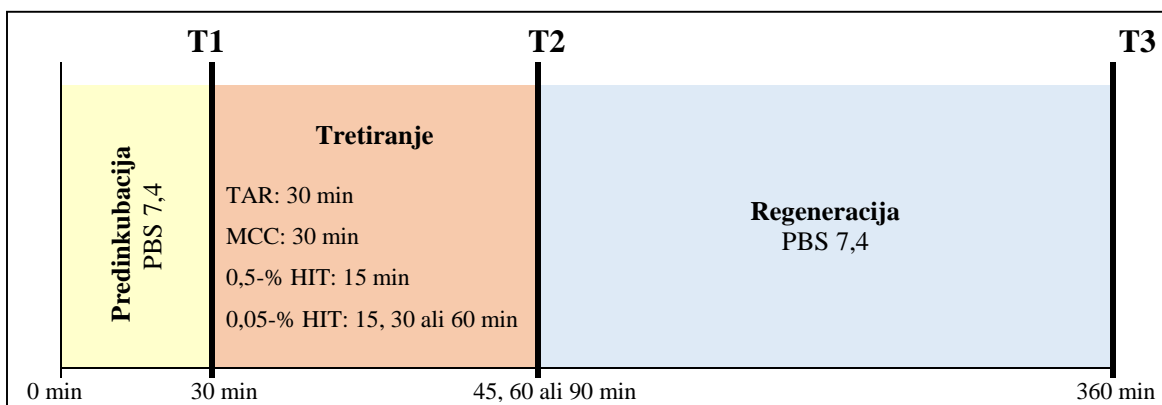
3.2.2. Analiza morfologije tkiva

Delovanje luščilnih sredstev na urotelij sečnega mehurja podgan smo morfološko ovrednotili z vrstičnim elektronskim mikroskopom in s presevnim elektronskim mikroskopom.

Odvzem tkiva po poskusih ex vivo

Sečne mehurje smo mikroskopsko ovrednotili v treh izbranih časovnih točkah, T1, T2 in T3

(slika 10). Časovna točka T1 predstavlja čas po končani 30-minutni predinkubaciji, ko je urotelij sečnega mehurja intakten. Časovna točka T2 predstavlja čas ob koncu tretiranja tkiva z luščilnim sredstvom. Vrednotili smo vpliv 30-minutnega tretiranja tkiva s targesinom oziroma mitomicinom C, vpliv 15-minutnega tretiranja z 0,5-% hitosanom ter vpliv 15-minutnega, 30-minutnega in 60-minutnega tretiranja tkiva z 0,05-% hitosanom. Časovna točka T3 je končna točka regeneracije tkiva v PBS 7,4 (360 min).



Slika 10: Časovne točke, v katerih smo sečni mehur morfološko ovrednotili. TAR- raztopina targesina, MCC- raztopina mitomicina C, 0,5-% HIT- disperzija hitosana z 0,5-% koncentracijo, 0,05-% HIT- disperzija hitosana z 0,05-% koncentracijo, PBS 7,4- fosfatni pufer s pH 7,4.

Tkivo, ki smo ga mikroskopirali, smo v posamezni časovni točki previdno sneli z nastavka za tkivo difuzijske celice in ga takoj prenesli v fiksativ za vrstično oz. presevno elektronsko mikroskopijo.

Vrstična elektronska mikroskopija

Sečni mehur podgan smo takoj po prenosu v fiksativ (mešanica 2-% paraformaldehida in 2-% glutaraldehida v 0,2-molarnem kakodilatnem pufri s pH 7,4) s sagitalnimi rezi prerezali na dva enako velika koščka.

Po tri in pol urni fiksaciji pri 4 °C smo koščke tkiva čez noč spirali z 0,2-molarnim kakodilatnim pufrom s pH 7,4 in jih naslednji dan eno uro ozmirali z 1-% ozmijevim tetroksidom. Po dehidraciji z acetonom smo koščke tkiva posušili pri kritični točki CO₂ s Critical Point Dryerjem, naprašili z zlatom in opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) pri 15 kV.

Presevna elektronska mikroskopija

Sečni mehur podgan smo v fiksativu, ki je mešanica 4,5-% paraformaldehida in 2-% glutaraldehida v 0,2-molarnem kakodilatnem pufru s pH 7,4, takoj razrezali na več majhnih koščkov (velikosti 1 mm³) in jih pustili fiksirati tri ure pri 4 °C.

Po končani fiksaciji smo koščke sečnega mehurja čez noč spirali z 0,33-molarno saharozo v 0,2-molarnem kakodilatnem pufru s pH 7,4 pri 4 °C. Naslednji dan je sledila enourna sekundarna fiksacija z 1-% ozmijevim tetroksidom in kasneje še enourno kontrastiranje z 2-% uranil acetatom pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje z destilirano vodo in dehidriranje v etanolu naraščajočih koncentracij. Po dehidraciji smo koščke tkiva vklopili v umetno smolo Epon 812, ki je v termostatu pri višjih temperaturah (60–80 °C) postopno polimerizirala in se strčila. Strjeno vklopno smolo skupaj s tkivom smo z ultramikrotomom narezali na približno 50 nm debele ultratanke rezine, te pa smo nato še kontrastirali s svinčevim citratom in jih opazovali s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM).

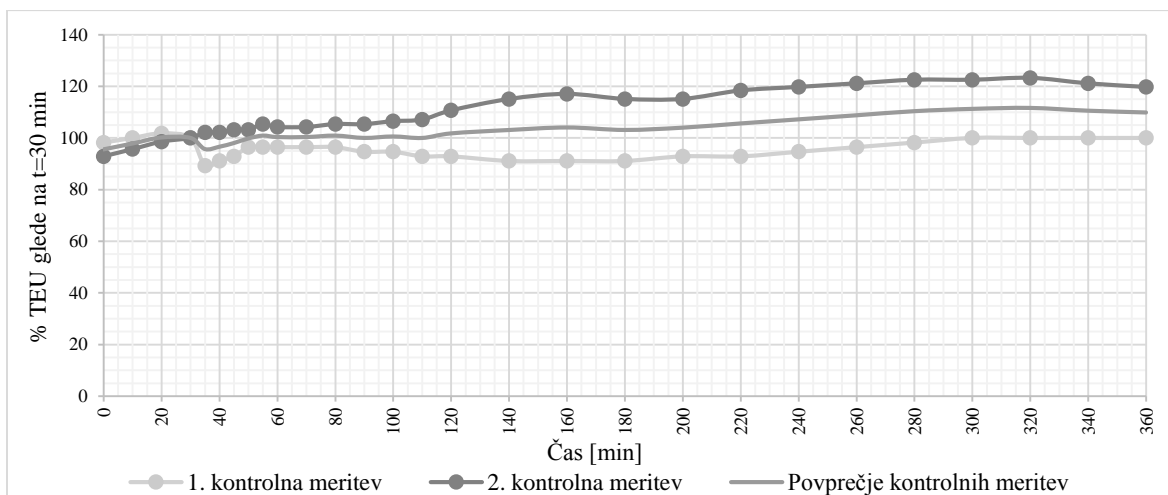
4. REZULTATI

4.1. Rezultati meritev transepitelijske električne upornosti stene sečnega mehurja podgan

Z meritvami transepitelijske električne upornosti (TEU) smo ovrednotili barierno funkcijo stene sečnega mehurja podgan. Pri vseh treh uporabljenih luščilnih sredstvih (targesinu, mitomicinu C in hitosanu) smo spreminjali čas tretiranja tkiva z luščilnimi sredstvi, pri hitosanu pa tudi koncentracijo disperzije. Absolutne vrednosti TEU smo zaradi boljše preglednosti rezultatov pretvorili tudi v relativne vrednosti, saj so se osnovne TEU stene sečnega mehurja med seboj zelo razlikovale (predinkubacijske vrednosti so nihale med 50 in $500 \Omega\text{cm}^2$). Relativne vrednosti smo preračunali glede na vrednost TEU pri posameznem sečnem mehurju ob času 30 min (pred začetkom tretiranja tkiva z luščilnimi sredstvi), ki smo jo določili za 100-%.

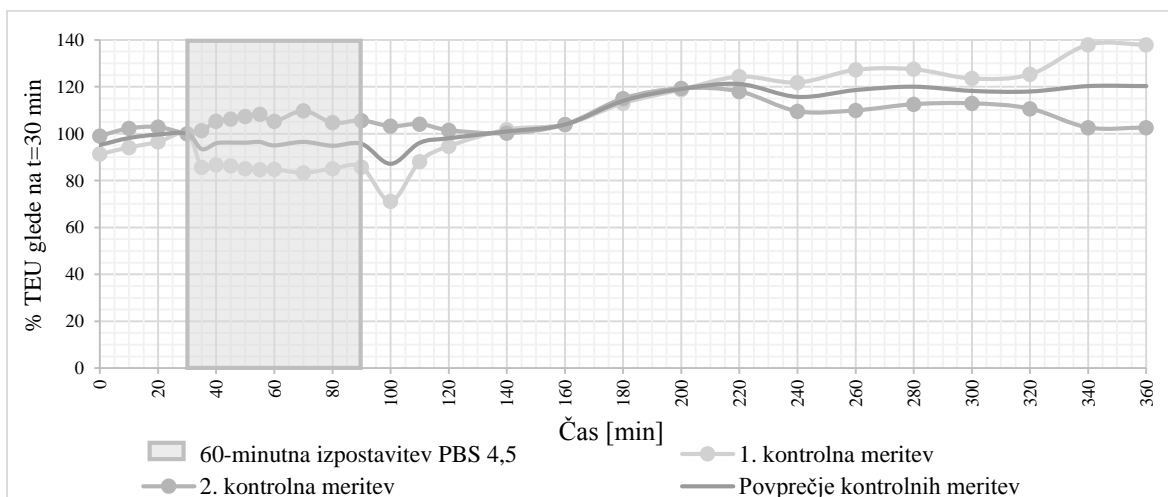
4.1.1. Rezultati kontrolnih poskusov

Namen kontrolnih poskusov je bil dokazati, da sam PBS 7,4 ali 4,5 ter uporabljeni eksperimentalni pogoji ne vplivajo na barierno funkcijo urotelija. Sečne mehurje smo v kontrolnih poskusih izpostavili enakim pogojem kot pri poskusih z luščilnimi sredstvi, le da smo v obdobju tretiranja kot donorsko raztopino uporabili PBS 7,4 oziroma PBS 4,5. Urotelij je bil v stiku pufrom 60 min, ker je to najdaljši čas tretiranja urotelija z luščilnimi sredstvi. Rezultate kontrolnih poskusov s PBS 7,4 smo uporabili pri vrednotenju luščilcev targesina in mitomicina C, rezultate kontrolnih poskusov s PBS 4,5 pa pri vrednotenju vpliva hitosana. Na sliki 11 so predstavljene relativne vrednosti meritev TEU stene sečnih mehurjev, ki so bili izpostavljeni PBS 7,4 vseh 360 min poskusa in njihovo povprečje. TEU stene sečnih mehurjev tekom poskusa rahlo narašča in povprečna vrednost ob koncu poskusa doseže 110 %. Absolutne in relativne vrednosti TEU so zbrane v prilogi 1.



Slika 11: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen PBS 7,4 360 min in njuno povprečje.

Relativne vrednosti meritev TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil 60 min izpostavljeni PBS 4,5 in njihovo povprečje so prikazane na sliki 12, vse absolutne in relativne vrednosti TEU pa so zbrane v prilogi 2. Povprečna vrednost relativne TEU je tekom inkubacije tkiva v PBS 4,5 rahlo padla (povprečno okoli 5 %), v času regeneracije pa je postopoma naraščala in ob koncu poskusa dosegla 120-% vrednost.

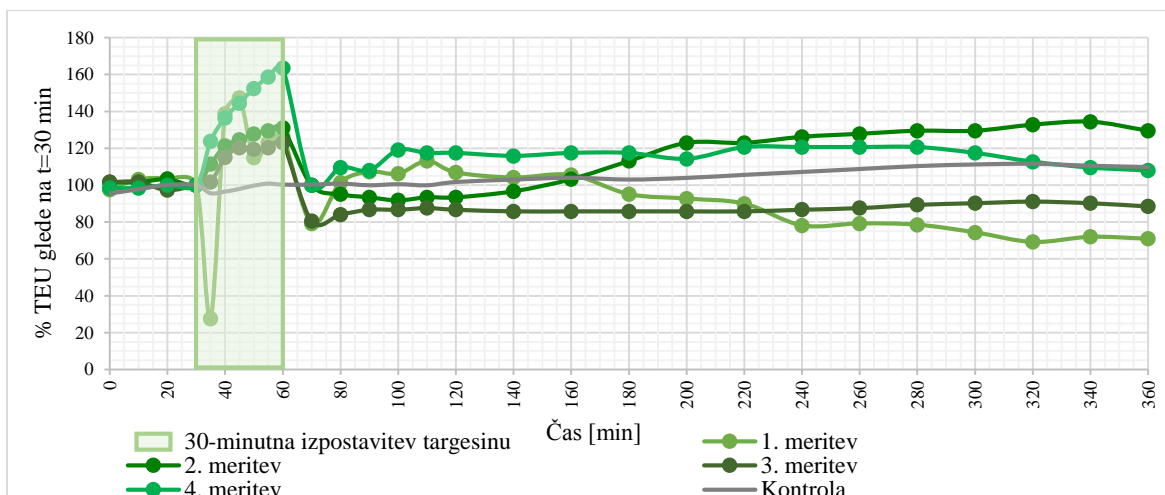


Slika 12: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen PBS 4,5 60 min in njuno povprečje. Osenčen predel označuje 60-minutno obdobje izpostavljenosti urotelija PBS 4,5.

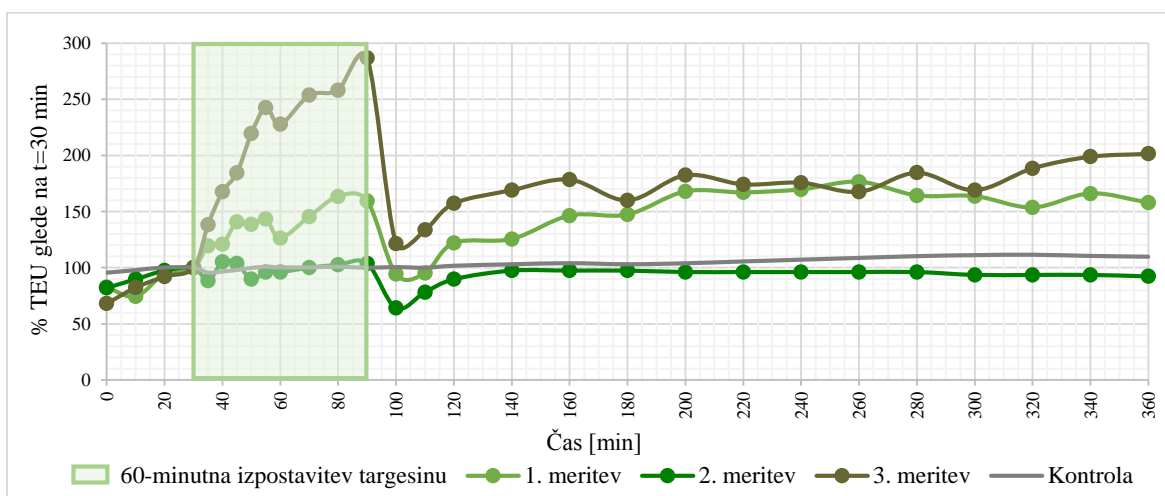
4.1.2. Rezultati poskusov s targesinom

Pri poskusih s targesinom smo spreminjali čas izpostavljenosti tkiva luščilnemu sredstvu in sicer smo urotelij izpostavili targesinu za 30 oziroma 60 min. Koncentracije targesina nismo

spreminjali, saj smo uporabili že pripravljeno koloidno raztopino, ki se uporablja v klinični praksi. Na slikah 13 in 14 so prikazane relativne vrednosti TEU sečnih mehurjev izpostavljenih targesinu 30 min oz. 60 min. Absolutne in relativne vrednosti TEU za posamezne meritve so zbrane v prilogah 3 in 4.



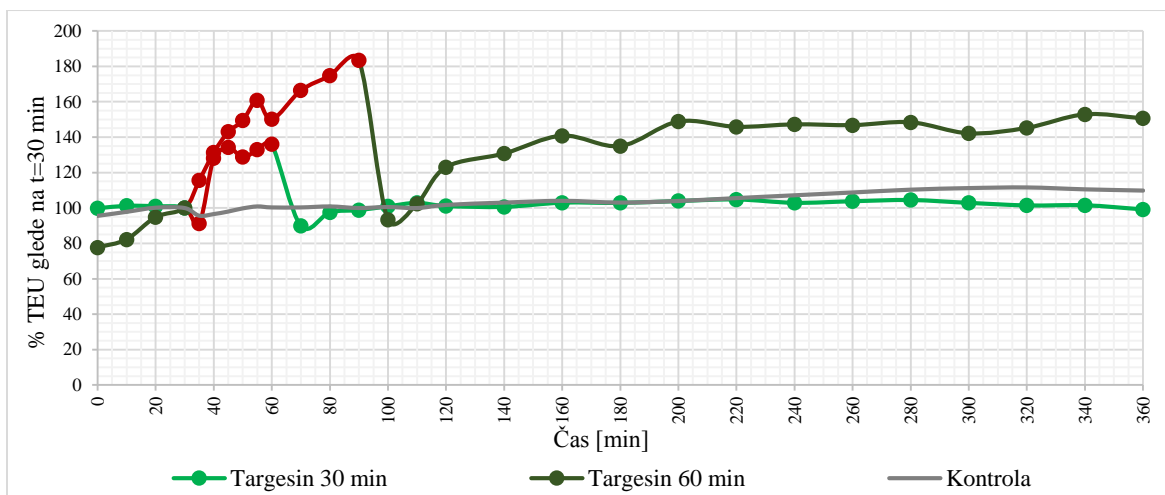
Slika 13: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen targesinu 30 min. Osenčen predel označuje 30-minutno obdobje izpostavljenosti urotelija targesinu.



Slika 14: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen targesinu 60 min. Osenčen predel označuje 60-minutno obdobje izpostavljenosti urotelija targesinu.

Slika 15 predstavlja povprečni vrednosti relativnih TEU za stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil targesinu izpostavljen 30 oziroma 60 min. TEU stene sečnega mehurja se je v času izpostavljenosti urotelija targesinu zviševala. Ob koncu izpostavitve urotelija targesinu je bilo povečanje TEU stene sečnega mehurja odvisno od časa izpostavitve targesinu. Pri 30-minutnem tretiranju urotelija se je TEU povečala za dodatnih 35 % in pri 60-minutnem

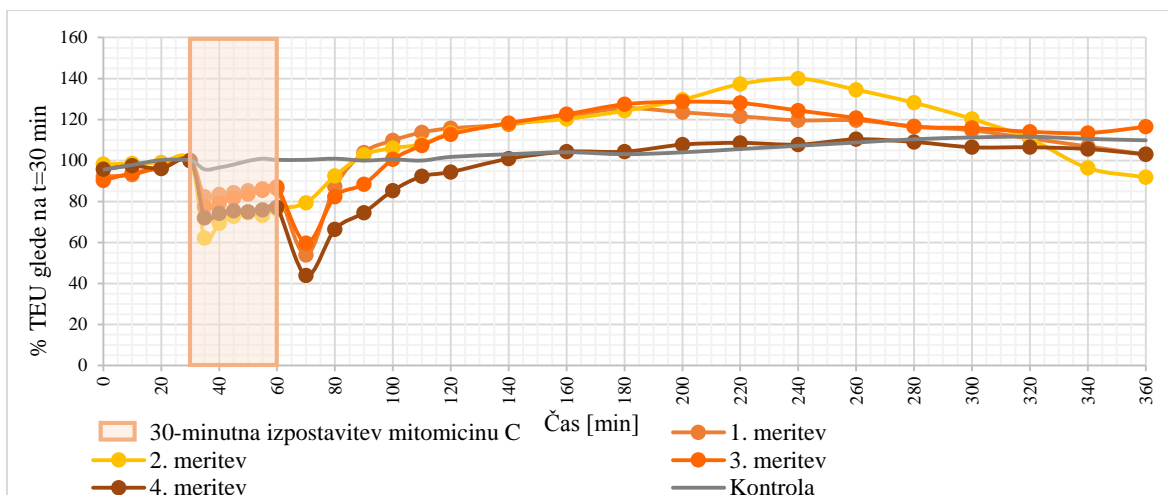
tretiranju za dodatnih 85 %. Ob menjavi targesina s PBS 7,4 je prišlo do nenadnega padca TEU stene sečnega mehurja, vendar je ta po padcu začela takoj naraščati. V primeru 30-minutnega tretiranja je ob koncu poskusa narasla na 100-% vrednost TEU, v primeru 60-minutnega tretiranja pa na 150-% vrednost.



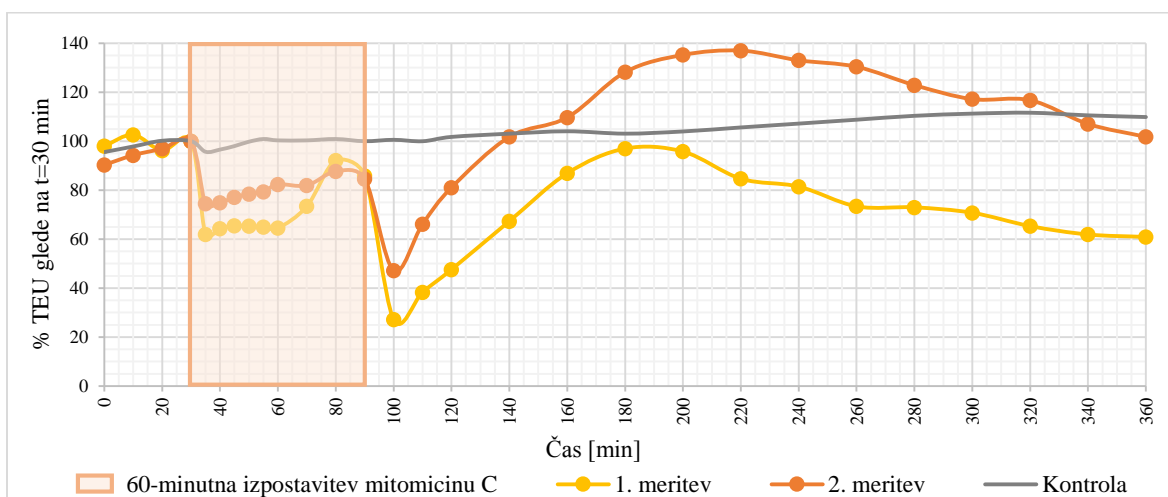
Slika 15: Povprečne relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen targesinu 30 oz. 60 min. Rdeče obarvan del krivulj označuje 30-minutno oziroma 60-minutno obdobje izpostavljenosti urotelija targesinu.

4.1.3. Rezultati poskusov z mitomicinom C

Pri poskusih z mitomicinom C smo spreminjali samo čas izpostavljenosti urotelija učinkovini, saj smo uporabili že pripravljeno raztopino mitomicina C, ki se uporablja v klinični praksi za zdravljenje površinskega raka sečnega mehurja. Urotelij smo mitomicinu C izpostavili za 30 ali 60 min. Na slikah 16 in 17 so predstavljene relativne vrednosti meritev TEU za urotelije sečnih mehurjev, ki so bili izpostavljeni mitomicinu C 30 oz. 60 min. Absolutne in relativne vrednosti TEU so zbrane v prilogah 5 in 6.

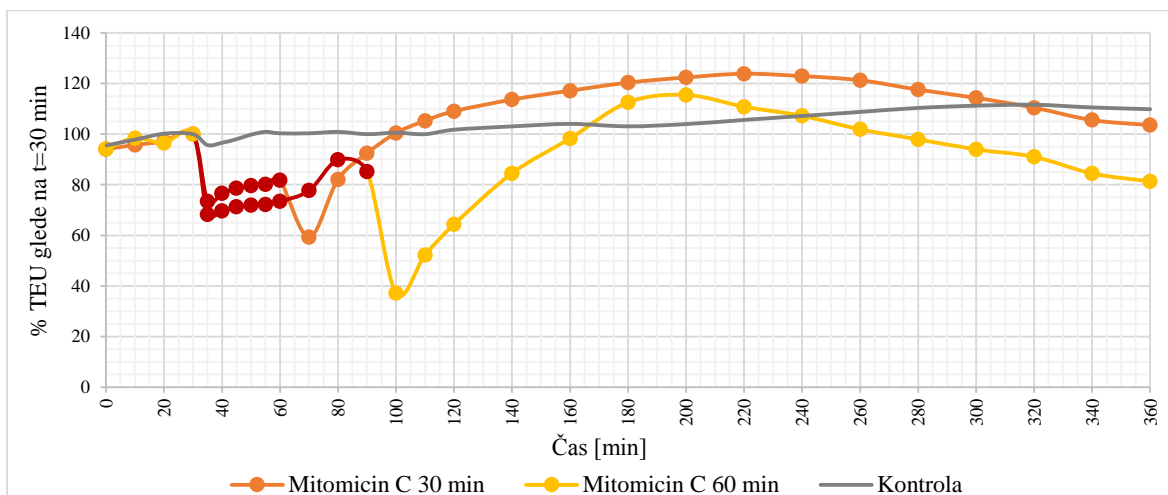


Slika 16: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen mitomicinu C 30 min. Osenčen predel označuje 30-minutno obdobje izpostavljenosti urotelija mitomicinu C.



Slika 17: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen mitomicinu C 60 min. Osenčen predel označuje 60-minutno obdobje izpostavljenosti urotelija mitomicinu C.

Povprečne vrednosti relativnih TEU smo združili na sliki 18. Opazimo lahko, da je TEU stene sečnega mehurja takoj po aplikaciji mitomicina C na urotelij padla za 25–35 % glede na začetno vrednost. TEU se je nato med tretiranjem z mitomicinom C počasi povečevala, vendar je še vedno ostala nižja od 100 %. Po nadomestitvi mitomicina C s PBS 7,4 je TEU najprej močno padla, nato pa se je v fazi regeneracije hitro dvignila do začetne vrednosti. V primeru 30-minutne izpostavljenosti urotelija mitomicinu C se je TEU stene sečnega mehurja vrnila na 100-% vrednost po približno 40 minutah in v primeru 60-minutne izpostavitve po približno 80 minutah regeneracije.



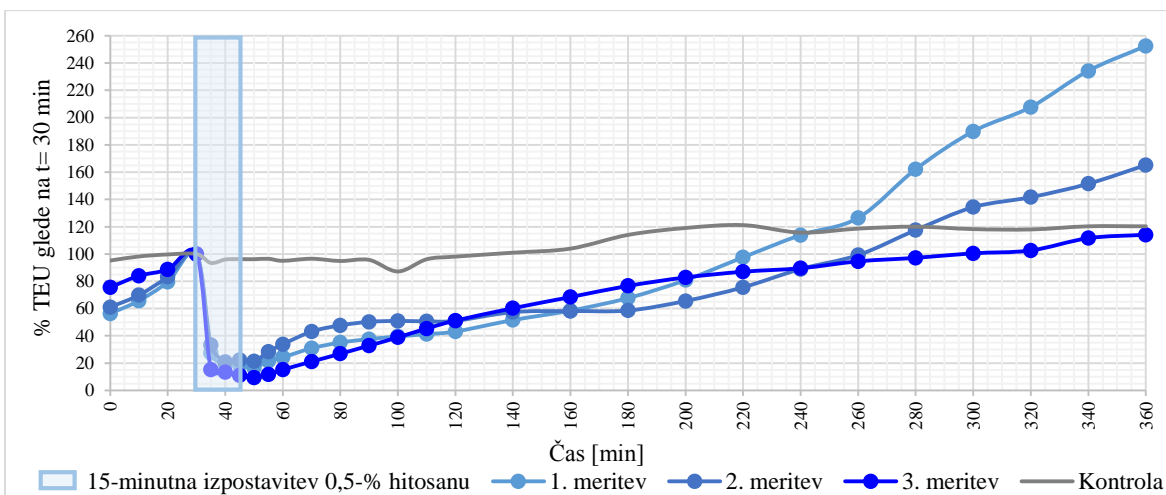
Slika 18: Povprečne relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen mitomicinu C 30 oz. 60 min. Rdeče obarvan del krivulj označuje 30-minutno oziroma 60-minutno obdobje izpostavljenosti urotelija mitomicinu C.

4.1.4. Rezultati poskusov s hitosanom

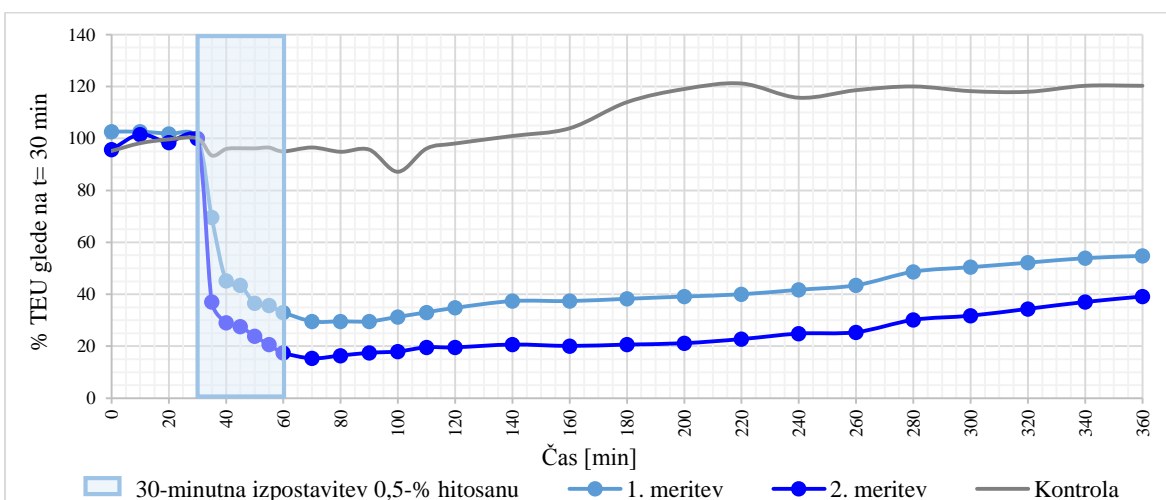
Pri poskusih s hitosanom smo spreminjali tako čas izpostavljenosti urotelija hitosanu kot tudi koncentracijo polimera. Pri naših poskusih smo urotelij izpostavili 0,5-% in 0,05-% hitosanu za 15, 30 oziroma 60 min.

4.1.4.1. Rezultati poskusov z 0,5-% hitosanom

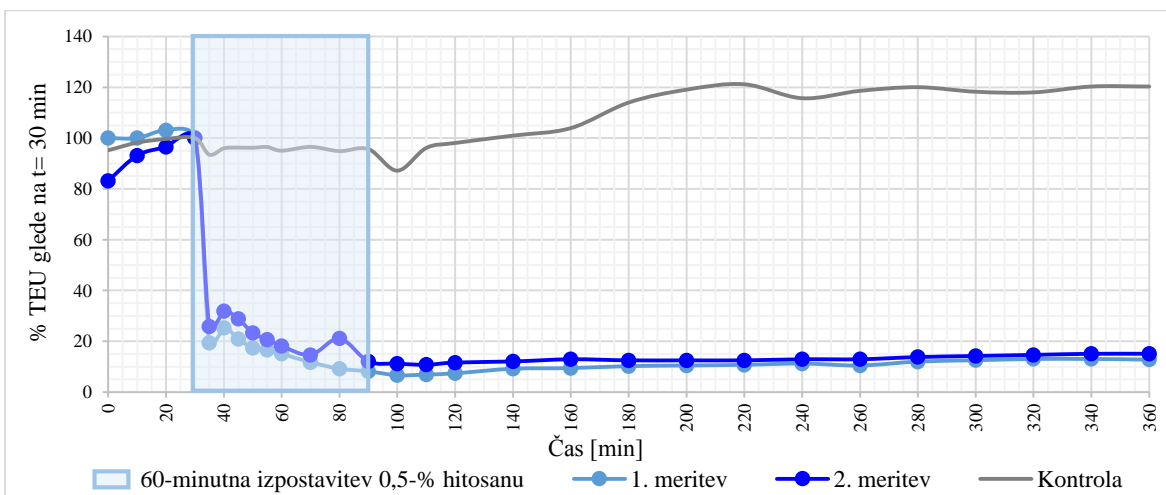
Slike 19–21 prikazujejo relativne vrednosti TEU sten sečnih mehurjev, ki so imeli urotelij izpostavljen 0,5-% hitosanu 15, 30 oz. 60 min. Absolutne vrednosti meritev so zbrane v prilogah 7–9.



Slika 19: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen 0,5-% hitosanu 15 min. Osenčen predel označuje 15-minutno obdobje izpostavljenosti urotelija 0,5-% hitosanu.

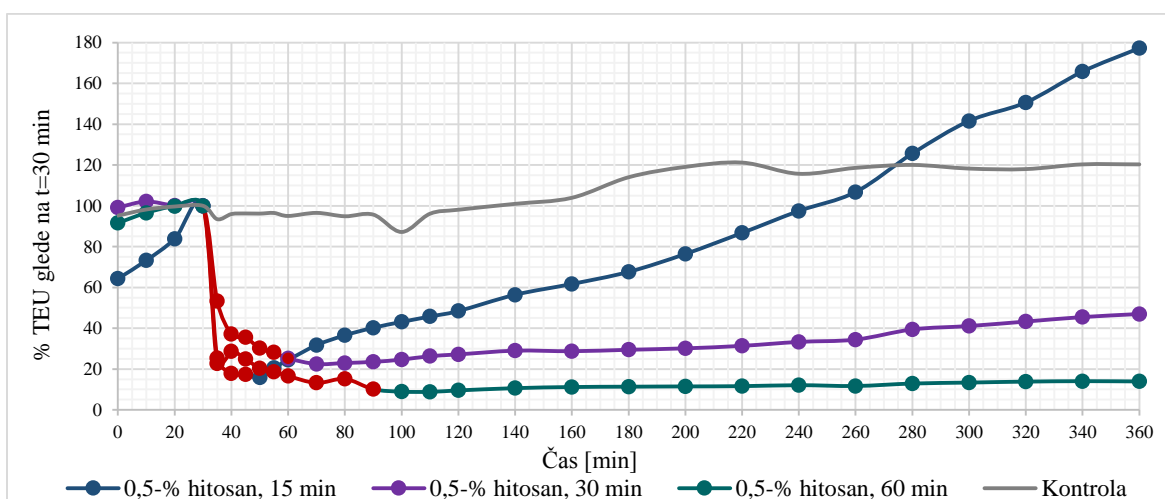


Slika 20: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen 0,5-% hitosanu 30 min. Osenčen predel označuje 30-minutno obdobje izpostavljenosti urotelija 0,5-% hitosanu.



Slika 21: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen 0,5-% hitosanu 60 min. Osenčen predel označuje 60-minutno obdobje izpostavljenosti urotelija 0,5-% hitosanu.

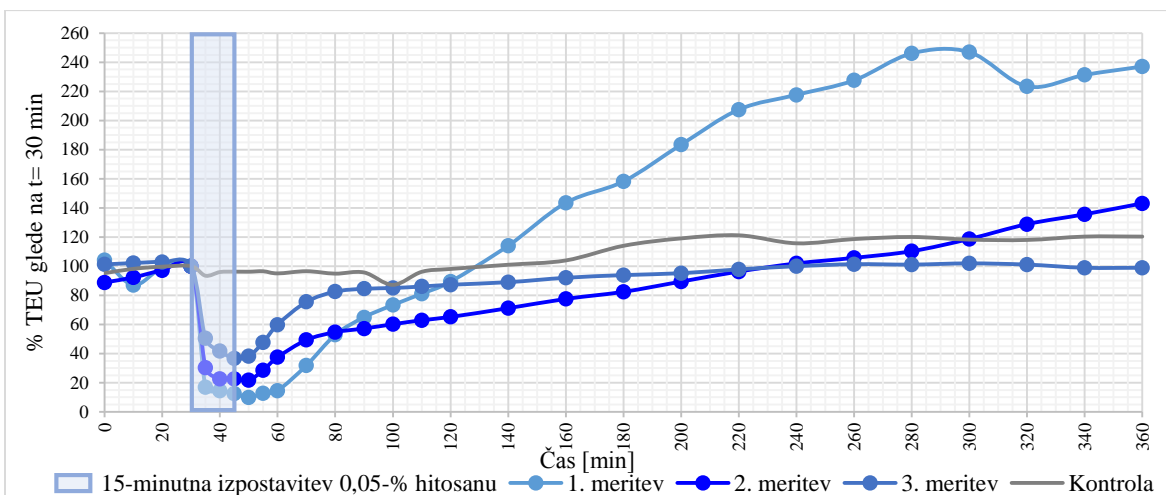
Na sliki 22 so predstavljena povprečja relativnih vrednosti TEU sečnih mehurjev, ki so bili različno časa izpostavljeni 0,5-% hitosanu. Iz grafa je razvidno, da pri vseh treh časih TEU že na začetku tretiranja s hitosanom močno pade (za 65–85 %) in nato še dodatno počasi pada tekom celega obdobja tretiranja. V obdobju regeneracije se je v primeru 15-minutne izpostavitve urotelija TEU vrednost vrnila na 100 % po približno 200 minutah regeneracije v PBS 7,4, medtem ko v primeru 30- in 60-minutne izpostavitve urotelija 0,5-% hitosanu ni prišlo do regeneracije niti ob koncu poskusa (360 min).



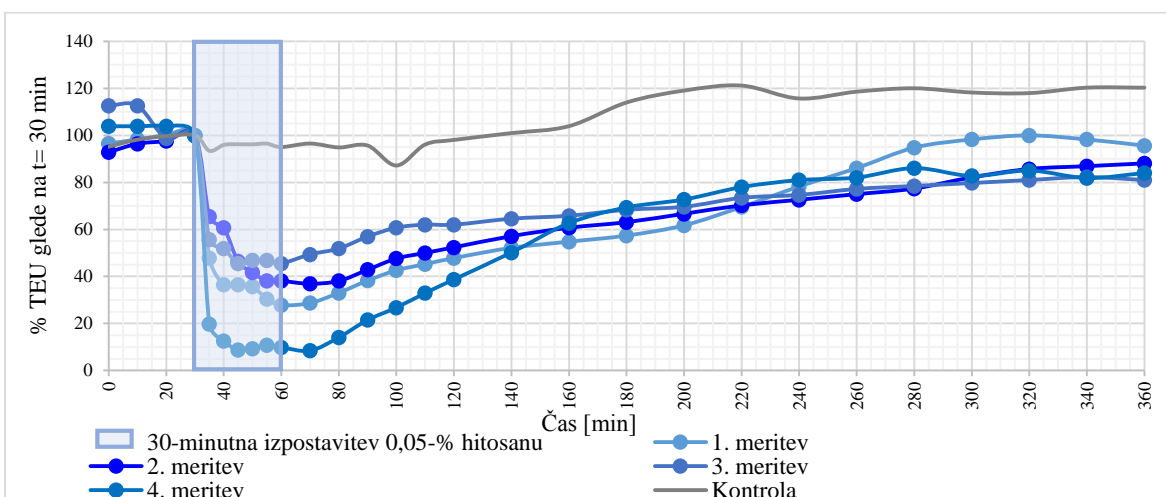
Slika 22: Povprečne relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen 0,5-% hitosanu 15, 30 oz. 60 min. Rdeče obarvan del krivulj označuje 15-minutno, 30-minutno oziroma 60-minutno obdobje izpostavljenosti urotelija 0,5-% hitosanu.

4.1.4.2. Rezultati poskusov z 0,05-% hitosanom

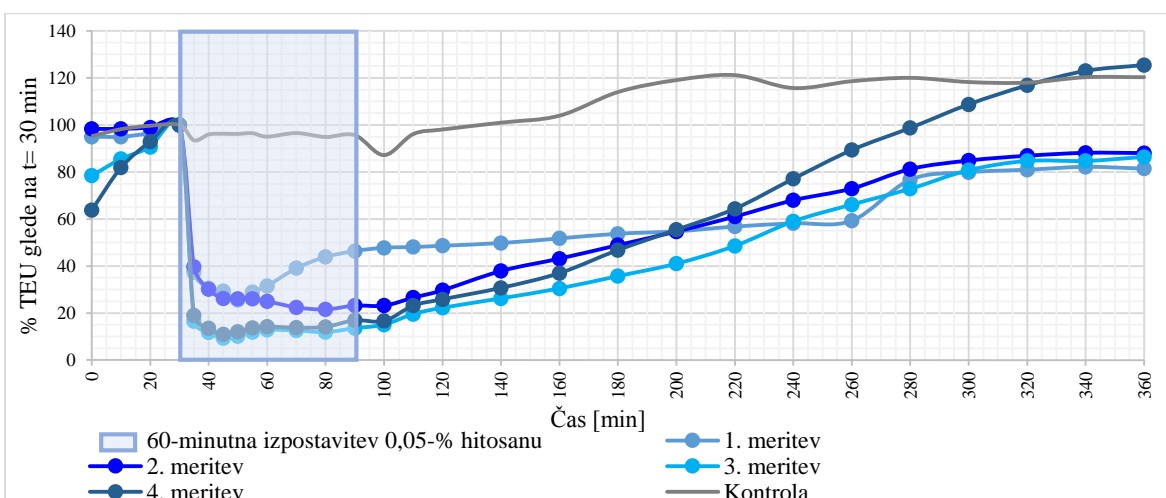
Slike 23–25 prikazujejo relativne vrednosti TEU za sečne mehurje, ki so imeli urotelij 15, 30 oz. 60 min v stiku z 0,05-% hitosanom. Vsi rezultati meritev in izračuni so zbrani v prilogah 10–12.



Slika 23: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelj je bil izpostavljen 0,05-% hitosanu 15 min. Osenčen predel označuje 15-minutno obdobje izpostavljenosti urotelija 0,05-% hitosanu.

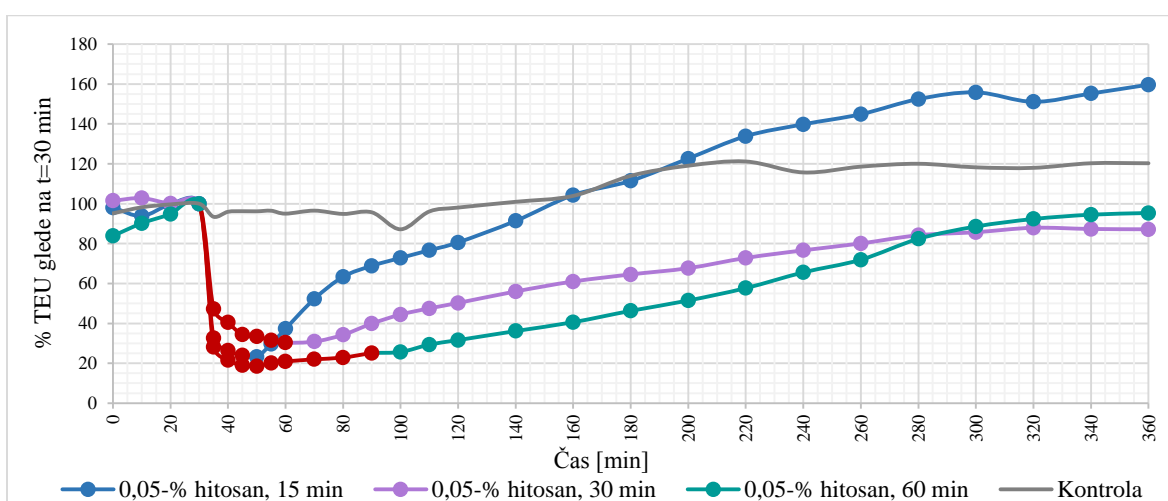


Slika 24: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelj je bil izpostavljen 0,05-% hitosanu 30 min. Osenčen predel označuje 30-minutno obdobje izpostavljenosti urotelija 0,05-% hitosanu.



Slika 25: Relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelj je bil izpostavljen 0,05-% hitosanu 60 min. Osenčen predel označuje 60-minutno obdobje izpostavljenosti urotelija 0,05-% hitosanu.

Povprečne vrednosti TEU sečnih mehurjev, ki smo jih tretirali z 0,05-% hitosanom, smo združili na sliki 26. Opazimo lahko, da je vrednost TEU na začetku tretiranja v vseh treh primerih (15-, 30- in 60-minutno tretiranje) močno padla in sicer za 65–80 %. TEU sečnih mehurjev je nato tekom tretiranja padala še naprej, v primeru 60-minutnega tretiranja pa je ob koncu tega obdobja že začela naraščati. V obdobju regeneracije je vrednost TEU v vseh treh primerih naraščala, a je 100 % vrednost dosegla samo v primeru 15-minutnega tretiranja in sicer že po približno 100 minutah regeneracije. V primeru 30-minutnega tretiranja se je TEU na koncu regeneracije ($t=360$ min) vrnila na 85 %, v primeru 60-minutnega tretiranja pa na 95 % začetne vrednosti TEU.



Slika 26: Povprečne relativne vrednosti TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen 0,05-% hitosan 15, 30 oz. 60 min. Rdeče obarvan del krivulj označuje 15-minutno, 30-minutno oziroma 60-minutno obdobje izpostavljenosti urotelija 0,05-% hitosan.

4.2. Rezultati mikroskopske analize urotelija *ex vivo*

Luščenje urotelija podgan smo analizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) in s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM). Z obema vrstama elektronske mikroskopije smo ugotavljali, kako obsežna je odlučena površina urotelija po delovanju luščilnih sredstev in s tem posredno, kako učinkovito je posamezno luščilno sredstvo.

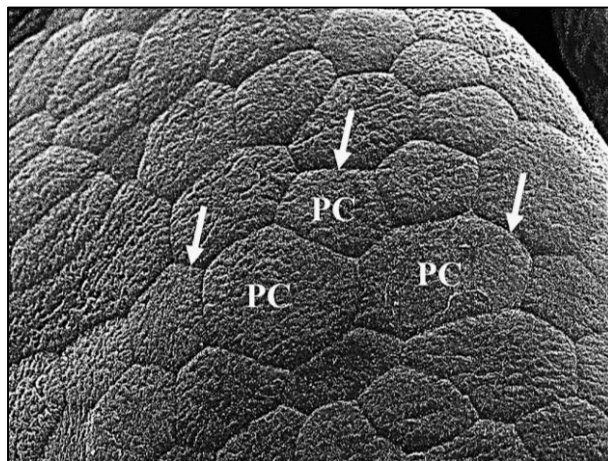
Mikroskopsko smo urotelije analizirali v treh časovnih točkah (slika 10 v Materialih in metodah). Časovna točka T1 predstavlja čas po 30-minutni predinkubaciji v PBS 7,4, torej tik pred začetkom obdobja tretiranja z luščilnim sredstvom. Časovna točka T2 predstavlja čas po koncu izpostavitve urotelija posameznem luščilnem sredstvu (targesinu,

mitomicinu C in 0,5-% oz. 0,05-% hitosanu). Časovna točka T3 je končna točka poskusa ($t=360$ min) in predstavlja tudi konec obdobja regeneracije urotelija v PBS 7,4. V tem obdobju je potekala obnova urotelija po luščenju.

4.2.1. Rezultati kontrolnih poskusov (izpostavitve urotelija PBS 4,5)

4.2.1.1. Časovna točka T1

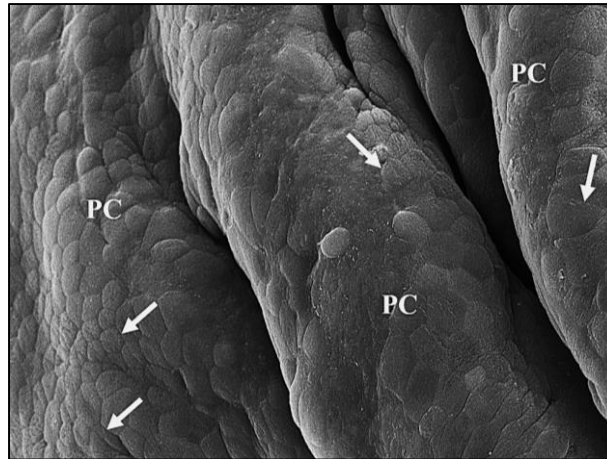
Pregled urotelija s SEM je pokazal homogeno populacijo površinskih celic, ki so bile značilne heksagonalne oblike in velike 50–100 μm , njihova apikalna plazmalema pa je bila značilno školjkasto nazobčana (slika 27).



Slika 27: Urotelij v časovni točki T1. Značilen izgled intaktnega urotelija s površinskimi celicami (PC) heksagonalne oblike in nagubano apikalno plazmalemo. Tesni stiki na mejah med površinskimi celicami so jasno vidni (*puščice*). SEM; povečava: x 2980.

4.2.1.2. Časovna točka T2

Mikroskopska analiza s SEM je pokazala homogeno populacijo površinskih celic z dobro razvitimi medceličnimi stiki. V uroteliju nismo zasledili ne luščenja in ne odmiranja urotelijskih celic (slika 28).

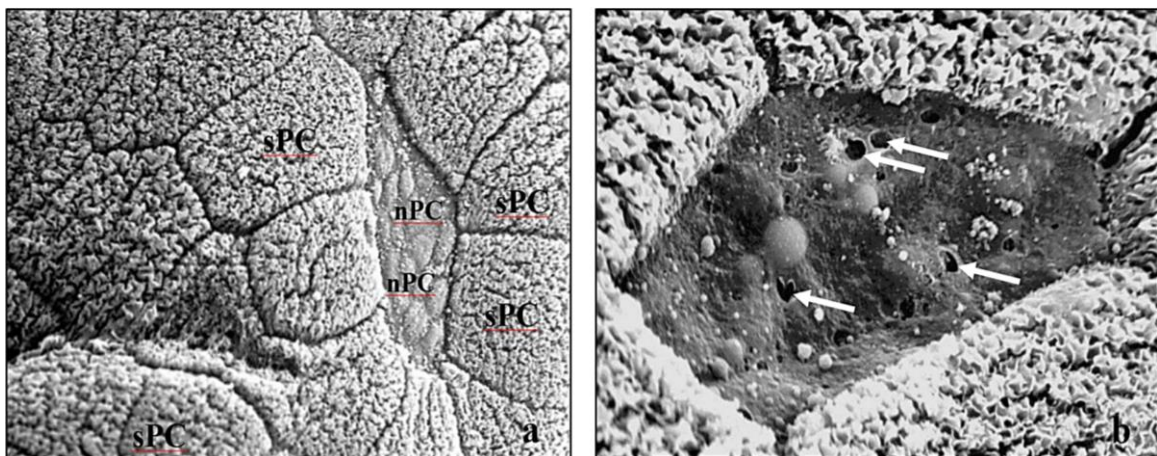


Slika 28: Urotelij v časovni točki T2. Homogena površina urotelija s površinskimi celicami (PC) in jasno vidnimi mejami med njimi (*puščice*). SEM; povečava: x 1030.

4.2.2. Rezultati poskusov s targesinom

4.2.2.1. Časovna točka T2

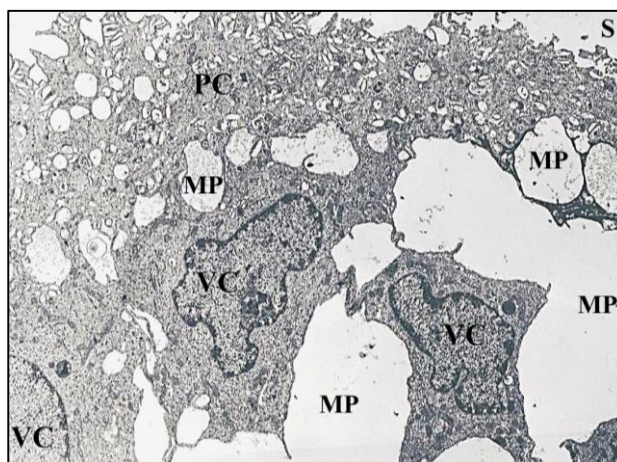
Pregled urotelija s SEM je pokazal nehomogeno odluščen urotelij (slika 29a). Odluščile so se številne posamične površinske celice, večjih predelov luščenja nismo opazili. Zaradi luščenja površinskih celic so se na površini urotelija izpostavile manjše vmesne celice, ki so po odluščenju površinske celice postale »nove« površinske celice. Nekatere med njimi so kazale znake nekroze (slika 29b).



Slika 29: Urotelij v časovni točki T2. **a)** Neodluščene »stare« površinske celice (*sPC*) obdajajo številne majhne »nove« površinske celice (*nPC*). **b)** Nekrotske poškodbe plazmaleme (*puščice*) »novih« površinskih celic. SEM; povečavi: a) x 850, b) x 2500.

S TEM smo zasledili večinoma triskladen urotelij, na posamičnih mestih pa zaradi luščenja le dvoskladen urotelij. V notranjosti urotelija smo opazili množično prekinjanje medceličnih

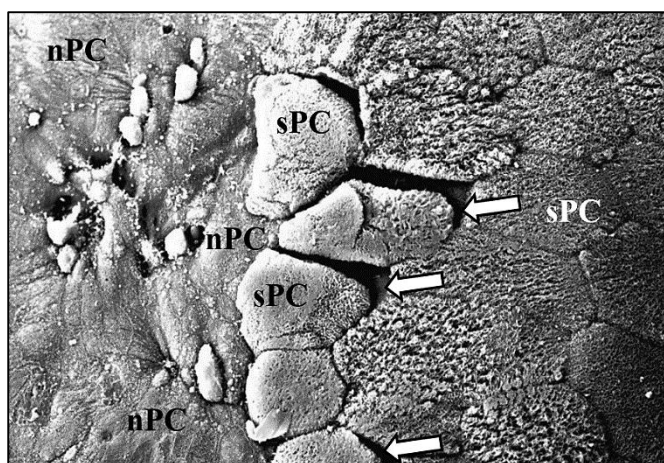
stikov, zlasti med površinskimi in vmesnimi celicami, kot tudi med sosednjimi vmesnimi celicami, zaradi česar so bili medcelični prostori močno povečani (slika 30).



Slika 30: Urotelij v časovni točki T2. Povečani medcelični prostori (MP) med površinskimi celicami (PC) in vmesnimi celicami (VC) ter med sosednjimi vmesnimi celicami. S-svetlina sečnega mehurja. TEM; povečava: x 5100.

4.2.2.2. Časovna točka T3

S SEM smo na površini urotelija opazili heterogeno populacijo celic. Prisotna so bila še neodluščena področja s »starimi« površinskimi celicami, našli pa smo tudi odluščene predele z »novimi« površinskimi celicami. Te so bile na najnižji stopnji celične diferenciacije, saj so imele na svoji apikalni površini številne mikrovile (sliki 31, 32).

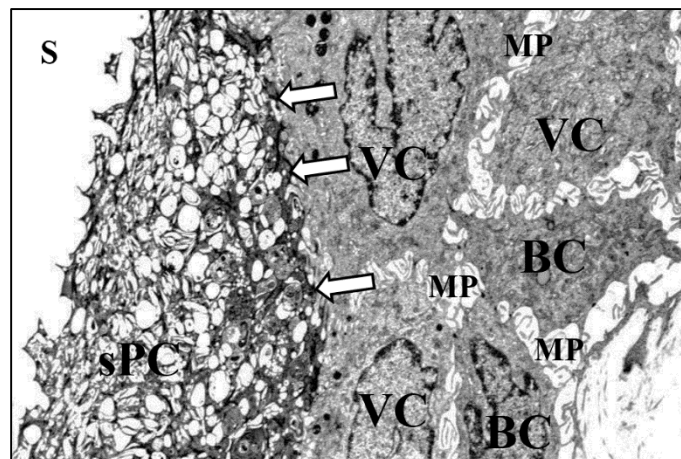


Slika 31: Urotelij v časovni točki T3. Na meji med neodluščenim predelom s »starimi« površinskimi celicami (sPC) in odlušenim predelom z »novimi« površinskimi celicami (nPC) se prekinjajo stiki med »starimi« površinskimi celicami (puščice). SEM; povečava: x 650.



Slika 32: Urotelij v časovni točki T3. »Nove« površinske celice so na nizki stopnji diferenciacije in imajo na svoji apikalni površini mikrovile. Tesni stiki na mejah med celicami so dobro razviti (*puščice*). SEM; povečava: x 4300.

Heterogeno stanje v uroteliju smo potrdili tudi s TEM. Opazili smo neodluščena območja in odlučene predele z »novimi« površinskimi celicami, med katerimi so bili medcelični stiki že dobro razviti. V neodluščenih območjih urotelija so bili med »starimi« površinskimi celicami še prisotni intaktni medcelični stiki, v globini urotelija pa so bili medcelični prostori zaradi prekinjanja medceličnih stikov povečani (slika 33).

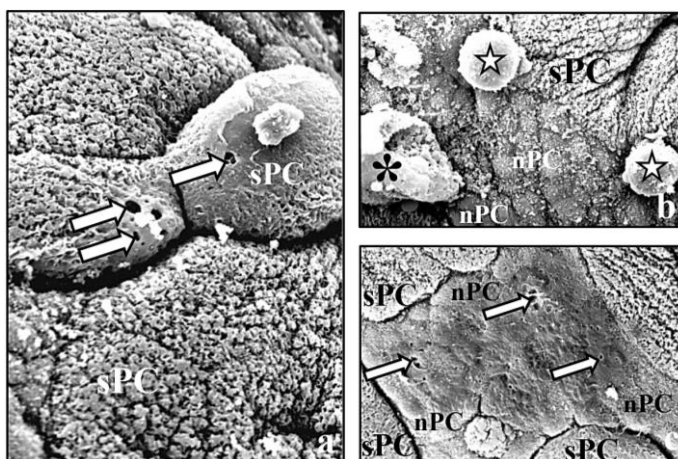


Slika 33: Urotelij v časovni točki T3. Neodluščen predel urotelija, kjer so še prisotne »stare« površinske celice (*sPC*). Te so z intaktnimi medceličnimi stiki (*puščice*) povezane z vmesnimi celicami (*VC*). V notranjosti urotelija so medcelični prostori (*MP*) povečani med sosednjimi vmesnimi celicami (*VC*) ter med vmesnimi in bazalnimi celicami (*BC*). S- svetlina mehurja. TEM; povečava: x 2600.

4.2.3. Rezultati poskusov z mitomicinom C

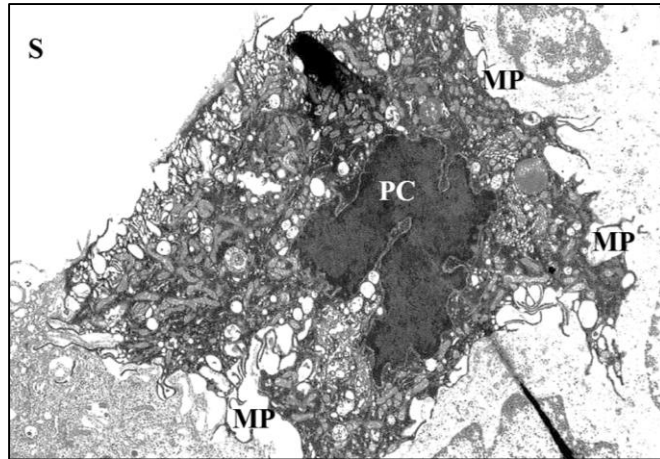
4.2.3.1. Časovna točka T2

S SEM smo opazili obsežne odlučene površine urotelija, kjer so se odlučile le površinske celice in tudi neodluščene predele s »starimi« površinskimi celicami. Luščenja v globino urotelija nismo zasledili. Opazili smo tudi številne apoptotske celice in nekrotske in celice (slika 34).



Slika 34: Urotelij v časovni točki T2. a) Nekrotske poškodbe (*puščice*) apikalne plazmaleme »starih« površinskih celic (*sPC*). b) Apoptotski celici (*peterokraki zvezdi*) na meji med odluščnim predelom z »novimi« površinskimi celicami (*nPC*) in neodluščnim predelom s »starimi« površinskimi celicami (*sPC*). Na površini odluščnega predela je nekrotska »stara« površinska celica (*). c) Nekrotske poškodbe (*puščice*) apikalne plazmaleme »novih« površinskih celic (*nPC*). SEM; povečava: a) x 1500, b) x 800, c) x 1300.

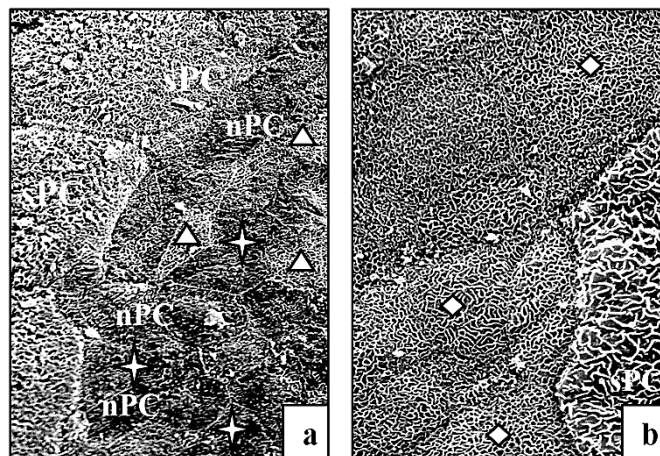
Analiza s TEM je potrdila triskladen urotelij na neodluščenih področjih in dvoskladen urotelij na odluščnih področjih, obsežno luščenje površinskih celic, množično prekinjanje medceličnih stikov na površini in v notranjosti urotelija ter prisotnost nekrotskih celic (slika 35).



Slika 35: Urotelij v časovni točki T2. Površinska celica (*PC*) v zgodnji fazi apoptoze, okoli nje so povečani medcelični prostori (*MP*). *S*- svetlina sečnega mehurja. TEM; povečava: x 6300.

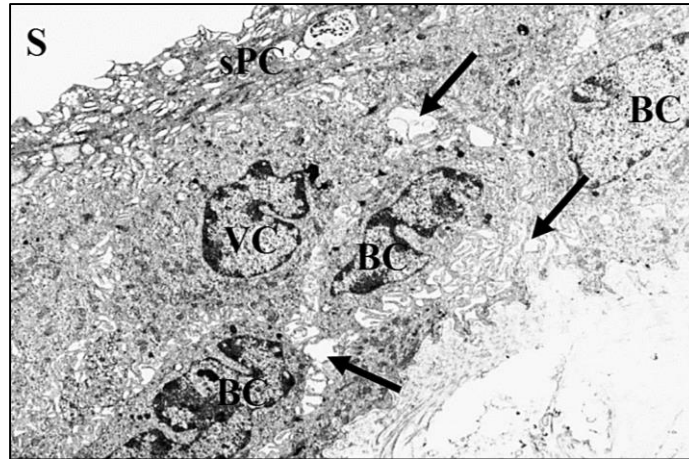
4.2.3.2. Časovna točka T3

Pregled s SEM je pokazal neodluščene predele ter odluščene predele z izpostavljenimi »novimi« površinskimi celicami, ki so bile na različnih stopnjah diferenciacije. Nediferencirane celice so imele na svoji apikalni površini številne mikrovile, delno diferencirane pa vrvičaste grebene (slika 36).



Slika 36: Urotelij v časovni točki T3. **a)** »Stare« površinske celice (*sPC*) mejijo na odluščeno področje z »novimi« površinskimi celicami (*nPC*) z mikrovili (*štirikrake zvezde*) in z vrvičastimi nesklenjenimi grebeni (*trikotniki*). **b)** Del »stare« površinske celice (*sPC*) meji na manjše »nove« površinske celice z vrvičastimi sklenjenimi grebeni (*karo*). SEM; povečavi: a) x 1100, b) x 3000.

Analiza urotelija s TEM je potrdila prisotnost odluščenih in neodluščenih predelov urotelija. V neodluščenih predelih, kjer je bil urotelij triskladen in so bile površinske celice med seboj tesno povezane z medceličnimi stiki, smo pod njimi opazili razširjene medcelične prostore zaradi prekinjenih stikov med celicami vmesnega in bazalnega sklada (slika 37).



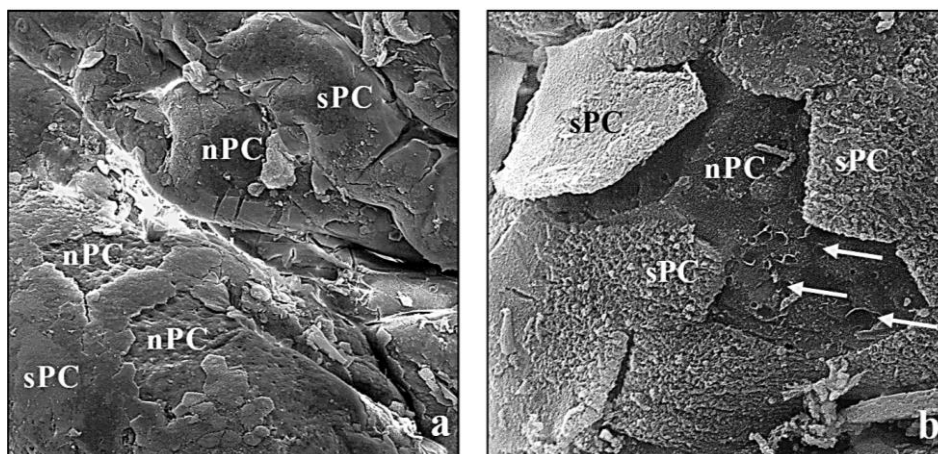
Slika 37: Urotelij v časovni točki T3. V neodluščenem predelu urotelija so pod »staro« površinsko celico (*sPC*) povečani medcelični prostori (*puščice*) med sosednjimi celicami vmesnega (*VC*) in bazalnega sklada (*BC*). *S*- svetlina sečnega mehurja. TEM; povečava: x 5100.

4.2.4. Rezultati poskusov s hitosanom

4.2.4.1. Rezultati poskusov s 15-minutnim delovanjem 0,5-% hitosana

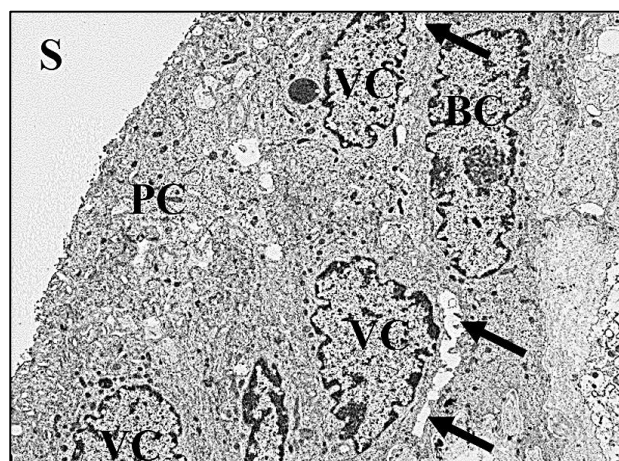
4.2.4.1.1. Časovna točka T2

Pregled urotelija s SEM je pokazal neenakomerno odluščeno površino urotelija, kjer so se odluščile posamezne površinske celice ali različno velike skupine površinskih celic (slika 38a). Na nekaterih odluščenih področjih smo opazili nekrotske poškodbe plazmaleme »novih« površinskih celic (slika 38b).



Slika 38: Urotelij v časovni točki T2. **a)** Neenakomerno odluščen urotelij z »novimi« površinskimi celicami (*nPC*) na odluščenih predelih in obsežni neodluščeni predeli s »starimi« površinskimi celicami (*sPC*). **b)** Predel luščenja s »staro« površinsko celico (*sPC*), ki je še delno pritrjena na urotelij. Izpostavljene »nove« površinske celice (*nPC*) imajo značilne nekrotske poškodbe apikalne plazmaleme (*puščice*). SEM; povečavi: a) x 569, b) x 4450.

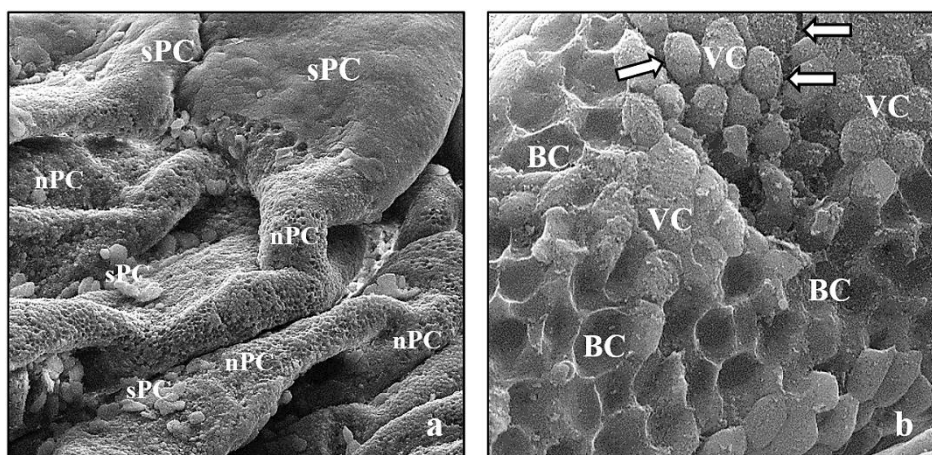
S TEM smo našli neodluščene predele, kjer je bil urotelij triskladen in odluščene predele z dvoskladnim urotelijem. Povečane medcelične prostore zaradi množičnega prekinjanja stikov med vmesnimi in med vmesnimi in bazalnimi celicami smo opazili tako pri dvoskladnem kot tudi pri triskladnem uroteliju (slika 39).



Slika 39: Urotelij v časovni točki T2. Neodluščen triskladen urotelij s prekinjenimi medcelični stiki (*puščice*) med vmesno (VC) in bazalno celico (BC). PC- površinska celica, S- svetlina sečnega mehurja. TEM; povečava: x 2600.

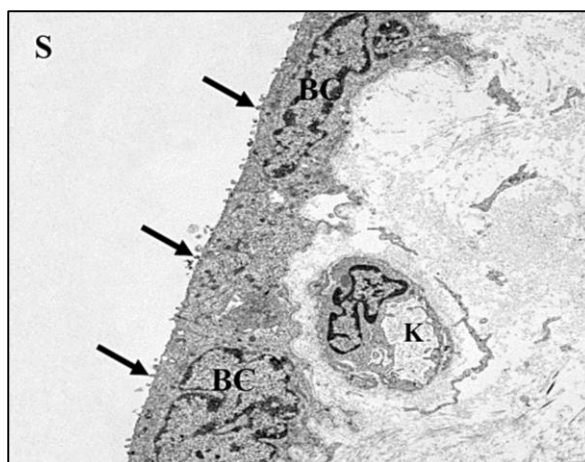
4.2.4.1.2. Časovna točka T3

S SEM smo opazili zelo heterogeno površino urotelija z neodluščenimi in odluščenimi predeli (slika 40a). Luščile so se zlasti površinske celice in na površini so se izpostavile vmesne celice, ponekod pa je luščenje segalo še globlje in na površini so se izpostavile celo bazalne celice (slika 40b).



Slika 40: Urotelij v časovni točki T3. **a)** Neodluščen predel urotelija s »starimi« površinskimi celicami (*sPC*) in odluščen predel, kjer so na površini izpostavljene »nove« površinske celice (*nPC*). **b)** Odluščen predel urotelija z izpostavljenimi vmesnimi celicami (VC) in bazalnimi celicami (BC). Med izpostavljenimi vmesnimi celicami so vidni prekinjeni stiki (*puščice*). SEM; povečavi: a) x 602, b) x 6170.

S TEM smo potrdili heterogeno stanje urotelija. Opazili smo intakten triskladen urotelij, dvoskladen urotelij z odluščenimi površinskimi celicami in celo enoskladen urotelij, kjer so se odluščile površinske in vmesne celice ter so se na površini izpostavile bazalne celice (slika 41).

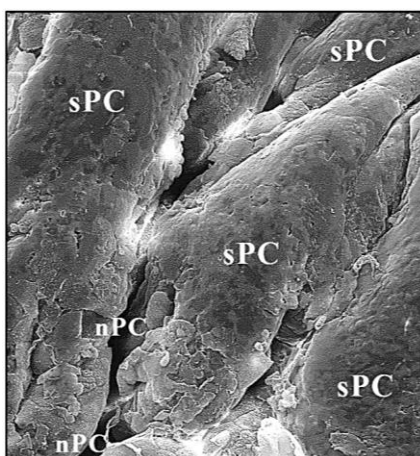


Slika 41: Urotelij v časovni točki T3. Enoskladni urotelij z izpostavljenimi bazalnimi celicami (BC) na površini. Bazalne celice imajo na apikalni površini številne mikrovile (*puščice*). S- svetlina sečnega mehurja, K- kapilara. TEM; povečava: x 2200.

4.2.4.2. Rezultati poskusov s 15-minutnim delovanjem 0,05-% hitosana

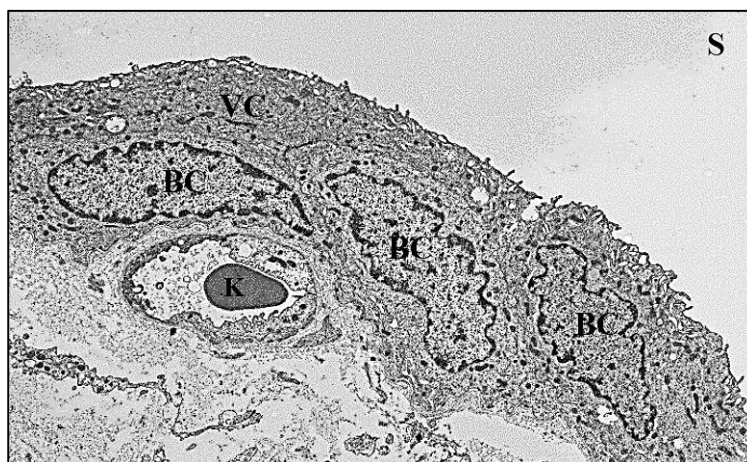
4.2.4.2.1. Časovna točka T2

Analiza s SEM je pokazala, da je urotelij večinoma neodluščen z redkimi in neobsežnimi odluščenimi predeli (slika 42).



Slika 42: Urotelij v časovni točki T2. Prevladujoča neodluščena površina urotelija s »starimi« površinskimi celicami (*sPC*) ter manjši odluščeni predeli z »novimi« površinskimi celicami (*nPC*) na površini. SEM; povečava: x 955.

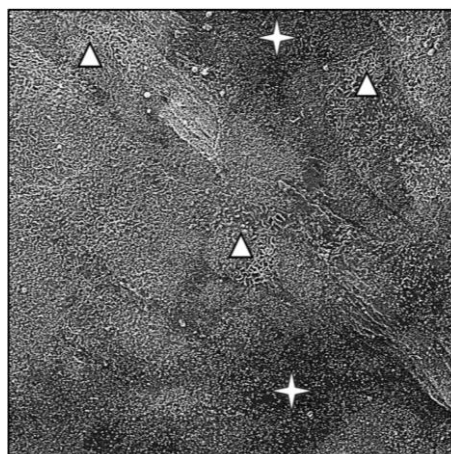
S TEM smo potrdili, da je urotelij večinoma triskladen z izjemo redkih odluščenih predelov, kjer je urotelij iz dveh skladov celic (slika 43).



Slika 43: Urotelij v časovni točki T2. Predel odluščenega dvoskladnega urotelija z vmesnimi celicami (VC) in bazalnimi celicami (BC). S- svetlina sečnega mehurja, K- kapilara. TEM; povečava: x 2600.

4.2.4.2.2. Časovna točka T3

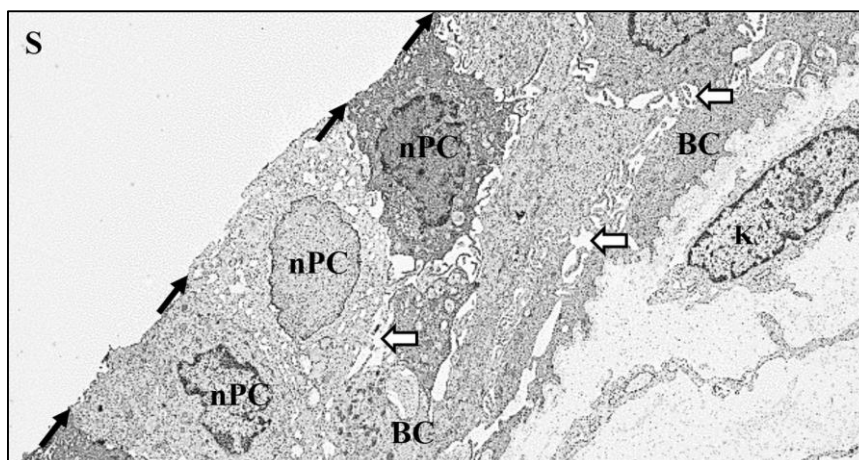
Analiza s SEM je pokazala enakomerno odluščeno celotno površino urotelija, ki so jo gradile »nove« površinske celice. Te celice so bile majhne, z mikrovili ali vrvičastimi grebeni na apikalni plazmalemi, kar dokazuje, da so bile na nizki stopnji celične diferenciacije (slika 44).



Slika 44: Urotelij v časovni točki T3. Homogena populacija »novih« površinskih celic na površini urotelija z mikrovili (*štirikrake zvezde*) ali vrvičastimi grebeni (*trikotniki*) na svoji apikalni površini. SEM; povečava: x 8910.

S TEM smo potrdili, da je urotelij dvoskladen, vendar pa smo med celicami obeh skladov opazili povečane medcelične prostore, ki dokazujejo prekinjanje medceličnih stikov. Izjema

so bili dobro razviti tesni stiki, ki so povezovali »nove« površinske celice na površini urotelija (slika 45).

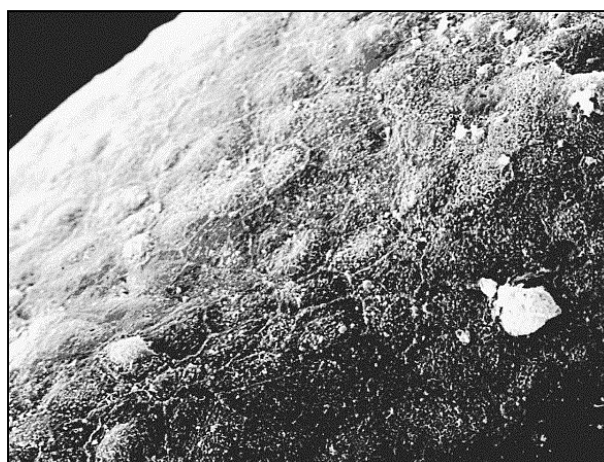


Slika 45: Urotelij v časovni točki T3. Medcelični prostori (*bele puščice*) med »novimi« površinskimi celicami (*nPC*) in bazalnimi celicami (*BC*) so povečani, medtem ko so tesni stiki med »novimi« površinskimi celicami prisotni in dobro razviti (*črne puščice*). *S*- svetlina sečnega mehurja, *K*- kapilara. TEM; povečava: x 2000.

4.2.4.3. Rezultati poskusov s 30-minutnim delovanjem 0,05-% hitosana

4.2.4.3.1. Časovna točka T2

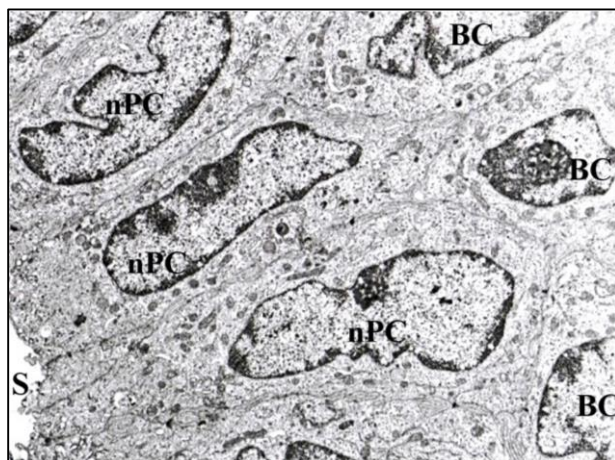
S SEM smo opazili obsežna odlučena področja urotelija, kjer so se odlučile le površinske celice, mestoma pa tudi vmesne celice (slika 46). Nekrotskih in apoptotskih celic nismo opazili.



Slika 46: Urotelij v časovni točki T2. Obsežen odluččen predel urotelija z »novimi« površinskimi celicami na površini. SEM; povečava: x 1000.

Analiza s TEM je pokazala, da je urotelij zaradi obsežnega luščenja večinoma dvoskladen (slika 47). Stiki med površinskimi celicami ter med površinskimi in bazalnimi celicami so

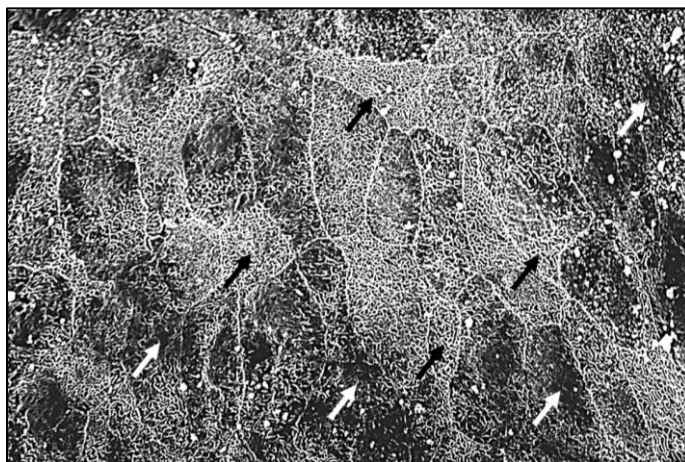
bili dobro razviti, zato med njimi ni bilo opaziti povečanih medceličnih prostorov.



Slika 47: Urotelij v časovni točki T2. Dvoskladni urotelij, ki ga gradijo »nove« površinske celice (*nPC*), ki mejijo na svetlino mehurja (*S*) in pod njimi ležeče bazalne celice (*BC*). TEM; povečava: x 6300.

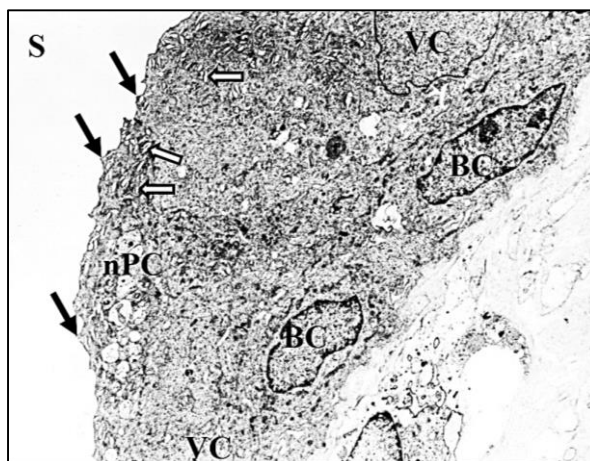
4.2.4.3.2. Časovna točka T3

S SEM smo opazili, da je bila večina urotelija odluščenega in da je na površini prevladovala homogena populacija »novih« površinskih celic. Te celice so bile različnih oblik in velikosti ter na različnih stopnjah celične diferenciacije. V povprečju so bile manjše kot površinske celice v normalnem uroteliju *in vivo*, ker še niso dosegle končne stopnje diferenciacije. Največ je bilo celic z mikrovili in vrvičastimi grebeni, kar dokazuje nizko stopnjo diferenciacije teh celic (slika 48). Opazili pa smo tudi že posamezne visoko diferencirane celice, ki so imele v osrednjem delu že značilno školjkasto nazobčano plazmalemo, na obrobju pa še sklenjene vrvičaste grebene.



Slika 48: Urotelij v časovni točki T3. Površina urotelija z »novimi« površinskimi celicami različnih oblik in velikosti ter z različno izoblikovano apikalno plazmalemo od mikrovilov (*bele puščice*) do vrvičastih grebenov (*črne puščice*). SEM; povečava: x 1300.

Urotelij, ki smo ga pregledali s TEM, je bil večinoma dvoskladen, ponekod tudi triskladen. »Nove« površinske celice so bile na različnih stopnjah diferenciacije. Celični stiki med njimi so bili večinoma dobro razviti, ponekod pa je bilo prekinjanje medceličnih stikov še vedno prisotno (slika 49). »Nove« površinske celice so imele v citoplazmi že posamične fuziformne vezikle, njihova apikalna plazmalema je bila že školjkasto nazobčana.

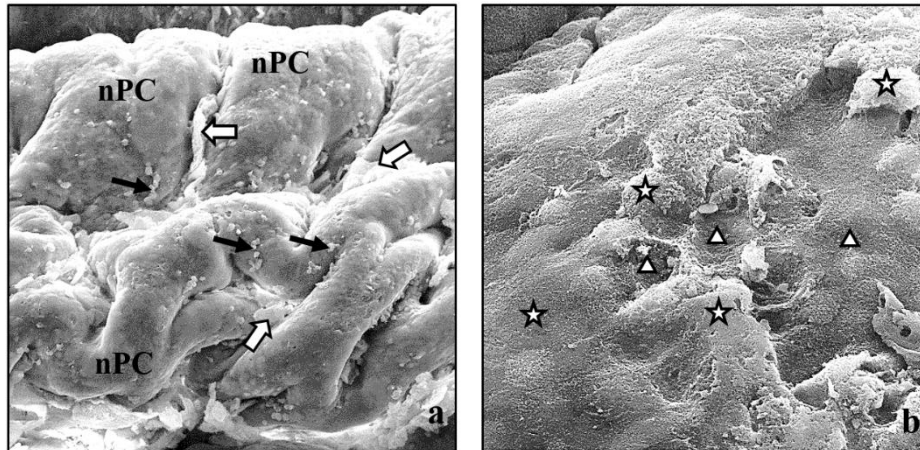


Slika 49: Urotelij v časovni točki T3. Predel s triskladnim urotelijem. »Nove« površinske celice (*nPC*) imajo že nazobčano apikalno plazmalemo (*črne puščice*) in posamične fuziformne vezikle (*bele puščice*). *VC*-vmesne celice, *BC*- bazalne celice, *S*- svetlina sečnega mehurja. TEM; povečava: x 2200.

4.2.4.4. Rezultati poskusov s 60-minutnim delovanjem 0,05-% hitosana

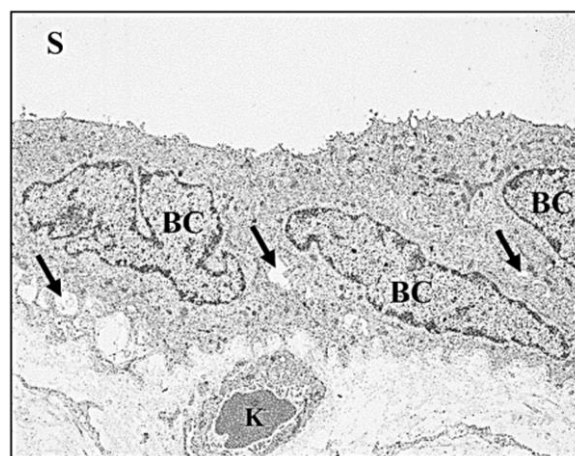
4.2.4.4.1. Časovna točka T2

Pri pregledu s SEM smo opazili obsežno odluščen urotelij in redke še pritrjene površinske celice (slika 50a). Odluščile so se večinoma površinske celice in zato so se na površini urotelija izpostavile vmesne celice kot »nove« površinske celice. Le ponekod je bilo opaziti luščenje tudi vmesnih celic, kar je vodilo v izpostavitve »starih« bazalnih celic (slika 50b).



Slika 50: Urotelij v časovni točki T2. a) Homogeno odluščen urotelij z »novimi« površinskimi celicami (*nPC*) na površini in redkimi še pritrjenimi »starimi« površinskimi celicami (*črne puščice*). Odluščene »stare« površinske celice so v gubah urotelija (*bele puščice*). **b)** Predel urotelija z izpostavljenimi »starimi« vmesnimi celicami (*zvezdice*) in predel z izpostavljenimi »starimi« bazalnimi celicami (*trikotniki*). SEM; povečavi: a) x 667, b) x 6340.

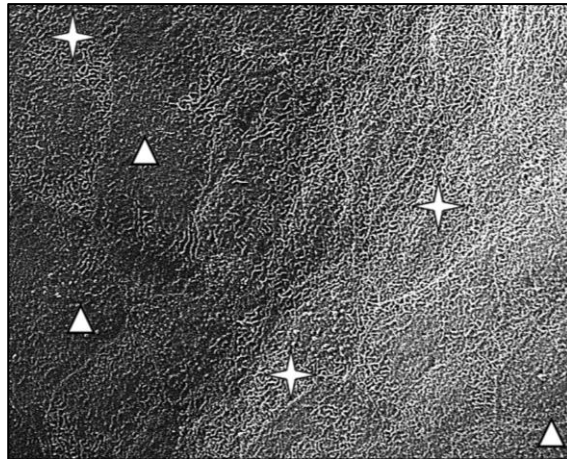
S TEM smo ugotovili, da je bil urotelij večinoma dvoskladen in le mestoma tudi enoskladen. Medcelični stiki med vmesnimi in tudi med bazalnimi celicami so bili prekinjeni, zato smo zasledili povečane medcelične prostore (slika 51).



Slika 51: Urotelij v časovni točki T2. Enoskladni urotelij s prekinjenimi stiki (*puščice*) med bazalnimi celicami (*BC*). *S*- svetlina sečnega mehurja, *K*- kapilara. TEM; povečava: x 2000.

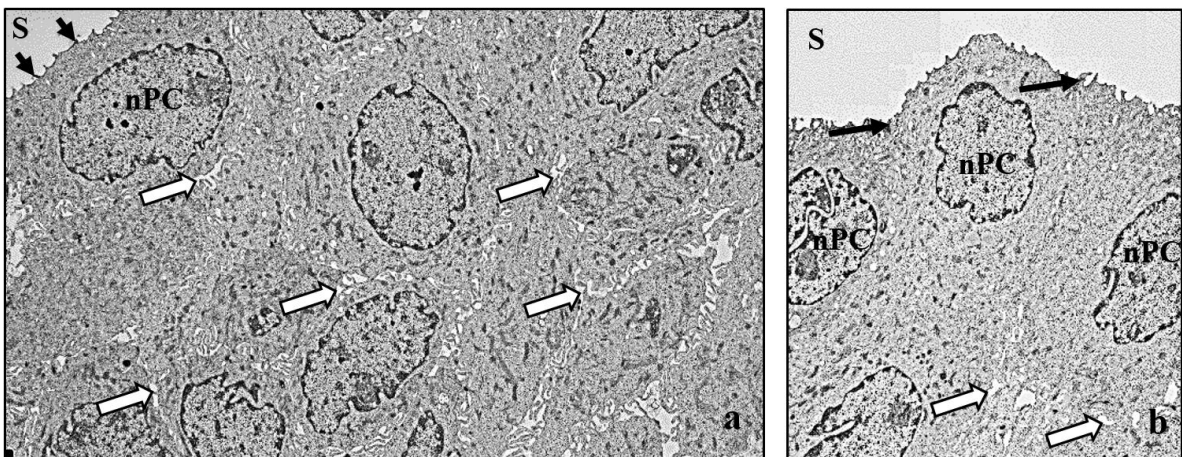
4.2.4.4.2. Časovna točka T3

Pregled urotelija s SEM je pokazal enakomerno odluščeno celotno površino urotelija z »novimi« površinskimi celicami na površini, ki so bile na nizki stopnji diferenciacije. Med njimi so prevladovale celice z mikrovili in vrvičastimi grebeni (slika 52).



Slika 52: Urotelij v časovni točki T3. Površina urotelija z »novimi« površinskimi celicami, ki imajo svojo apikalno plazmalemo izoblikovano v mikrovile (*štirikrake zvezde*) in vrvičaste grebene (*trikotniki*). SEM; povečava: x 12000.

Analiza s TEM je pokazala večinoma hiperplastičen urotelij z do petimi skladi celic (slika 53a). »Nove« površinske celice so bile na nizki stopnji diferenciacije in so imele na svoji apikalni površini številne mikrovile in vrvičaste grebene. Stiki med celicami vseh skladov so bili prekinjeni, zaradi česar so bili medcelični prostori povečani, kljub temu pa so bili tesni stiki med »novimi« površinskimi celicami že razviti (slika 53b).



Slika 53: Urotelij v časovni točki T3. **a)** Hiperplastični urotelij s petimi skladi celic, med katerimi so povečani medcelični prostori (*bele puščice*). »Nova« površinska celica (*nPC*) ima vrvičaste grebene na svoji apikalni površini (*črni puščici*). **b)** Tesni stiki med »novimi« površinskimi celicami (*nPC*) so dobro vidni (*črni puščici*), v globljih celičnih skladih pa so še prisotni povečani medcelični prostori (*beli puščici*). S- svetlina sečnega mehurja. TEM; povečava: a) x 2600, b) x 2000.

5. RAZPRAVA

Glavna funkcija urotelija sečnega mehurja je preprečevanje prehajanja strupenih snovi iz hipertoničnega urina v kri. Urotelij sestavljajo trije celični skladi, ki se razlikujejo po stopnji diferenciacije. Na najnižji stopnji diferenciacije so bazalne celice ob bazalni lamini, nad njimi so delno diferencirane vmesne celice, na površini urotelija pa so visoko diferencirane površinske celice, ki mejijo na svetlino sečnega mehurja (4). Glavna naloga površinskih celic je vzdrževanje krvno-urinske pregrade, ki preprečuje paracelularni in transcelularni prehod molekul. Krvno-urinsko pregrado tvori značilno oblikovana in odebeljena apikalna plazmalema površinskih celic ter številni dobro razviti tesni stiki med površinskimi celicami (3, 9). Zaradi teh karakteristik je urotelij sečnega mehurja najbolj neprepusten epitelij v telesu (7). Prepustnost epitelijev za prehajanje elektrolitov kvantificiramo s TEU, na podlagi katere lahko sklepamo na intaktnost apikalne plazmaleme in tesnih stikov (7, 9). Na integriteto urotelija vplivajo številni signali notranjega ali zunanjega izvora (23). Eden od signalov povzroči na primer inducirano luščenje urotelijskih celic kot obrambni mehanizem organizma pri bakterijskem cistitisu. Znotrajcelična patogena bakterija UPEC, ki je najpogostejša povzročiteljica bakterijskega cistitisa, se v urotelijskih celicah namnoži in tvori v njih obsežne združbe bakterij, ki so vir ponavljajočih se infekcij. Organizem zato sproži intenzivno luščenje z bakterijami okuženih urotelijskih celic (12). V terapiji ponavljajočega bakterijskega cistitisa se v klinični praksi uporablja intravezikalna aplikacija targesina (34, 35). Targesin je koloidna raztopina srebra, ki deluje kot antiseptik in kot luščilno sredstvo, s katerim želijo urologi odstraniti z bakterijami okužene urotelijske celice (29, 32). V klinične namene se kot luščilno sredstvo uporablja tudi citostatik mitomicin C. Uporablja se pri zdravljenju PRSM za učinkovito odlučanje rakavo spremenjenih celic po predhodni resekciji tumorja (21, 22).

V naši raziskavi smo primerjali luščilni sredstvi targesin in mitomicin C, ki se že uporabljata v klinični praksi, z naravnim in nizko toksičnim polisaharidom hitosanom. Slednji se je v predhodnih študijah na živalskih modelih izkazal kot uspešno luščilno sredstvo urotelijskih celic, ima pa tudi dokazane baktericidne in protitumorske lastnosti (6, 8, 9, 43, 44, 45). Omenjene lastnosti hitosana nakazujejo potencialno možnost uporabe hitosana tudi v klinični praksi, zlasti za pomožno zdravljenje bakterijskega cistitisa, ki je pereč zdravstveni problem in prizadene velik odstotek ženske populacije (9, 12, 43, 44).

Za uspešno uporabo luščilnega sredstva v klinične namene je potrebna poleg visoke učinkovitosti tudi nizka toksičnost luščilnega sredstva, da se tkivo čim hitreje obnovi. Namen našega dela je bil dokazati, da je hitosan napram targesinu in mitomicinu C najbolj učinkovit povzročitelj luščenja urotelijskih celic in da se urotelij po delovanju hitosana najhitreje obnovi. Obenem smo želeli s poskusi poiskati optimalno kombinacijo časa delovanja in koncentracije hitosana, ki bi učinkovito in kontrolirano odluščila površinske celice urotelija, ki so v primeru bakterijskega cistitisa polne namnoženih bakterij. Ugotovljeni optimalni čas in koncentracija hitosana bi pripomogla k uspešni uporabi hitosana v klinične namene za intravezikalno zdravljenje bakterijskega cistitisa in PRSM. V *ex vivo* poskusih s podganjimi sečnimi mehurji smo z meritvami TEU stene sečnega mehurja ugotavljali vpliv luščilnih sredstev na prepustnost urotelija ter sposobnost regeneracije tretiranega tkiva po delovanju luščilnega sredstva. TEU stene sečnega mehurja podgan smo merili v dvoprostornih difuzijskih celicah EasyMount™ (5). Luščilna sredstva povzročajo prekinjanje medceličnih stikov in luščenje urotelijskih celic, zato smo pričakovali, da se bo TEU stene sečnega mehurja v času tretiranja z luščilnim sredstvom zmanjšala, nato pa v obdobju regeneracije obnovila. V poskusih smo spreminjali čas tretiranja urotelija z luščilnimi sredstvi, pri hitosanu pa tudi koncentracijo disperzije. Luščilna sredstva smo primerjali med seboj tudi na podlagi mikroskopske analize luščenja urotelija s SEM in TEM. Za morfološko analizo tkiva in luščenja urotelijskih celic smo si izbrali tri časovne točke in sicer tik pred začetkom tretiranja urotelija z luščilnim sredstvom (T1), ob koncu tretiranja z luščilnim sredstvom (T2) in ob koncu obdobja regeneracije (T3). V točkah T2 in T3 smo tkivo primerjali s tkivom v točki T1, kjer je tkivo intaktno z vsemi značilnostmi urotelija *in vivo*: homogena površina triskladnega urotelija s heksagonalnimi površinskimi celicami, katerih apikalna plazmalema je značilno školjkasto nagubana in dobro razvitimi tesnimi stiki med njimi (slika 27) (7, 35).

Kontrolni poskusi

Za dokaz, da na prekinjanje tesnih stikov in luščenje urotelijskih celic vplivajo uporabljena luščilna sredstva in ne drugi dejavniki, smo naredili kontrolne poskuse. Pri teh smo urotelije izpostavili enakim eksperimentalnim pogojem kot pri poskusih z luščilnimi sredstvi, namesto le-teh pa smo v obdobju tretiranja tkivo inkubirali v PBS 7,4 ali PBS 4,5. V primeru kontrolnih poskusov za targesin in mitomicin C smo uporabili PBS 7,4, ki je najbolj podoben mediju, v katerem sta raztopljeni ti dve luščilni sredstvi. TEU stene sečnega mehurja,

inkubiranega celoten čas poskusa v PBS 7,4, je bila konstantna tekom celotnega obdobja poskusa (slika 11). To je bil dokaz intaktne krvno-urinske bariere in obenem dokaz, da je tkivo v difuzijski celici po šestih urah še vedno živo in funkcionalno. V primeru kontrolnih poskusov za hitosan smo uporabili PBS 4,5, s katerim smo pripravljali disperzije hitosana ter je bil kot kontrolna raztopina že preizkušen v predhodnih raziskavah (6, 8, 9, 43). Urotelij smo izpostavili PBS 4,5 za 60 min, kar je najdaljše obdobje tretiranja s hitosanom. Rezultati meritev TEU so dokazali, da relativno kisel pH ne vpliva pomembno na barierno funkcijo urotelija. TEU stene sečnega mehurja se je v času inkubacije s PBS 4,5 sicer znižala v povprečju za 5 %, a se je že po 40 minutah regeneracije vrnila na 100-% vrednost (slika 12). Intaktnost urotelija je potrdila tudi analiza s SEM, saj po končani 60-minutni izpostavitvi urotelija PBS 4,5 ni bilo prisotnega luščenja, površinske celice pa so imele značilno školjkasto nazobčano apikalno plazmalemo ter dobro izražene tesne stike med celicami (slika 28). Ker je bil urotelij v obeh vrstah kontrolnih poskusov intakten, lahko z gotovostjo trdimo, da je zaradi luščenja porušena krvno-urinska bariera izključno posledica delovanja luščilnih sredstev. Obenem lahko zaključimo, da pogoji v dvoprostornih difuzijskih celicah zelo dobro posnemajo pogoje *in vivo* in omogočajo verodostojne poskuse na uroteliju tudi *ex vivo*.

Targesin

Rezultati meritev TEU stene sečnih mehurjev, ki smo jih izpostavili targesinu, so bili variabilni, predvsem pa niso bili v skladu z našimi pričakovanji. V prisotnosti targesina se je namreč TEU presenetljivo močno povečala in ostala povečana ves čas stika urotelija s targesinom, tako pri 30- kot 60-minutnem tretiranju (slike 13–15). To ni v skladu s pričakovanimi luščilnimi učinki targesina. Možno razlago za tak rezultat smo našli v sestavi targesina. Glavna komponenta raztopine je srebro, za katerega so v študiji vpliva srebrovih nanodelcev na prepustnost endotelija ugotovili, da poveča izražanje proteinov tesnih stikov (59). Targesin poleg srebra vsebuje tudi vodotopne polifenole – tanine. Tanine delimo na hidrolizabilne, ki tvorijo vodikove vezi s proteini in s tem povzročijo obarjanje proteinov (adstringentno delovanje) ter na nehidrolizabilne, ki s proteini tvorijo kovalentne vezi in imajo zato strojilni učinek (30, 60, 61, 62). Dokazano je, da se celični membrani, ki ima s tanini oborjene proteine, lahko poveča električna upornost membrane tudi za petindvajsetkrat (62). V eni od študij so ugotavljali vpliv taninov na povečanje prepustnosti krvno-možganske pregrade za prehajanje apliciranega barvila iz krvi v možgane. V primerih,

ko so poleg barvila aplicirali tudi tanine, so opazili očitno zmanjšano prehajanje barvila preko krvno-možganske pregrade, s čimer so potrdili hipotezo o povečanju neprepustnosti pregrade s tanini (63). Do enakih zaključkov so prišli tudi v študiji, v kateri so ugotavljali učinek taninov na prepustnost možganskih kapilar, aorte in srčno-mišičnih kapilar (64). Obenem starejši viri navajajo, da se je raztopina targesina uporabljala za zdravljenje driske ravno zaradi adstringentnega učinka taninov (30). Na osnovi naših ugotovitev in rezultatov omenjenih študij predvidevamo, da pri tretiranju urotelija s targesinom pride do adstringentnega delovanja taninov. Tanini se z vodikovimi vezmi povežejo z glukozaminoglikani na apikalni plazmalemi površinskih celic, nastali veliki kompleksi pa zmanjšajo prepustnost apikalne plazmaleme, zato TEU stene sečnega mehurja naraste. Poleg vpliva taninov je lahko manjša prepustnosti stene sečnega mehurja v prisotnosti targesina tudi posledica vpliva srebrovih ionov na povečano izražanje proteinov tesnih stikov. Za potrditev zgornjih domnev bi bile potrebne nadaljnje študije, ki pa presegajo okvir naše magistrske naloge.

Po odstranitvi targesina je TEU stene sečnega mehurja v primeru 30- in 60-minutnega tretiranja takoj padla na 90-% vrednost TEU. Domnevamo, da je padec TEU posledica zamenjave targesina s PBS 7,4, s čimer smo s površine urotelija sprali taninsko-proteinske komplekse, ki so pred tem predstavljali bariero. V času regeneracije je bila TEU stene sečnega mehurja približno na 100 % vrednosti, v primeru daljšega časa tretiranja pa se je postopoma povečevala do 150-% vrednosti.

Mikroskopsko smo analizirali urotelij s SEM in TEM ob koncu 30-minutnega tretiranja urotelija s targesinom (časovna točka T2) in ob zaključku obdobja regeneracije v PBS 7,4 (časovna točka T3). Rezultati mikroskopske analize urotelija niso v skladu z izmerjenimi vrednostmi TEU. V T2 je bilo opazno luščenje posameznih površinskih celic in prekinjanje medceličnih stikov, zlasti med vmesnimi celicami, med katerimi mestoma najdemo tudi nekrotske celice (sliki 29, 30). V T3 smo dokazali, da je luščenje urotelijskih celic potekalo tudi po odstranitvi targesina in da je do prekinitve krvno-urinske pregrade prišlo, kljub temu da rezultati TEU tega ne kažejo (slika 31). Ob pregledu urotelija smo še vedno našli intaktne tesne stike med površinskimi celicami na obsežnih neodluščenih predelih urotelija, pod temi celicami pa so se medcelični stiki še vedno intenzivno prekinjali (slika 33). Prav tako smo kljub nizki stopnji diferenciacije med »novimi« površinskimi celicami, ki so imele na svoji apikalni površini veliko mikrovilov, opazili že dobro razvite stike (slika 32). V T2 in T3 smo na odluščenih predelih opazili tudi nekrotsko spremenjene vmesne celice.

Mitomycin C

Za razliko od poskusov s targesinom so bili rezultati meritev TEU pri 30- in 60-minutnem tretiranju urotelija s citostatikom mitomicinom C v skladu z našimi pričakovanji, saj se je v obeh primerih TEU stene sečnega mehurja v času tretiranja zmanjšala, v času regeneracije pa narasla in tudi hitro dosegla 100-% vrednost TEU stene sečnega mehurja. Po pričakovanjih je urotelij, ki je bil tretiran 30 min, med regeneracijo hitreje dosegel 100-% vrednost TEU stene sečnega mehurja kot urotelij, tretiran 60 min (slike 16–18).

Mikroskopsko analizo urotelija s SEM in TEM smo opravili ob koncu 30-minutne izpostavitve urotelija mitomicinu C (časovna točka T2) in na koncu regeneracije (časovna točka T3). Za analizo urotelija po 30-minutnem tretiranju z mitomicinom C smo se odločili z namenom primerjave učinkovitosti mitomicina C in targesina, za kar je poenotenost časa tretiranja nujna. Rezultati mikroskopske analize sovpadajo z rezultati meritev TEU sten sečnih mehurjev. V T2 smo potrdili luščenje urotelija, ki pa je bilo nehomogeno in so bile ponekod še vedno prisotne neodluščene površinske celice. Opazili smo tudi nekrozo površinskih in vmesnih celic (slika 34). V T3 je bila večina površine urotelija odluščena, »nove« površinske celice pa so se že diferencirale in bile med seboj tesno spete z medceličnimi stiki (slika 36), kar se ujema z naraščajočimi vrednosti TEU v obdobju regeneracije. Kljub temu pa je v T3 s TEM še vidno prekinjanje medceličnih stikov, enako kot tudi pri uroteliju tretiranim s targesinom, kar kaže na dejstvo, da luščilna sredstva delujejo še tudi po njihovi odstranitvi iz difuzijske celice (slika 37).

Hitosan

Predhodne študije na steni prašičjega sečnega mehurja so pokazale, da se v času enournega tretiranja prepustnost stene za modelno učinkovino značilno zveča pri koncentracijah hitosana, ki so večje od 0,0005 % (ut/vol), obenem pa ni večjih razlik v prepustnosti za modelno učinkovino med 0,001-% in 0,5-% koncentracijami hitosana. Ugotovljeno je bilo tudi, da je učinek hitosana poleg koncentracije odvisen tudi od časa izpostavljenosti urotelija hitosanu (43). Ker so bile v drugih študijah s hitosanom najpogosteje uporabljane koncentracije med 0,5 % in 0,005 %, smo se odločili, da bomo pri naših poskusih uporabili 0,5-% in 0,05-% disperzijo hitosana (6, 8, 9, 43).

Urotelij sečnega mehurja smo izpostavili 0,5-% hitosanu za 15, 30 oz. 60 min in med tretiranjem se je TEU stene sečnega mehurja pri vseh treh časovnih obdobjih močno znižala (slike 19–22). V primeru 30- in 60-minutnega tretiranja se TEU v obdobju regeneracije ni

vrnila na 100-% vrednost, zato urotelija v teh dveh primerih mikroskopsko nismo ovrednotili. V študiji na prašičjem uroteliju so ugotovili, da enourna izpostavljenost 0,5-% disperziji hitosana poveča absorbcijo za modelno učinkovino, pri čemer pride do masivnega luščenje urotelija v globino vse do bazalnih celic (43). Glede na izsledke navedene študije in naše rezultate predvidevamo, da je bilo luščenje v primeru 30- in 60-minutnega tretiranja z 0,5-% hitosanom tako intenzivno, da se urotelij v obdobju regeneracije ni bil sposoben obnoviti. Nasprotno pa v primeru 15-minutne izpostavljenosti 0,5-% hitosanu TEU stene sečnega mehurja med regeneracijo narašča in se vrne na 100-% vrednost že po 200 minutah regeneracije v PBS 7,4 (slika 22). Mikroskopska analiza s SEM in TEM sovпада z rezultati meritev TEU v časovni točki T2, saj je bilo po 15-minutnem tretiranju z 0,5-% hitosanom luščenje prisotno, vendar pa so bile površine odluščene nehomogeno (slika 38a). Opazili smo tudi nekrozo vmesnih celic (slika 38b), ki so se zaradi luščenja izpostavile na površini ter prekinjanje medceličnih stikov med vmesnimi in bazalnimi celicami (slika 39). Rezultati mikroskopske analize v časovni točki T3 niso bili v skladu z našimi pričakovanji, saj smo glede na meritve TEU pričakovali regeneriran urotelij oz. urotelij v procesu regeneracije. Nasprotno smo opazili, da luščenje urotelija še vedno aktivno poteka. Luščenje je bilo izrazito lokalno in usmerjeno v globino urotelija, saj smo mestoma opazili tudi večja območja z izpostavljenimi bazalnimi celicami na površini (slika 40) ter prekinjanje medceličnih stikov med bazalnimi celicami tudi pri neodluščenem triskladnem uroteliju, kar kaže tudi na lateralno pronicanje disperzije hitosana v notranjosti urotelija. Glede na to, da se rezultati meritve TEU stene sečnih mehurjev ne ujemajo z rezultati mikroskopske analize, bi bilo v prihodnje potrebno narediti dodatne ponovitve teh poskusov. Pri meritvah TEU stene sečnega mehurja namreč merimo upornost celotne stene sečnega mehurja in ne samo urotelija, kar bi lahko vplivalo na to neskladje. Kljub temu lahko glede na dobljene rezultate zaključimo, da 0,5-% koncentracija hitosana lušči urotelij predvsem v globino, obenem pa je to luščenje točkovno in ne zajame celotne površine urotelija.

Enako kot pri 0,5-% hitosanu smo tudi pri 0,05-% hitosanu urotelij izpostavili disperziji za 15, 30 in 60 min. Tudi pri tej koncentraciji se je na začetku tretiranja TEU stene sečnega mehurja v vseh treh primerih močno znižala (slike 23–26). V primeru 15-minutnega tretiranja se je TEU stene sečnega mehurja v obdobju regeneracije hitro vrnila na 100-% vrednost, medtem ko se je TEU v primeru 30- in 60-minutnega tretiranja 100-% vrednosti približevala, a je ob koncu poskusa še ni dosegla (slika 26). V študiji, kjer so raziskovalci spremljali regeneracijo urotelija z merjenjem TEU stene sečnega mehurja podgan, je urotelij

po 20 minutni izpostavljenosti 0,005-% hitosanu dosegel kontrolno vrednost po 200- minutni regeneraciji v fosfatnem pufri (6). V naših poskusih smo tkivo tretirali s hitosanom dalj časa in uporabili 10-krat višjo koncentracijo hitosana kot v omenjeni študiji, zato je verjetno pri teh pogojih prišlo do intenzivnejšega luščenja, zaradi česar je bil potreben tudi daljši čas za obnovo urotelija. Obenem domnevamo, da bi ob podaljšanju časa regeneracije tudi v naših poskusih prišlo do povrnitve TEU stene sečnega mehurja na začetno vrednost.

Ker nas je zanimal obseg luščenja in sposobnost obnove urotelija po delovanju 0,05-% hitosana pri vseh treh časih tretiranja, smo urotelij analizirali še z elektronsko mikroskopijo. Pri vseh treh izbranih časih delovanja so se rezultati mikroskopske analize ujemali z rezultati poskusov *ex vivo*. V primeru 15-minutnega tretiranja urotelija z 0,05-% hitosanom smo v časovni točki T2 opazili luščenje urotelija, ki pa ni bilo obsežno, niti nismo zasledili prekinjanje medceličnih stikov v globljih predelih urotelija (sliki 42, 43). Luščenje je očitno kljub odstranitvi hitosana iz površine urotelija še vedno potekalo, saj je bil urotelij v časovni točki T3 enakomerno odluščen in z »novimi« površinskimi celicami na nizki stopnji diferenciacije. Njihove apikalne plazmaleme so imele številne mikrovile, ponekod pa so se ti že povezali v neskljenjene vrvičaste grebene (slika 44). Tesni stiki med »novimi« površinskimi celicami so že bili prisotni in glede na meritve TEU tudi funkcionalni, vendar pa smo mestoma še opazili prekinjanje medceličnih stikov v nižjih predelih urotelija (slika 45). Urotelij, ki je bil 30 minut tretiran z 0,05-% hitosanom, je v T2 imel obsežna odluščena območja (slika 46), medcelični stiki med vmesnimi celicami so bili intaktni in nekroze nismo zasledili (slika 47). V T3 se je TEU stene sečnega mehurja zgolj približala 100-% vrednosti, kar se ujema z rezultati naše morfološke analize s SEM in TEM, saj smo poleg že visoko diferenciranih »novih« površinskih celic (slika 48) zasledili še vedno prisotno prekinjanje medceličnih stikov, enako kot pri urotelijih tretiranih s targesinom in mitomicinom C (slika 49). 60-minutno tretiranje urotelija z 0,05-% hitosanom je povzročilo obsežno luščenje urotelija, v T2 so bile površinske celice le še redko pritrjene na površini (slika 50). Še več, dolgo obdobje tretiranja je mestoma povzročilo tudi luščenje vmesnih celic, prekinjali pa so se tudi medcelični stiki med bazalnimi celicami (slika 51). V obdobju regeneracije se TEU stene sečnega mehurja tako kot pri 30-minutni izpostavitvi v T3 ni popolnoma vrnila na 100-% vrednost, vendar se ji je približala. Na koncu regeneracije je bila TEU stene sečnega mehurja, katere urotelij je bil tretiran s hitosanom 60 min, celo višja od TEU v primeru 30-minutnega tretiranja (slika 26). Razlago smo našli z mikroskopskim pregledom urotelija. Urotelij je bil po 60-minutnem tretiranju v T3 hiperplastičen s

površinskimi celicami na nizki stopnji diferenciacije (sliki 52, 53a). Medcelični stiki so bili med celicami v notranjosti urotelija še vedno prekinjeni, vendar pa so bili tesni stiki med »novimi« površinskimi celicami že razviti (slika 53). Razvoj hiperplazije zaradi luščenja urotelija so opisali tudi v študiji, v kateri so preučevali obnovo urotelija po aplikaciji ciklofosfamida v sečni mehur podgan. Raziskovalci so ugotovili, da huda poškodba urotelija, zaradi katere se urotelij odlušči do bazalnih celic, aktivira proliferacijo celic z namenom čim hitreje vzpostavitve krvno-urinske bariere. Hiperplazija je bila reverzibilna, saj je urotelij po določenem času zopet postal triskladen (65). Domnevamo, da bi se hiperplastični urotelij povrnil v normoplastno stanje tudi v naših poskusih, če bi podaljšali obdobje regeneracije.

Izbira optimalnega luščilnega sredstva

Za uspešno uporabo luščilnega sredstva v klinični praksi je potrebno, da luščilno sredstvo odlušči celotno površino urotelija čim bolj homogeno ter da po končanem tretiranju pride do vzpostavitve porušene krvno-urinske pregrade urotelija kot ključnega procesa obnove v čim krajšem času. Na podlagi mikroskopske analize s SEM in TEM, rezultatov TEU stene sečnega mehurja in izsledkov iz literature o vplivu taninov in srebrovih ionov na prepustnost epitelijev lahko zaključimo, da zaradi specifičnega vpliva targesina na urotelij metoda merjenja TEU stene sečnega mehurja ni primerna za vrednotenje targesina kot luščilnega sredstva. Učinke targesina na urotelij smo tako vrednotili zgolj na podlagi rezultatov mikroskopske analize luščenja s SEM in TEM in lahko zaključimo, da je targesin najmanj ustrezno luščilno sredstvo, saj urotelij lušči izrazito neenakomerno in mestoma tudi v globino urotelija. V T3 smo pri targesinu ugotovili bistveno obširnejše luščenje v primerjavi z obsegom luščenja v T2, zaradi česar lahko sklepamo na učinkovanje z določenim časovnim zamikom. Poleg obnove urotelija z diferenciacijo »novih« površinskih celic, ki ostanejo pri targesinu na nizki stopnji diferenciacije, smo v T3 še vedno opazili prekinjanje medceličnih stikov. Enako smo opazili tudi pri vseh ostalih luščilnih sredstvih (targesinu, mitomicinu C in hitosanu). Očitno se sproženo množično prekinjanje medceličnih stikov ne konča ob zamenjavi luščilnega sredstva s fosfatnim pufrom.

Glede na naše rezultate tudi mitomicin C ni luščilno sredstvo prve izbire, saj tako kot targesin urotelija v T2 ne odlušči enakomerno in povzroči nekrozo »novih« površinskih celic. Nekrotsko spremenjene celice smo opazili tudi pri tretiranju s targesinom in 0,5-% hitosanom. Nekroza celic ni zaželena celična smrt, saj se zaradi poškodovane celične membrane v okolico sproščajo encimi in vsebina celice, kar povzroča nekrozo sosednjih,

prej nepoškodovanih celic in posledično množični propad celic ter vnetno reakcijo (27). Po končanem tretiranju urotelija z mitomicinom C je med regeneracijo potekala diferenciacija »novih« površinskih celic in s tem tudi obnovitev krvno-urinske bariere. Tesni stiki med »novimi« površinskimi celicami so že bili razviti, kljub temu pa so bile na površini še vedno prisotne neodluščene stare površinske celice. Neodluščeni predeli pri zdravljenju bakterijskega cistitisa in PRSM niso zaželeni, saj je za popolno odstranitev vseh okuženih oz. rakavih celic potrebna enakomerna odluščenost celotnega urotelija. Starih površinskih celic v T3 nismo zasledili samo v primeru tretiranja z 0,05-% hitosanom, in to pri vseh treh časovnih obdobjih tretiranja.

Tako kot targessin in mitomicin C se je kot manj primerno luščilno sredstvo izkazal tudi 0,5-% hitosan, saj povzroča nekrozo urotelijskih celic, predvsem pa urotelij lušči zelo točkovno in v globino. To kaže na preveliko agresivnost 0,5-% disperzije hitosana in s tem na neprimernost te koncentracije za klinično uporabo. Obenem bi bilo zaradi neskladja rezultatov pri 15-minutnem tretiranju potrebno narediti dodatne ponovitve poskusov.

Za uporabo v terapiji je neprimerna tudi 60-minutna izpostavitve urotelija 0,05-% hitosanu, saj se kljub nizki koncentraciji polimera zaradi dolgega časa tretiranja v T2 odluščijo tudi vmesne celice. Porušenje krvno-urinske bariere je tako izrazito, da v času regeneracije pride do zelo aktivne proliferacije celic, ki se kaže kot hiperplazija. Hiperplazija tkiva ni zaželena, saj lahko vodi v neoplastična stanja (66). Po drugi strani je pri 15-minutnem tretiranju z 0,05-% hitosanom v T2 urotelij odluščen le mestoma, zato ocenjujemo, da je 15-minutna izpostavljenost urotelija 0,05-% hitosanu prekratka kljub hitri obnovi krvno-urinske bariere. Po 30-minutnem tretiranju urotelija z 0,05-% hitosanom je bil površinski sklad celic odluščen homogeno, hkrati je bil urotelij v T3 obnovljen, tesni stiki so bili razviti, apikalna membrana na nizki stopnji diferenciacije, a so se mikrovili že povezali v sklenjene vrvičaste grebene. Pri tako odluščenem uroteliju so možnosti za uspešno odstranitev vseh z bakterijami okuženih ali rakavih celic največje, hkrati pa je krvno-urinska pregrada hitro vzpostavljena.

Namen naše naloge je bil dokazati, da je hitosan bolj učinkovito luščilno sredstvo kot targessin in mitomicin C ter da omogoča tudi hitrejšo obnovo barierne funkcije kot ostali dve luščilni sredstvi. Obenem smo želeli pri hitosanu določiti tudi optimalno kombinacijo koncentracije disperzije in časa izpostavljenosti za doseg teh učinkov. Na podlagi vseh rezultatov lahko zaključimo, da 0,05-% disperzija hitosana v kombinaciji s 30-minutnim

tretiranjem ustreza vsem omenjenim pogojem, saj najbolj enakomerno odlušči urotelijske celice, krvno-urinska bariera pa se ponovno vzpostavi v nekaj urah. Za razliko od ostalih testiranih luščilnih sredstev 0,05-% koncentracija hitosana ni povzročila nekroze urotelijskih celic in je zaradi tega tudi najmanj toksična med izbranimi luščilnimi sredstvi. Prav tako regeneracija urotelija po 30-minutnem delovanju 0,05-% hitosana poteče hitro.

Naša raziskava je prva bazična raziskava o delovanju targesina in mitomicina C na urotelij kljub njuni dolgoletni uporabi v klinični praksi. Naši rezultati kažejo, da sta obe omenjeni luščilni sredstvi manj primerni za učinkovito luščenje ter hitro obnovo poškodovanega urotelija kot hitosan. Zato lahko zaključimo, da bi 30-minutna izpostavitve urotelija 0,05-% disperziji hitosana zaradi svoje kontrolirane učinkovitosti in nizke toksičnosti lahko v prihodnosti nadomestila targesin in mitomicin C kot luščilno sredstvo v terapiji bakterijskega cistitisa in PRSM.

6. SKLEP

Na podlagi rezultatov *ex vivo* poskusov merjenja TEU stene podganjih sečnih mehurjev in analize tkiva z vrstičnim in presevnim elektronskim mikroskopom smo zaključili naslednje:

- **Targesin** je najmanj učinkovito luščilno sredstvo, saj urotelij lušči neenakomerno in zaradi časovne zakasnitve luščenja deluje nepredvidljivo. Obnova urotelija po sproženi poškodbi poteka najpočasneje in med regeneracijo še vedno poteka prekinjanje stikov med urotelijskimi celicami. Merjenje TEU stene sečnega mehurja ni primerna metoda za vrednotenje targesina kot luščilnega sredstva.
- **Mitomycin C** neenakomerno odlušči površinske celice urotelija. TEU stene sečnega mehurja se sicer po končanem tretiranju hitro vrne na začetno vrednost, vendar pa je diferenciacija »novih« površinskih celic ob koncu poskusa na nižji stopnji kot pri hitosanu. Na koncu poskusa so še vedno prisotne »stare« površinske celice.
- Učinkovitost **hitosana** kot luščilnega sredstva je odvisna od časa delovanja in njegove koncentracije. 0,5-% hitosan ni primerno luščilno sredstvo, saj pri vseh testiranih časih urotelij lušči v globino. TEU stene sečnega mehurja se v času regeneracije vrne na začetno vrednost samo pri 15-minutnem tretiranju, vendar pa luščenje urotelija še vedno poteka in veliki predeli »starih« površinskih celic so še vedno prisotni. 0,05-% hitosan se je izkazal za zelo učinkovito luščilno sredstvo, ki za razliko od ostalih ne povzroča nekroze celic. Urotelij lušči enakomerno in TEU se v času regeneracije približa oz. doseže začetno vrednost. Po 15-minutnem tretiranju se urotelij odlušči točkovno, medtem ko se po 60 minutah delovanja začnejo luščiti že spodnji skladi urotelijskih celic, kar povzroči hiperplazijo tkiva. 30-minutna izpostavitve urotelija 0,05-% hitosanu lušči urotelij enakomerno in obenem je regeneracija urotelija na višji stopnji diferenciacije kot po 30-minutni izpostavitvi tkiva targesinu oz. mitomicinu C.
- Zaključimo lahko, da se je 0,05-% hitosan v 30-minutnem delovanju izkazal kot najučinkovitejše luščilno sredstvo, ki urotelij lušči enakomerno in je njegova obnova po sproženi poškodbi hitra. To potrjuje njegovo primernost za uporabo v klinični praksi kot luščilno sredstvo v terapiji bakterijskega cistitisa in površinskega raka sečnega mehurja.

7. LITERATURA

1. Michael HR, Gordon IK, Wojciech P: A text and atlas with cell and molecular biology, 4th edition, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2003: 603, 626–629, 640, 641.
2. Zorc Pleskovič R, Mulinović Živin A, Petrovič D: Histologija, Učbenik za študente farmacije, Inštitut za histologijo in embriologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2006: 93, 97.
3. Erdani Kreft M, Hudoklin S, Jezernik K, et al.: Formation and maintenance of blood-urine barrier in urothelium. *Protoplasma* 2010; 246(1): 3–14.
4. Hicks RM: The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1975; 50(6): 215–246.
5. Born M, Pahner I, Ahnert-Hilger G, Jöns T: The maintenance of the permeability barrier of bladder facet cells requires a continuous fusion of discoid vesicles with the apical plasma membrane. *Eur. J. Cell Biol.* 2003; 82(7): 343–350.
6. Erman A, Kerec Kos M, Žakelj S, et al.: Correlative study of functional and structural regeneration of urothelium after chitosan-induced injury. *Histochem Cell Biol* 2013; 140(5): 521–531.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Rodgers LS, Beam MT, Anderson JM, et al.: Epithelial barrier assembly requires coordinated activity of multiple domains of the tight junction protein ZO-1. *J Cell Sci* 2013; 126(7): 1565–1575.
11. Žakelj S: Permeabilnost nekaterih spojin skozi tanko črevo podgane v različnih pogojih »in vitro«. Doktorska disertacija 2006; Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.
12. Veranič P: Uropatogena *Escherichia coli* – priložnostni znotrajcelični parazit. *Med razgl* 2008; 47(3): 251–257.
13. Qian SK, Hann-Chorng K: Pathophysiology of intestinal cystitis/bladder pain syndrome. *Tzu Chi Medical Journal* 2015; 27(4): 139–144.

14. Chung-Hsin P, Hann-Chorng K: The sociodemographic and clinical predictors of symptom severity in patients with refractory interstitial cystitis/bladder pain syndrome: *Tzu Chi Medical Journal* 2014; 26(2): 79–85.
15. Schilling JD, Hulgren SJ: Recent advances into the pathogenesis of recurrent urinary tract infections: the bladder as a reservoir for uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicro Ag* 2002; 19(6): 457–460.
16. Delves JP, Roitt IM, et al.: *Encyclopedia of immunology*, 2nd edition, Academic Press, USA, 1998: 2452.
17. Blango MG et al.: Forced resurgence and targeting of intracellular uropathogenic *Escherichia coli* reservoirs. *PLoS One* 2014; 9(3) e0093327.
18. Novaković S, et al.: *Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*, Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 2009: 353–356.
19. Primic Žakelj M, et al.: *Rak v Sloveniji 2012*, Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka republike Slovenije, Ljubljana, 2015: 37.
20. Raghavan D, Robert Huben et al.: Management of bladder cancer. *Curr Probl Cancer* 1995; 19(1): 5–63.
21. Nargund VH, Tanabalan CK, Kabir MN: Management of non-muscle invasive (superficial) bladder cancer. *Semin Oncol* 2012; 39(5): 559–572.
22. Di Pierro GB, Gulia C, Cristini C, et al.: Bladder cancer: a simple model becomes complex. *Curr Genomics* 2012; 13(5): 359–415.
23. 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.
24. Jezernik K, Medalia O, Aronsan M: A comparative study of the desquamation of urothelial cells during gestation and in adults mice following moderate stress or endotoxin treatment. *Cell Biol Int* 1995; 19(11): 887–894.
25. Veranič P, Jezernik K: The response of junctional complexes to induced desquamation in mouse bladder urothelium. *Biol Cell* 2000; 92(2): 105–113.
26. Veranič P, Jezernik K: Succession of events in desquamation of superficial urothelial cells as a response to stress induced by prolonged constant illumination. *Tissue Cell* 2001; 33(3): 280–285.
27. Erdani Kreft M, Erman A, Hudoklin Samo et al.: *Celična biologija z genetiko*. Inštitut za biologijo celice Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2011: 86, 87.

28. Chen CY, Chung YC: Antibacterial characteristic and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresour Technol* 2008; 99(8): 2806–2814.
29. Analizni izvid: Argenti albumino acetylotannas sine borace (Targesinum). Lex d.o.o., Koper, datum analize: 10. 9. 2012.
30. Tomić D: Terapijske doze I oblici lijekova. 3. izdaja, Nakladni zavod Hrvatske, Zagreb, 1950: 91.
31. Varnostni list: Targesinum ident. 0575. Lex d.o.o., Koper; datum izdaje: 20. 10. 2011.
32. Chopra I: The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: A useful development or a cause for concern? *J Antimicrob Chemoter* 2007; 59(4): 587–590.
33. Taglietti A, Fernandez YAD, Amato E, et al.: Antibacterial activity of glutathione-coated silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *Langmuir* 2012; 28(21): 8140–8148.
34. Boucher W, Stern JM, Kotsinyan V, et. al.: Intravesical nanocrystalline silver decreases experimental bladder inflammation. *J Urol* 2008; 179(4): 1598–1602.
35. Lansdown A: Silver in health care: Antimicrobial effects and safety in use. *Curr Probl Dermatol* 2006; 33: 17–34.
36. Verweij J, Pinedo HM: Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations. *Anticancer Drugs* 1990; 1(1): 5–14.
37. Hyoungh RK, Jae JK, Jung JP, et al.: Studies on synthesis and activation mechanism of mitomycin dimmers connected by 1,2-dithiolane and diol linkers. *Bioorg Med Chem* 2012; 20(19): 5720–5729.
38. Paz MM, Zhang X, Lu J, Holmgren A: A new mechanism of action for the anticancer drug mitomycin C: Mechanism-based inhibition of thioredoxin reductase. *Chem Res Toxicol* 2012; 25(7): 1502–1511.
39. Paz MM: Reductive activation of mitomycin C by thiols: Kinetics, mechanism and biological implications. *Chem Research Toxicol* 2009; 22(10): 1663–1668.
40. Majno Gm Joris I: Apoptosis, oncosis and necrosis: An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 46(1): 3–15.
41. https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/26917#UNDESIRABLE_EFFECTS, html (uporabljeno: 17. 3. 2016).
42. 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.

43. Kerec-Kos M, Bogataj M, Veranič P, et al.: Permeability of pig urinary bladder wall: time and concentration dependent effect of chitosan. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(8): 1685–1691.
44. Younes I, Frachet V, Rinaudo M, et al.: Cytotoxicity of chitosans with different acetylation degrees and molecular weights on bladder carcinoma cells. *Int J Biol Macromol* 2016; 84: 200–207.
45. Goy RC, Britto D, Assis OBG: A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Rev Bras Farmacogn* 2016; 26(1): 122–127.
46. Zhang J, Xia W, Liu P, et al.: Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. *Mar Drugs* 2010; 8(7): 1962–1987.
47. Grabnar I, Bogataj M, Mrhar A: Influence of chitosan and polycarbophil on permeation of a model hydrophilic drug into the urinary bladder wall. *Int J Pharm* 2003; 256(1–2): 167–173.
48. Ranaldi G, Marigliano I, Vespignani I, et al.: The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 cell line. *J Nutr Biochem* 2002; 13(3): 157–167.
49. Islam MA, Firdous J, Choi YJ, et al.: Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: an updated review. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 6077–6093.
50. Ko JA, Park HJ, Hwang SJ, et al.: Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *Int J Pharm* 2002; 249(1–2): 165–174.
51. Dodane V, Khan MA, Merwin JR: Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int J Pharm* 1999; 182(1): 21–32.
52. Younes I, Hajji S, Frachet V, et al.: Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. *Int J Biol Macromol* 2014; 69: 489–498.
53. Lekka M, Laidler P, Ignacak L, et al.: The effect of chitosan on stiffness and glycolytic activity of human bladder cells. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1540(2): 127–136.
54. Huang R, Mendis E, Rajapakse N, et al.: Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS). *Life Sci* 2006; 78(20): 2399–2408.

55. Bilensoy E, Sarisozen C, Esendagli G, et al.: Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of Mitomycin C to bladder tumors. *Int J Pharm* 2009; 371(1–2): 170–176.
56. Zaharoff DA, Hoffman BS, Hooper CJ Jr, et al.: Intravesical Immunotherapy of superficial Bladder Cancer with Chitosan/Interleukin-12. *Cancer Res* 2009; 69(15): 6192–6199.
57. Ussing HH, Zerahn K: Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 1950; 23: 110–127.
58. Polentarutti BI, Peterson AL, Sjobeg AK, et al.: Evaluation of viability of excised rat intestinal segments in the Ussing chamber: Investigation of morphology, electrical parameters and permeability characteristics. *Pharm Res* 1999; 16(3): 446–454.
59. Sheikpranbabu S, Kalishwaralal K, Lee K, Vaidyanathan R, Eom SH, Hurunathan S: The inhibition of advanced glycation end-products-induced retinal vascular permeability by silver nanoparticles. *Biomaterials* 2010; 31(8): 2260–2271.
60. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD: *Herbal Medicines*, 3rd edition, Pharmaceutical Press, London, 2007: 30–33.
61. Jesus NZ, Souza Falcao H, Gomes IF, et al.: Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. *Int J Mol Sci* 2012; 13(3): 3203–3228.
62. Shuchter SH, Franki NF, Hays RM: The effect of tanning agents on the permeability of the toad bladder to water and solutes. *J Membr Biol* 1973; 14(2): 177–191
63. Cahn J, Borzeix MG: Administration of procyanidolic oligomers in rats: Observed effects on changes in the permeability of the blood-brain barrier. *Sem Hop* 1983; 59(27–28): 2031–2034.
64. Robert L, Godeau G, Gavignet-Jeannin C, et al.: The effect of procyanidolic oligomers on vascular permeability. *Pathol Biol* 1990; 38(6): 608–616.
65. Romih R, Koprivec D, Martinčič DS, et al.: Restoration of the rat urothelium after cyclophosphamide treatment. *Cell Biol Int* 2001; 25(6): 531–537.
66. Ertürk E, Cohen SM, Price JM, et al.: Pathogenesis, histology, and transplantability of urinary bladder carcinomas induced in albino rats by oral administration of N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide. *Cancer Res* 1969; 29: 2219–2228.

8. PRILOGE

Priloga 1: Meritve TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen PBS 7,4 360 min. *A*- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, *R*- relativna vrednost TEU (% TEU glede na $t=30$ min), *POVP*- povprečje vseh relativnih TEU ob določenem času, *SD*- standardni odklon relativnih TEU ob določenem času.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	55	98	97	93	96	4
10	56	100	100	96	98	3
20	57	102	103	99	100	2
30	56	100	104	100	100	0
35	50	89	106	102	96	9
40	51	91	106	102	97	8
45	52	93	107	103	98	7
50	54	96	107	103	100	5
55	54	96	110	105	101	6
60	54	96	109	104	100	6
70	54	96	109	104	100	6
80	54	96	110	105	101	6
90	53	95	110	105	100	8
100	53	95	111	106	101	8
110	52	93	112	107	100	10
120	52	93	115	111	102	13
140	51	91	120	115	103	17
160	51	91	122	117	104	18
180	51	91	120	115	103	17
200	52	93	120	115	104	16
220	52	93	123	118	106	18
240	53	95	125	120	107	18
260	54	96	126	121	109	17
280	55	98	128	123	110	17
300	56	100	128	123	111	16
320	56	100	128	123	112	16
340	56	100	126	121	111	15
360	56	100	125	120	110	14

Priloga 2: Meritve TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelija je bil izpostavljen PBS 4,5 60 min. Sivo osenčen predel označuje obdobje izpostavljenosti urotelija PBS 4,5. A- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, R- relativna vrednost TEU (% TEU glede na t=30 min), *POVP*- povprečje vseh relativnih TEU ob določenem času, *SD*- standardni odklon relativnih TEU ob določenem času.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	73	91	529	99	95	5
10	75	94	546	102	98	6
20	77	97	549	103	100	4
30	80	100	534	100	100	0
35	68	86	541	101	93	11
40	69	87	562	105	96	13
45	69	86	567	106	96	14
50	68	85	573	107	96	16
55	68	85	578	108	96	17
60	68	85	562	105	95	14
70	66	83	586	110	97	19
80	68	85	559	105	95	14
90	68	86	564	106	96	14
100	57	71	551	103	87	23
110	70	88	556	104	96	11
120	75	95	542	101	98	5
140	81	102	535	100	101	1
160	83	104	555	104	104	0
180	90	113	614	115	114	1
200	95	119	637	119	119	0
220	99	124	630	118	121	5
240	97	122	585	110	116	9
260	102	127	587	110	119	12
280	102	128	601	113	120	11
300	99	124	603	113	118	8
320	100	125	591	111	118	10
340	110	138	548	103	120	25
360	110	138	548	103	120	25

Priloga 3: Meritve TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen targesinu 30 min.
 Zeleno osenčen predel označuje obdobje izpostavljenosti urotelija targesinu. *A*- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, *R*- relativna vrednost TEU (% TEU glede na $t=30$ min), *POVP*- povprečje vseh relativnih TEU ob določenem času, *SD*- standardni odklon relativnih TEU ob določenem času.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		3. meritev		4. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	282	98	62	102	115	102	62	98	100	2
10	298	103	62	102	115	102	62	98	101	2
20	299	103	63	103	110	97	63	100	101	3
30	289	100	61	100	113	100	63	100	100	0
35	80	28	68	111	115	102	78	124	91	43
40	401	139	74	121	130	115	86	137	128	12
45	426	147	76	125	136	120	91	144	134	14
50	332	115	78	128	135	119	96	152	129	17
55	356	123	79	130	136	120	100	159	133	18
60	365	126	80	131	139	123	103	163	136	19
70	229	79	61	100	91	81	63	100	90	12
80	293	101	58	95	95	84	69	110	98	11
90	310	107	57	93	98	87	68	108	99	10
100	307	106	56	92	98	87	75	119	101	15
110	327	113	57	93	99	88	74	117	103	15
120	309	107	57	93	98	87	74	117	101	14
140	301	104	59	97	97	86	73	116	101	13
160	305	106	63	103	97	86	74	117	103	13
180	275	95	69	113	97	86	74	117	103	15
200	268	93	75	123	97	86	72	114	104	18
220	260	90	75	123	97	86	76	121	105	20
240	226	78	77	126	98	87	76	121	103	24
260	229	79	78	128	99	88	76	121	104	24
280	227	79	79	130	101	89	76	121	105	24
300	215	74	79	130	102	90	74	117	103	25
320	200	69	81	133	103	91	71	113	101	27
340	208	72	82	134	102	90	69	110	102	27
360	205	71	79	130	100	88	68	108	99	25

Priloga 4: Meritve TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen targesinu 60 min.
 Zeleno osenčen predel označuje obdobje izpostavljenosti urotelija targesinu. *A*- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, *R*- relativna vrednost TEU (% TEU glede na $t=30$ min), *POVP*- povprečje vseh relativnih TEU ob določenem času, *SD*- standardni odklon relativnih TEU ob določenem času.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		3. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	278	83	64	82	369	68	78	8
10	250	74	70	90	446	82	82	8
20	318	95	76	97	499	92	95	3
30	336	100	78	100	541	100	100	0
35	402	120	69	88	748	138	115	25
40	406	121	82	105	907	168	131	33
45	473	141	81	104	998	184	143	40
50	466	139	70	90	1188	220	149	66
55	482	143	75	96	1313	243	161	75
60	425	126	75	96	1232	228	150	69
70	489	146	78	100	1372	254	166	79
80	549	163	80	103	1396	258	175	78
90	536	160	81	104	1551	287	183	94
100	317	94	50	64	658	122	93	29
110	320	95	61	78	723	134	102	28
120	410	122	70	90	851	157	123	34
140	422	126	76	97	915	169	131	36
160	492	146	76	97	966	179	141	41
180	495	147	76	97	866	160	135	33
200	564	168	75	96	987	182	149	46
220	561	167	75	96	943	174	146	43
240	570	170	75	96	951	176	147	44
260	593	176	75	96	907	168	147	44
280	552	164	75	96	999	185	148	46
300	550	164	73	94	915	169	142	42
320	516	154	73	94	1020	189	145	48
340	558	166	73	94	1076	199	153	54
360	531	158	72	92	1090	201	151	55

Priloga 5: Meritve TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen mitomicinu C 30 min.
 Oranžno osenčen predel označuje obdobje izpostavljenosti urotelija mitomicinu C. *A*- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, *R*- relativna vrednost TEU (% TEU glede na t=30 min), *POVP*- povprečje vseh relativnih TEU ob določenem času, *SD*- standardni odklon relativnih TEU ob določenem času.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		3. meritev		4. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	94	92	324	98	148	90	222	96	94	4
10	95	93	325	98	154	94	226	97	96	3
20	99	97	327	99	158	96	223	96	97	1
30	102	100	330	100	164	100	232	100	100	0
35	84	82	205	62	127	77	167	72	73	9
40	85	83	229	69	130	79	172	74	77	6
45	86	84	240	73	134	82	175	75	79	5
50	87	85	246	75	137	84	174	75	80	6
55	88	86	241	73	140	85	176	76	80	7
60	88	86	252	76	143	87	179	77	82	6
70	55	54	262	79	98	60	102	44	59	15
80	89	87	305	92	135	82	154	66	82	11
90	106	104	339	103	145	88	173	75	92	14
100	112	110	350	106	165	101	198	85	100	11
110	116	114	356	108	176	107	214	92	105	9
120	118	116	374	113	185	113	219	94	109	10
140	120	118	389	118	194	118	234	101	114	9
160	124	122	397	120	201	123	242	104	117	9
180	128	125	410	124	209	127	242	104	120	11
200	126	124	428	130	211	129	250	108	122	10
220	124	122	453	137	210	128	252	109	124	12
240	122	120	462	140	204	124	250	108	123	13
260	122	120	444	135	198	121	256	110	121	10
280	119	117	423	128	191	116	253	109	118	8
300	117	115	397	120	190	116	247	106	114	6
320	113	111	365	111	187	114	247	106	110	3
340	109	107	318	96	186	113	245	106	106	7
360	105	103	303	92	191	116	239	103	104	10

Priloga 6: Meritve TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen mitomicinu C 60 min.
 Oranžno osenčen predel označuje obdobje izpostavljenosti urotelija mitomicinu C. *A*- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, *R*- relativna vrednost TEU (% TEU glede na t=30 min), *POVP*- povprečje vseh relativnih TEU ob določenem času, *SD*- standardni odklon relativnih TEU ob določenem času.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	486	98	205	90	94	5
10	509	103	214	94	98	6
20	477	96	220	97	97	1
30	496	100	227	100	100	0
35	307	62	169	74	68	9
40	319	64	170	75	70	7
45	325	66	175	77	71	8
50	324	65	178	78	72	9
55	322	65	180	79	72	10
60	320	65	187	82	73	13
70	364	73	186	82	78	6
80	457	92	199	88	90	3
90	426	86	192	85	85	1
100	135	27	107	47	37	14
110	190	38	150	66	52	20
120	236	48	184	81	64	24
140	334	67	231	102	85	24
160	431	87	249	110	98	16
180	481	97	291	128	113	22
200	475	96	307	135	116	28
220	420	85	311	137	111	37
240	404	81	302	133	107	36
260	364	73	296	130	102	40
280	362	73	279	123	98	35
300	351	71	266	117	94	33
320	324	65	265	117	91	36
340	307	62	243	107	84	32
360	302	61	231	102	81	29

Priloga 7: Meritve TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen 0,5-% hitosanu 15 min. Modro osenčen predel označuje obdobje izpostavljenosti urotelija 0,5-% hitosanu. *A*- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, *R*- relativna vrednost TEU (% TEU glede na $t=30$ min), *POVP*- povprečje vseh relativnih TEU ob določenem času, *SD*- standardni odklon relativnih TEU ob določenem času.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		3. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	74	56	59	61	308	76	64	10
10	87	66	68	70	342	84	73	10
20	105	80	81	83	360	89	84	5
30	132	100	97	100	407	100	100	0
35	36	27	32	33	62	15	25	9
40	25	19	20	21	55	13	18	4
45	25	19	22	22	44	11	17	6
50	22	17	21	21	38	9	16	6
55	28	22	28	28	48	12	21	8
60	32	24	33	34	62	15	24	9
70	41	31	42	43	86	21	32	11
80	46	35	46	48	109	27	37	10
90	50	38	49	50	133	33	40	9
100	52	40	50	51	158	39	43	7
110	54	41	49	51	184	45	46	5
120	57	43	50	51	208	51	48	5
140	68	52	56	57	245	60	56	4
160	77	58	57	58	278	68	62	6
180	89	68	57	59	312	77	68	9
200	107	81	64	66	337	83	76	9
220	129	98	74	76	354	87	87	11
240	150	114	87	89	364	90	97	14
260	167	126	97	99	385	95	107	17
280	214	162	115	118	395	97	126	33
300	251	190	131	134	409	101	142	45
320	274	208	138	142	417	103	151	53
340	309	234	148	151	454	112	166	63
360	333	253	161	165	464	114	177	70

Priloga 8: Meritve TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen 0,5-% hitosanu 30 min.
 Modro osenčen predel označuje obdobje izpostavljenosti urotelija 0,5-% hitosanu. *A*- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, *R*- relativna vrednost TEU (% TEU glede na t=30 min), *POVP*- povprečje vseh relativnih TEU ob določenem času, *SD*- standardni odklon relativnih TEU ob določenem času.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	118	103	181	96	99	5
10	118	103	192	102	102	1
20	117	102	186	98	100	2
30	115	100	189	100	100	0
35	80	70	70	37	53	23
40	52	45	55	29	37	11
45	50	43	52	28	35	11
50	42	37	45	24	30	9
55	41	36	39	21	28	11
60	38	33	33	17	25	11
70	34	30	29	15	22	10
80	34	30	31	16	23	9
90	34	30	33	17	24	9
100	36	31	34	18	25	9
110	38	33	37	20	26	10
120	40	35	37	20	27	11
140	43	37	39	21	29	12
160	43	37	38	20	29	12
180	44	38	39	21	29	12
200	45	39	40	21	30	13
220	46	40	43	23	31	12
240	48	42	47	25	33	12
260	50	43	48	25	34	13
280	56	49	57	30	39	13
300	58	50	60	32	41	13
320	60	52	65	34	43	13
340	62	54	70	37	45	12
360	63	55	74	39	47	11

Priloga 9: Meritve TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen 0,5-% hitosanu 60 min.
 Modro osenčen predel označuje obdobje izpostavljenosti urotelija 0,5-% hitosanu. *A*- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, *R*- relativna vrednost TEU (% TEU glede na $t=30$ min), *POVP*- povprečje vseh relativnih TEU ob določenem času, *SD*- standardni odklon relativnih TEU ob določenem času.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	391	100	193	83	92	12
10	391	100	216	93	97	5
20	403	103	224	97	100	5
30	391	100	232	100	100	0
35	76	19	60	26	23	5
40	99	25	74	32	29	5
45	82	21	67	29	25	6
50	68	17	54	23	20	4
55	65	17	48	21	19	3
60	59	15	42	18	17	2
70	46	12	34	15	13	2
80	36	9	49	21	15	8
90	32	8	28	12	10	3
100	26	7	26	11	9	3
110	27	7	25	11	9	3
120	29	7	27	12	10	3
140	36	9	28	12	11	2
160	37	9	30	13	11	2
180	40	10	29	13	11	2
200	41	10	29	13	11	1
220	42	11	29	13	12	1
240	44	11	30	13	12	1
260	41	10	30	13	12	2
280	47	12	32	14	13	1
300	49	13	33	14	13	1
320	51	13	34	15	14	1
340	51	13	35	15	14	1
360	50	13	35	15	14	2

Priloga 10: Meritve TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen 0,05-% hitosanu 15 min. Modro osenčen predel označuje obdobje izpostavljenosti urotelija 0,05-% hitosanu. *A*- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, *R*- relativna vrednost TEU (% TEU glede na t=30 min), *POVP*-povprečje vseh relativnih TEU ob določenem času, *SD*- standardni odklon relativnih TEU ob določenem času.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		3. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	292	104	125	89	87	101	98	8
10	244	87	130	92	87	102	94	8
20	277	99	137	97	88	103	100	3
30	280	100	141	100	86	100	100	0
35	47	17	43	30	43	50	33	17
40	41	15	32	23	36	42	26	14
45	35	13	32	23	31	37	24	12
50	28	10	31	22	33	38	23	14
55	36	13	40	29	41	48	30	18
60	41	15	53	37	51	60	37	23
70	89	32	69	49	65	75	52	22
80	148	53	77	55	71	82	63	17
90	182	65	80	57	72	84	69	14
100	206	73	85	60	73	85	73	12
110	227	81	88	63	74	86	77	12
120	251	89	92	65	75	87	81	13
140	320	114	100	71	76	89	91	22
160	402	143	109	78	79	92	104	35
180	443	158	116	82	80	94	111	41
200	514	183	126	89	81	95	123	53
220	582	207	135	96	84	98	134	64
240	610	218	143	102	86	100	140	67
260	638	228	149	106	87	101	145	72
280	690	246	155	110	87	101	152	81
300	692	247	167	119	87	102	156	79
320	626	223	181	129	87	101	151	64
340	648	231	191	136	85	99	155	68
360	665	237	201	143	85	99	160	71

Priloga 11: Meritve TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen 0,05-% hitosanu 30 min. Modro osenčen predel označuje obdobje izpostavljenosti urotelija 0,05-% hitosanu. *A*- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, *R*- relativna vrednost TEU (% TEU glede na t=30 min), *POVP*-povprečje vseh relativnih TEU ob določenem času, *SD*- standardni odklon relativnih TEU ob določenem času.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		3. meritev		4. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	111	97	78	93	89	113	590	104	101	9
10	113	98	81	96	89	113	590	104	103	7
20	115	100	82	98	78	99	590	104	100	3
30	115	100	84	100	79	100	568	100	100	0
35	55	48	55	65	44	56	112	20	47	20
40	42	37	51	61	41	52	71	13	40	21
45	42	37	39	46	36	46	50	9	34	18
50	41	36	35	42	37	47	53	9	33	17
55	35	30	32	38	37	47	61	11	32	15
60	32	28	32	38	36	46	56	10	30	15
70	33	29	31	37	39	49	48	8	31	17
80	38	33	32	38	41	52	80	14	34	16
90	44	38	36	43	45	57	122	21	40	15
100	49	43	40	48	48	61	152	27	44	14
110	52	45	42	50	49	62	187	33	48	12
120	55	48	44	52	49	62	220	39	50	10
140	60	52	48	57	51	65	285	50	56	6
160	63	55	51	61	52	66	356	63	61	5
180	66	57	53	63	54	68	394	69	65	6
200	71	62	56	67	55	70	413	73	68	5
220	80	70	59	70	58	73	443	78	73	4
240	90	78	61	73	59	75	460	81	77	4
260	99	86	63	75	61	77	466	82	80	5
280	109	95	65	77	62	78	489	86	84	8
300	113	98	69	82	63	80	470	83	86	8
320	115	100	72	86	64	81	483	85	88	8
340	113	98	73	87	65	82	465	82	87	8
360	110	96	74	88	64	81	477	84	87	6

Priloga 12: Meritve TEU stene sečnih mehurjev, katerih urotelij je bil izpostavljen 0,05-% hitosanu 60 min. Modro osenčen predel označuje obdobje izpostavljenosti urotelija 0,05-% hitosanu. A- absolutna vrednost TEU stene sečnega mehurja, R- relativna vrednost TEU (% TEU glede na t=30 min), POVP- povprečje vseh relativnih TEU ob določenem času, SD- standardni odklon relativnih TEU ob določenem času.

Čas [min]	1. meritev		2. meritev		3. meritev		4. meritev		POVP [%]	SD [%]
	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]	A [Ωcm^2]	R [%]		
0	92	95	126	98	343	78	199	64	84	16
10	92	95	126	98	374	86	255	82	90	8
20	94	97	127	99	397	91	289	93	95	4
30	97	100	128	100	438	100	312	100	100	0
35	36	37	51	40	73	17	59	19	28	12
40	30	31	39	30	51	12	42	13	21	10
45	28	29	34	26	41	9	34	11	19	10
50	25	26	33	26	45	10	38	12	18	8
55	28	29	33	26	52	12	43	14	20	9
60	31	32	32	25	57	13	44	14	21	9
70	38	39	29	22	55	13	43	14	22	12
80	43	44	28	22	52	12	44	14	23	15
90	45	46	30	23	59	14	53	17	25	15
100	46	48	30	23	66	15	52	17	26	15
110	47	48	34	27	86	20	72	23	29	13
120	47	49	38	30	97	22	81	26	32	12
140	48	50	48	38	115	26	96	31	36	10
160	50	52	55	43	133	30	115	37	41	9
180	52	54	63	49	156	36	146	47	46	8
200	53	55	70	55	180	41	173	55	51	7
220	55	57	78	61	213	49	201	64	58	7
240	56	58	87	68	258	59	240	77	66	9
260	58	59	93	73	290	66	279	89	72	13
280	74	77	104	81	319	73	308	99	82	11
300	78	80	109	85	353	81	339	109	89	14
320	79	81	111	87	371	85	364	117	92	17
340	80	82	113	88	371	85	383	123	94	19
360	79	81	113	88	378	86	391	125	95	20