

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Eva LASIČ

**MOLEKULARNA IN FUNKCIONALNA
DIFERENCIRANOST S TKIVNIM INŽENIRSTVOM
VZPOSTAVLJENEGA UROTELIJA NA
AMNIJSKI MEMBRANI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Eva LASIČ

**MOLEKULARNA IN FUNKCIONALNA DIFERENCIRANOST S
TKIVNIM INŽENIRSTVOM VZPOSTAVLJENEGA UROTELJA
NA AMNIJSKI MEMBRANI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MOLECULAR AND FUNCTIONAL DIFFERENTIATION OF
THE UROTHELIUM ESTABLISHED ON THE AMNIOTIC
MEMBRANE WITH TISSUE ENGINEERING**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključno delo univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Matejo Erdani Kreft in za recenzentko prof. dr. Jasno Štrus.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Jasna ŠTRUS
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Mateja ERDANI KREFT
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

Datum zagovora: 19. 4. 2013

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Eva Lasič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK 576.3:575(043.3)=163.6
KG urotelij/amnijska membrana/diferenciacija/TER/permeabilnost
AV LASIČ, Eva
SA ERDANI KREFT, Mateja (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2013
IN MOLEKULARNA IN FUNKCIONALNA DIFERENCIRANOST S TKIVNIM
INŽENIRSTVOM VZPOSTAVLJENEGA UROTELIJA NA AMNIJSKI
MEMBRANI
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP IX, 64 str., 2 pregl., 21 sl., 196 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Amnijska membrana (AM) ima velik potencial za uporabo v tkivnem inženirstvu, ker spodbuja rast in diferenciacijo celic. Pri rekonstrukcijah urinarnega trakta je bistveno, da je vzpostavljen urotelij funkcionalno enak nativnemu uroteliju, ki je najtesnejši epitelij v človeškem telesu in deluje kot krvno-urinska pregrada. Za vzpostavitev urotelija smo uporabili AM kot nosilec s tremi različnimi postopki. Urotelijske celice smo nasadili na amnijske epitelijske celice, vezivno tkivo ter bazalno lamino, iz katere smo predhodno odstranili epitelijske celice. Celice smo gojili 2–5 tednov in merili njihovo transepitelijsko upornost. Ob koncu gojenja smo analizirali njihovo molekularno diferenciranost z imunooznačevanjem ter ovrednotili njihovo funkcionalno diferenciranost z ugotavljanjem permeabilnosti konstruktov za dekstran. Urotelijske celice so na vseh nosilcih tvorile večskladen urotelij in izražale diferenciacijske označevalce uroplakine ter citokeratine CK7 in CK20. Vzpostavile so tesne stike in izražale protein tesnih epitelijev, klavdin-8. Transkripcijski dejavnik p63, ki je značilen za proliferajoče celice, so izražale le bazalne celice urotelija. Najvišjo stopnjo diferenciacije so dosegle urotelijske celice, ki smo jih nasadili na vezivno tkivo AM. Tako smo dokazali primernost AM za pritrditev in molekularno diferenciacijo urotelijskih celic. Funkcionalnega urotelija, ki naj bi služil kot krvno-urinska pregrada nismo vzpostavili, ker urotelijske celice niso dosegle konfluentnosti na nobenem nosilcu. Za ovrednotenje AM kot primerne nosilca za vzpostavitev funkcionalnega urotelija bodo potrebne še nadaljnje raziskave.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Dn
DC 576.3:575(043.3)=163.6
CX urothelium/amniotic membrane/differentiation/TER/permeability
AU LASIČ, Eva
AA ERDANI KREFT, Mateja (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2013
TI MOLECULAR AND FUNCTIONAL DIFFERENTIATION OF THE
UROTHELIUM ESTABLISHED ON THE AMNIOTIC MEMBRANE
WITH TISSUE ENGINEERING
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 64 p., 2 tab., 21 fig., 196 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The amniotic membrane (AM) has considerable potential use in tissue engineering due to its many beneficial properties, which provide a good environment for cell growth and differentiation. The ability to generate urothelium functionally equivalent to native urothelium, which serves as the blood-urine barrier, is crucial in urinary tissue replacement. To establish a functional urothelium, we utilized AM as a scaffold in three ways. We cultured urothelial cells on the AM epithelial cells, stromal matrix, and basal lamina, which we decellularized prior to seeding. We propagated the urothelial cells 2–5 weeks and monitored their transepithelial resistance. We evaluated their molecular differentiation with immunolabelling and their functional differentiation by assessing dextran permeability of the constructs. Urothelial cells on all scaffolds stratified into a multilayered urothelium and expressed the differentiation-related proteins uroplakins and cytokeratins CK7 and CK20. They formed tight junctions and expressed claudin-8, characteristic of tight urothelia. Only the basal cells stained positive for the transcription factor p63, indicating that the superficial urothelial cells reached terminal differentiation. The urothelial cells achieved the highest stage of differentiation when cultured on the stromal side of the AM. We have demonstrated that the AM is a suitable scaffold for the adhesion and molecular differentiation of urothelial cells. However because the urothelial cells did not reach confluence, we were unable to establish a functional urothelial barrier on any of the scaffolds. Additional studies are necessary to determine the suitability of the AM as a scaffold for functional urothelial development.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	IX
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV.....	2
2.1 UROTELIJ.....	2
2.1.1 Neprepustnost urinarnega trakta.....	2
2.1.2 Diferenciranost urotelija.....	2
2.1.3 Permeabilnost urotelija.....	3
2.1.4 Paracelularna upornost.....	3
2.1.4.1 Tesni stiki.....	4
2.1.4.1.1 Klavdini.....	4
2.1.5 Transcelularna upornost.....	5
2.1.5.1 Ionski transport.....	5
2.1.5.2 Transport vode in sečnine.....	5
2.1.5.3 Glikozaminoglikani.....	6
2.1.5.4 Uroplakini.....	6
2.1.5.5 Lipidna sestava membran.....	7
2.1.5.6 Eksocitoza in kompenzacijska endocitoza.....	7
2.1.5.7 Konstitutivna endocitoza.....	8
2.2 URINARNI TRAKT V TKIVNEM INŽENIRSTVU.....	8
2.2.1 Sintetični nosilci.....	8
2.2.2 Brezcelični tkivni nosilci.....	9
2.2.3 Urotelij <i>in vitro</i>.....	9
2.3 AMNIJSKA MEMBRANA.....	10
2.3.1 Pomen AM v tkivnem inženirstvu.....	10
2.3.1.1 AM spodbuja epitelizacijo.....	11
2.3.1.2 AM deluje proti bakterijsko.....	11
2.3.1.3 AM zavira brazgotinjenje.....	11

2.3.1.4	AM deluje protivnetno in ima nizko imunogenost.....	11
2.3.1.5	AM je pluripotentna.....	12
2.3.1.6	AM ni tumorogena in zavira proliferacijo rakavih celic.....	13
2.3.2	Shranjevanje AM.....	13
2.3.3	Različni konstrukti AM.....	13
2.3.4	AM v tkivnem inženirstvu urinarnega trakta.....	14
3	MATERIAL IN METODE.....	15
3.1	HRANILNI MEDIJ.....	15
3.2	PRAŠIČJE UROTELIJSKE CELICE.....	15
3.2.1	Odmrzovanje in nasajanje celic.....	15
3.3.	AMNIJSKA MEMBRANA.....	16
3.3.1	Pridobitev, shranjevanje, odmrzovanje in vpenjanje AM.....	16
3.3.2	Priprava različnih konstruktov.....	17
3.4	MERJENJE TER.....	17
3.5	MERJENJE PERMEABILNOSTI.....	18
3.5.1	Analiza permeabilnosti urotelija na PET nosilcih.....	18
3.5.2	Analiza permeabilnosti urotelija na nosilcih iz AM.....	18
3.5.3	Izračun permeabilnostnega koeficienta.....	19
3.6	IMUNOFLUORESCENČNO OZNAČEVANJE.....	20
3.6.1	Označevanje diferenciacijskih označevalcev urotelija.....	20
3.6.2	Označevanje kromatina z DAPI.....	20
3.7	PRIPRAVA HISTOLOŠKIH PARAFINSKIH REZIN.....	20
3.7.1	Priprava parafinskih rezin konstruktov za imunohistokemijo.....	20
3.7.2	Priprava parafinskih rezin AM za histologijo.....	21
3.8	HISTOLOŠKO IN HISTOKEMIJSKO BARVANJE AM.....	21
3.8.1	Barvanje hematoksilin – eozin.....	21
3.8.2	Barvanje alciansko modrilo.....	22
3.8.3	Barvanje PAS.....	22
3.8.4	Barvanje Calleja.....	22
3.8.5	Barvanje Verhoeff van Gieson.....	22
3.8.6	Barvanje Weigert van Gieson.....	22
3.9	IMUNOHISTOKEMIJSKO OZNAČEVANJE UROTELIJA NA AM.....	23
3.10	IMUNOFLUORESCENČNO OZNAČEVANJE AKVAPORINOV.....	24

4	REZULTATI.....	25
4.1	TOPOGRAFIJA NOSILCEV eAM, sAM in gAM.....	25
4.2	HISTOLOGIJA IN HISTOKEMIJA NOSILCEV IZ AM.....	26
4.3	IMUNOFLUORESCENCA AM.....	29
4.4	RAST PRAŠIČJIH UROTELIJSKIH CELIC NA NOSILCIH IZ AM.....	30
4.5	VREDNOSTI TRANSEPITELIJSKE UPORNOSTI KONSTRUKTOV.....	32
4.6	VREDNOSTI PERMEABILNOSTNIH KOEFICIENTOV KONSTRUKTOV.....	35
4.7	IMUNOFLUORESCENCA UROTELIJSKIH CELIC NA NOSILCIH IZ AM.....	37
4.7.1	Imunofluorescenca citokeratina 20.....	37
4.7.2	Imunofluorescenca uroplakinov.....	37
4.7.3	Imunofluorescenca uroplakina UPIIIa.....	38
4.7.4	Imunofluorescenca transkripcijskega dejavnika p63.....	39
4.7.5	Imunofluorescenca proteina tesnega stika klavdina-8.....	40
4.7.6	Imunofluorescenca akvaporinov.....	41
4.8	IMUNOHISTOKEMIJA UROTELIJSKIH CELIC NA NOSILCIH IZ AM.....	42
4.8.1	Imunohistokemija uroplakinov.....	42
4.8.1.1	Imunohistokemija uroplakina UPIIIa.....	42
4.8.2	Imunohistokemija citokeratinov.....	43
4.8.2.1	Imunohistokemija CK20.....	43
4.8.2.2	Imunohistokemija CK7.....	43
4.8.3	Imunohistokemija transkripcijskega dejavnika p63.....	44
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	45
5.1	RAZPRAVA.....	45
5.1.1	AM ohrani morfologijo po dolgotrajnem shranjevanju pri –80 °C.....	45
5.1.2	AEC ne preživijo zamrzovanja.....	46
5.1.3	AM ima nizek TER in visoko permeabilnost.....	46
5.1.4	Termolizin učinkovito odstrani AEC in omogoča rast urotelijskih celic.....	47
5.1.5	AM, vpeta na nastavku, ni primeren nosilec za gojenje urotelijskih celic....	47
5.1.6	AM, vpeta z obročkom, omogoča diferenciacijo urotelijskih celic.....	48
5.1.7	Urotelij, vzpostavljen na AM, izraža AQP podobno kot nativni urotelij.....	49
5.1.8	Prašičje urotelijske celice ne tvorijo funkcionalne pregrade na AM.....	50
5.2	SKLEPI.....	51
6	POVZETEK.....	52
7	VIRI.....	53

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Sestava hranilnega medija za prašičje urotelijske celice.....	15
Pregl. 2: Elektrofiziološki parametri konstruktov.....	35

KAZALO SLIK

Sl. 1: Oprema za gojenje celic.....	17
Sl. 2: Topografija nosilcev iz AM.....	25
Sl. 3: AM nosilci barvani s hematoksilinom-eozinom.....	26
Sl. 4: Histokemijsko barvanje AM z alcianskim modrilom in barvanjem PAS.....	27
Sl. 5: Histokemijska barvanja AM.....	28
Sl. 6: Imunofluorescenca AM.....	29
Sl. 7: Kulture prašičjih urotelijskih celic 2 dni po nasaditvi na različne nosilce iz AM.....	30
Sl. 8: Kulture prašičjih urotelijskih celic 8 dni po nasaditvi na različne nosilce iz AM.....	30
Sl. 9: Kulture prašičjih urotelijskih celic 14 dni po nasaditvi na različne nosilce iz AM.....	31
Sl. 10: Vrednosti TER konstruktov prašičjih urotelijskih celic na posameznih nosilcih.....	32
Sl. 11: Vrednosti TER konstruktov prašičjih urotelijskih celic na različnih nosilcih.....	34
Sl. 12: Permeabilnost dekstrana skozi različne konstrukte.....	36
Sl. 13: Imunofluorescenca CK20 v urotelijskih celicah na vseh nosilcih iz AM.....	37
Sl. 14: Imunofluorescenca uroplakinov v urotelijskih celicah na vseh nosilcih iz AM.....	38
Sl. 15: Imunofluorescenca UPIIIa v urotelijskih celicah na vseh nosilcih iz AM.....	38
Sl. 16: Imunofluorescenca p63 v urotelijskih celicah na vseh nosilcih iz AM.....	39
Sl. 17: Imunofluorescenca klavdina-8 med urotelijskimi celicami na nosilcih iz AM.....	40
Sl. 18: Imunofluorescenca akvaporinov v urotelijskih celicah na vseh nosilcih iz AM.....	41
Sl. 19: Imunohistokemija uroplakinov na vseh konstruktih.....	42
Sl. 20: Imunohistokemija citokeratinov CK20 in CK7 na vseh konstruktih.....	43
Sl. 21: Imunohistokemija transkripcijskega dejavnika p63 na vseh konstruktih.....	44

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AEC	amnijske epiteljske celice
AM	amnijska membrana
AMC	amnijske mezenhimatske celice
AUM	asimetrična odebeljena plazmalema (angl. <i>Asymmetric Unit Membrane</i>)
AQP	akvaporini
BAMG	angl. <i>Bladder Acellular Matrix Graft</i>
CK	citokeratini
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol; fluorescenčno barvilo, ki obarva kromatin
DFV	diskoidalni in fuziformni vezikli
eAM	amnijska membrana z navzgor obrnjenim epitelijem
GAG	glikozaminoglikani
gAM	amnijska membrana z odstranjenim epitelijem (gola)
HA	hialuronska kislina
HC·HA	kompleks inter- α -inhibitorja in hialuronske kisline
HLA	humani levkocitni antigeni (angl. <i>Human Leukocyte Antigen</i>)
IF	intermediarni filamenti
MCPK	mononuklearne celice periferne krvi
p63	transkripcijski dejavnik
P _{app}	permeabilnostni koeficient
PBS	fosfatni pufer (angl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PET	sintetični polimer polietilen teraftalat
PuIII– VI	prašičje uroteljske celice III. do VI. pasaže
PUC	površinske uroteljske celice
RFU	relativne fluorescenčne enote (angl. <i>Relative Fluorescence Units</i>)
sAM	amnijska membrana z navzgor obrnjenim vezivnim tkivom (stromo)
SIS	angl. <i>Small Intestinal Submucosa</i>
TER	transepiteljska upornost (angl. <i>TransEpithelial Resistance</i>)
TGF	transformirajoči rastni dejavnik (angl. <i>Transforming Growth Factor</i>)
TL	termolizin
TS	tesni stik
UP	uroplakini (Ia, Ib, II, IIIa)
ZCM	zunajcelični matriks

1 UVOD

Amnijsko membrano (AM) se vedno več uporablja v regenerativni medicini zaradi njenih bioloških in mehanskih lastnosti. Kot nosilec za celične kulture se AM uporablja na tri načine. Lahko nasadimo celice na njene epitelijske celice (AEC), na njeno vezivno tkivo ali pa z encimsko razgradnjo odstranimo njene epitelijske celice in nasadimo celice na spodaj ležečo bazalno lamino. Vse tri podlage izkoriščajo za gojenje celic in tudi mi smo preizkusili vse tri nosilce za vzpostavitev urotelija *in vitro*. Urotelij služi kot krvno-urinska pregrada in je najbolj neprehoden epitelij v človeškem telesu. Bistveno je, da je s tkivnim inženirstvom vzpostavljen urotelij čim bolj podoben nativnemu uroteliju. Predhodna raziskava je potrdila primernost AM za pritrnitev in morfološko diferenciacijo urotelijskih celic (Dragin 2010). Mi smo pa dodatno ovrednotili primernost AM za vzpostavitev funkcionalno diferenciranega urotelija, ki naj bi služil kot neprehodna pregrada. Predvidevajo, da AEC niso dober substrat za rast celic, saj naj bi ovirale rast in preprečile stik z bolj primernim adhezijskim substratom, z zunajceličnim matriksom (Koizumi in sod. 2000a). Vendar AEC izločajo dejavnike, ki zavirajo celice imunskega sistema (Li in sod. 2005), ter rastne dejavnike, ki spodbujajo epitelizacijo in odstranjevanje AEC zmanjša njihovo količino (Koizumi in sod. 2000c). Z izločanjem signalnih molekul imajo AEC ugoden parakrini vpliv na rast celic (Parolini in sod. 2011) in zato menimo, da je nosilec AM z intaktnim epitelijem, kateremu nasadimo celice na vezivno tkivo, najbolj optimalen za rast urotelijskih celic. Mnogo raziskav je pokazalo primernost AM za gojenje celic ter uspešne transplantacije, vendar o primernosti AM kot nosilca za urotelijske celice obstaja zelo malo, pa še to nasprotujočih informacij.

Namen našega dela je bil uspešno vzpostaviti diferenciran in funkcionalen urotelij na različnih nosilcih iz AM in proučiti njegovo molekularno in funkcionalno diferenciranost. Z imunooznačevanjem specifičnih označevalcev diferenciranosti ter meritvami transepitelijske upornosti in permeabilnosti vzpostavljenih konstruktov smo želeli ugotoviti, ali je AM primerna za vzpostavitev urotelija ter kateri nosilec iz AM je najbolj primeren za rast in diferenciacijo urotelijskih celic.

Predpostavljali smo, da bo rast urotelijskih celic uspešna na vseh nosilcih in da bodo celice na vseh nosilcih vzpostavile urotelij z visokimi vrednostmi TER in nizko permeabilnostjo. Predpostavljali smo tudi, da bodo različni tipi nosilcev iz AM vplivali na molekularno in funkcionalno diferenciranost vzpostavljenega urotelija in da bo na vezivnem tkivu vzpostavljen urotelij najbolj diferenciran.

2 PREGLED OBJAV

2.1 UROTELIJ

2.1.1 Neprepustnost urinarnega trakta

Urotelij je 3–5-skladen epitelij, ki meji na lumen urinarnega trakta od ledvične kotanje do proksimalne sečnice, vključno s sečnim mehurjem (Apodaca 2004). Sečni mehur mora biti sposoben shraniti urin za daljša časovna obdobja in zaradi potencialno strupenih koncentracij sečnine, amoniaka in drugih toksičnih metabolitov, se sestava urina ne sme bistveno spremeniti med transportom in shrambo v urinarnem traktu. Sečni mehur je kroglaste oblike in že to minimalizira razmerje med površino urotelija in prostornino urina, kar zmanjša možnost pasivnega prehajanja snovi skozi njegovo steno (Lewis 2000). Vendarle, funkcionalna pregrada med urinom in krvjo ima najvišjo zabeleženo transepitelijsko upornost (TER), ki znaša do $78,000 \Omega\text{cm}^2$ (Lewis in sod. 1976). Tako je urotelij najmanj prehodna pregrada v človeškem telesu, kar ne bi bilo možno brez njegovih specifičnih molekularnih in morfoloških struktur.

2.1.2 Diferenciranost urotelija

Urotelij je sestavljen iz treh vrst celic, in sicer iz spodnjega sklada majhnih bazalnih celic (s premerom $\sim 10 \mu\text{m}$), vmesnih skladov iz več piriformnih vmesnih celic (s premerom $10\text{--}25 \mu\text{m}$) ter zgornjega sklada visoko diferenciranih poliedričnih površinskih celic (s premerom $25\text{--}250 \mu\text{m}$) (Apodaca 2004). Posamezni skladi urotelija se razlikujejo po svoji stopnji diferenciranosti, tako so bazalne celice še nediferencirane, vmesne celice delno diferencirane, površinske urotelijske celice (PUC) pa visoko diferencirane (Kreft in sod. 2009a). Za tovrstno stratifikacijo urotelija je odgovoren transkripcijski dejavnik p63 (Barbieri in sod. 2006), ki je potreben za iniciacijo stratifikacije epitelija, zavira terminalno diferenciacijo in vzdržuje proliferacijski potencial bazalnih celic (Koster in sod. 2004). Zato se gen p63 močno izraža v epitelijah, ki imajo visoko klonogeno in proliferativno kapaciteto (Senoo in sod. 2007). Tako so pričakovana opažanja, da je p63 močno prisoten v regenerativnih bazalnih in vmesnih celicah urotelija, medtem ko pa v končno diferenciranih PUC p63 ni prisoten (Feil in sod. 2008, Karni-Schmidt in sod. 2011). Dodatni dokaz vloge p63 pri razvoju večskladnega epitelija je, da miši z izbitim genom za p63 izražajo enoskladen urotelij, ki izraža uroplakin UPII in citokeratine (CK) nizkih molekularnih mas; oboji so označevalci visoko diferenciranih PUC (Karni-Schmidt in sod. 2011). CK so značilni intermediarni filamenti (IF) epitelija, ki so prisotni v zelo specifičnih vzorcih odvisno od tipa in diferenciranosti epitelija. IF so zelo stabilni, dolgi in nerazvejani

filamenti s premerom ~10 nm in so pomembni za mehansko stabilnost ter integriteto epitelija. Raztezajo se po citoplazmi in se pritrjajo na dezmosome kot tudi hemidezmosome in s tem prispevajo tudi k stabilnosti bazalne lamine (Moll in sod. 2008). Za določeno stopnjo diferenciranosti celic so značilni določeni CK, tako sta za PUC značilna CK20 in CK10, za bazalne in vmesne celice CK5, CK13 in CK17, medtem ko so CK7, CK8, CK18 in CK19 prisotni v vseh skladih urotelija (Moll in sod. 1988, Harnden in sod. 1996, Harnden in sod. 1999, Southgate in sod. 1999, Moll in sod. 2008). Še posebej zanimiva sta CK7 in CK20, ki v PUC tvorita subapikalno gosto mrežo (Veranic in sod. 2002). Tretji specifični označevalci diferenciranosti urotelijskih celic so uroplakini (UP). UP so transmembranski proteini, ki so prisotni v apikalni plazmalemi visoko diferenciranih PUC (Kreft in sod. 2009a). UP kot tudi druge lastnosti PUC so odgovorni za neprehodno pregrado urotelija.

2.1.3 Permeabilnost urotelija

PUC imajo s 40 tednov dolgim celičnim ciklom dolgo življenjsko dobo (Jost 1989), kar tudi prispeva k nizki permeabilnosti urotelija. Glavno pregrado predstavlja apikalna plazmalema PUC, ki je edinstvena s svojimi specializacijami, kot so transmembranski proteini UP, površinska plast glikozaminoglikanov in specifična lipidna sestava, kar vse vpliva na potek pasivne difuzije, ionskega transporta in endocitoze. Neprehodni tesni stiki (TS), prisotni na apikolateralnih stikih med PUC, dodatno prispevajo k nepermeabilnosti urotelija. Izjemno visok TER urotelija je posledica visokih paracelularnih in transcelularnih upornosti (Claude 1978).

2.1.4 Paracelularna upornost

Paracelularna upornost urotelija je odvisna od upornosti medceličnega stika in upornosti lateralnega medceličnega prostora (Claude 1978, Powell 1981). Vendar upornost lateralnega medceličnega prostora predstavlja le manj kot 10 % celotne paracelularne upornosti (Claude 1978). Paracelularni transport je pasivni in neusmerjen in zajema difuzijo in osmozo (Anderson 2001). TER je mera ionske permeabilnosti (Lewis 2000) in glavna pot za pasivno ionsko prehajanje ne gre skozi celico ampak skozi medcelične stike. Glede na velikost TER in relativno upornost transcelularnih in paracelularnih poti so epiteliji razdeljeni v »puščajoče« epitelije z vrednostjo TER manj kot $300 \Omega\text{cm}^2$ in »tesne« epitelije z vrednostjo TER nad $300 \Omega\text{cm}^2$. Tako je urotelij tesni epitelij (Fromter in sod. 1972). TER je odvisen od strukture in sestave tesnih stikov.

2.1.4.1 Tesni stiki

Medcelični stiki so bistveni za ohranjanje epitelijske arhitekture in pregradne funkcije ter zajemajo fokalne stike, adherentne stike, presledkovne stike, dezmosome in TS. TS so nameščeni najbolj apikalno na meji med apikalno in bazolateralno plazmalemo in so ključni mediatorji paracelularnega transporta (Balkovetz 2006). TS imajo zaporno funkcijo, ki omejuje paracelularno difuzijo med celicami, in ograjevalno funkcijo, ki vzdržuje polarnost apikalnih in bazolateralnih eksoplazemskih enoslojev (Acharya in sod. 2004). TS vsebuje ogrodne proteine, citosolne signalizirajoče proteine in transmembranske proteine, ki zagotavljajo velikostno in ionsko specifično pregrado. ZO-1 je ogrodni protein, ki organizira transmembranske proteine in veže citoplazemske proteine in aktinske filamente (Anderson 2001). Transmembranski proteini TS so JAM, okludin in klavdin. Okludin prečka membrano štirikrat, tvori homofilne povezave med celicami (Anderson 2001) in stabilizira TS (McCarthy in sod. 1996, Lacaz-Vieira in sod. 1999, Al-Sadi in sod. 2011, Cummins 2012). Vsi klavdini imajo štiri transmembranske domene, dve zunajcelični zanki in kratek znotrajcelični COOH rep (Tsukita in sod. 2001). Aminokislinska sestava izvencelične zanke določa paracelularno prevodnost, ker določa značilnosti pore in tako služi kot "elektrostatični selektivni filter" (Van Itallie in sod. 2004, Anderson in sod. 2009). Obstaja vsaj 24 klavdinskih izooblik (Tsukita in sod. 1999), ki so sposobne heterofilnih kot tudi homofilnih vezi med celicami in so odgovorne za raznolike lastnosti pregrade (Anderson 2001, Angelow in sod. 2008).

2.1.4.1.1 Klavdini

Različne študije so pokazale prisotnost velikega števila klavdinov v uroteliju, in sicer klavdin-1, -3, -4, -5, -7, -8, -12, -14 in -16 (Acharya in sod. 2004, Kreft in sod. 2006, Varley in sod. 2006, Rickard in sod. 2008). Klavdin-4, okludin in ZO-1 so lokalizirani na plazmalemi vseh urotelijskih celic in lahko okrepijo celične stike, kar je pomembno v tkivih izpostavljenih mehničnim stresom, kot je stena sečnega mehurja (Acharya in sod. 2004, Kreft in sod. 2006). V TS sta prisotna klavdin-8 in -12 (Acharya in sod. 2004, Kreft in sod. 2006) in sta tako označevalca TS diferenciranih PUC. Klavdin-8 znižuje izražanje klavdina-2 in tako zmanjša permeabilnost (Yu in sod. 2003), saj klavdin-2 poveča kationsko permeabilnost in je značilen za puščajoče epitelijske celice (Amasheh in sod. 2002, Kiuchi-Saishin in sod. 2002) ter ni prisoten v uroteliju (Acharya in sod. 2004).

Klavdinske pore imajo premer 0,4 nm (Anderson in sod. 2009). Njihova regulacija permeabilnosti je odvisna od sestave in razpolovne dobe klavdinov v TS. Velika raznolikost paracelularne permeabilnosti TS je posledica velikega števila možnih kombinacij klavdinskih izooblik (Balkovetz 2006). Model "dveh poti" predlaga, da molekule, večje od 0,4 nm, prečkajo brez selektivnosti skozi začasne prekinitve v TS, medtem ko klavdinske pore ločujejo manjše molekule glede na njihov naboj in velikost. Čeprav klavdinska pora deluje kot filter, je vseeno večja od transmembranskih kanalčkov in je tako tudi manj specifična za ione (Anderson in sod. 2009).

2.1.5 Transcelularna upornost

Ob paracelularni poti je tudi transcelularna pot, ki vsebuje dve vzporedni upornosti: apikalno in bazolateralno plazmalemo PUC (Claude 1978, Powell 1981). Citoplazma je tudi del transcelularne poti, vendar je njena upornost zanemarljiva. Apikalna plazmalema ima večjo upornost kot bazolateralna plazmalema, katere upornost znaša le $1500 \Omega\text{cm}^2$ (Clausen in sod. 1979). Transcelularni transport je usmerjen in odvisen od energije ter vključuje prenašalce in kanalčke (Anderson 2001).

2.1.5.1 Ionski transport

Urotelij aktivno absorbira Na^+ ione in s tem prepreči njihovo izgubo iz telesa (Lewis in sod. 1976, Lewis 2000), tudi s pomočjo aldosterona, ki stimulira transport Na^+ ionov skozi apikalno plazmalemo (Lewis in sod. 1976, Lewis in sod. 1983, Cross in sod. 2005). V apikalni plazmalemi so Na^+ -kanali (Smith in sod. 1998) in K^+ -kanali, ki lahko regulirajo celični volumen in osmolalnost (Spector in sod. 2008). Tudi v bazolateralni plazmalemi so kanali za Na^+ in K^+ ione (Frings in sod. 1990) kot tudi ATPazna črpalka za izločanje Na^+ in prevzem K^+ ionov (Smith in sod. 1998, Cross in sod. 2005). Mehanski dražljaji lahko vplivajo na ionski transport (Wang in sod. 2003b, Araki in sod. 2008, Yu in sod. 2009). Poleg mehansko odvisnih ionskih kanalov so v uroteliju še različni receptorji, ki določajo njegovo senzorično vlogo (Birder 2005, Araki in sod. 2008, Khandelwal in sod. 2009).

2.1.5.2 Transport vode in sečnine

Edinstveno specializirana apikalna plazmalema PUC je glavna pregrada permeabilnosti in predstavlja 80 %, 96 %, 97 % in >99 % upora do pretoka vode, sečnine, amonijevih ionov in protonov (Negrete in sod. 1996a).

Akvaporini (AQP) so transmembranski proteini, ki transportirajo vodo (Rubenwolf in sod. 2009). AQP-2 in -3 sta prisotna na plazmalemah vseh urotelijskih celic, razen na apikalni plazmalemi PUC (Spector in sod. 2002). Raziskave na celičnih kulturah so pokazale, da so AQP-3, -4 in -7 v proliferativnih celicah prisotni v citoplazmi, v diferenciranih celicah pa na plazmalemah. AQP-9 je izražen le v diferenciranih celicah (Rubenwolf in sod. 2009). Predvidevajo, da AQP tvorijo transepitelijsko pot za vodo in tako regulirajo celični volumen in osmotski pritisk v uroteliju (Spector in sod. 2002). Dodatno pa AQP ne transportirajo samo vode, ampak tudi sečnino, glicerol in pirimidine. Tako imenovani akvagliceroporini (kot so npr. AQP-3, -7 in -9) bi lahko sodelovali pri transportu sečnine v uroteliju (Rubenwolf in sod. 2009).

Sečnina in kreatinin se nenehno reabsorbirata iz urina (Spector in sod. 2007) in velike spremembe koncentracij le-teh nakazujejo, da gre za olajšani ali aktivni transport. Urea-transporter B je močno izražen na plazmalemi vseh urotelijskih celic, razen na apikalni plazmalemi PUC in verjetno regulira transport skozi urotelij, celični volumen in osmolalnost (Spector in sod. 2004, Lucien in sod. 2005).

2.1.5.3 Glikozaminoglikani

Pomembno prispeva k urotelijski pregradi tudi prisotnost glikozaminoglikanov (GAG) na apikalni plazmalemi PUC. Učinkujejo kot nespecifična antiadherenta pregrada z antibakterijskim delovanjem in regulirajo transcelularni transport (Lilly in sod. 1990, Hauser in sod. 2009). Večino GAG sestavljajo heparan sulfat, dermatan sulfat, hondroitin sulfat in hialuronska kislina (Hurst in sod. 1987). Sulfatni polisaharidi GAG so negativne polianionske hidrofilne molekule, ki vežejo vodo z visoko afiniteto (Lilly in sod. 1990, Parsons in sod. 1990). Inaktivacija GAG s protamin sulfatom poveča absorpcijo sečnine, vode in Ca^{2+} ionov ter zmanjša vrednost TER (Parsons in sod. 1990, Lavelle in sod. 2002).

2.1.5.4 Uroplakini

V apikalni plazmalemi PUC so številni urotelijski plaki, ki pokrivajo 70–90% njene površine (Staehelin in sod. 1972). Apikalna plazmalema je oblikovana v školjkaste mikrogrebene zaradi štrlečih neodebeljenih predelov med plake, ki so konkavni zaradi razlike v razporeditvi štirih UP med obema slojema dvosloja (Kreplak in sod. 2007). UPIa in UPIb prečkata membrano štirikrat, UPII in UPIIIa pa enkrat. Uroplakini se povezujejo v heterodimere UPIa/UII in UPIb/UIIIa. Heterodimeri se med seboj povezujejo v obročaste 16-nm heksagonalne uroplakinske delce (Min in sod. 2003) in urotelijski plak vsebuje 1000–3000 teh delcev (Apodaca 2004).

Urotelijski plaki zmanjšajo permeabilnost membrane na več načinov. Vsebujejo veliko centralno luknjo (s premerom 6 nm), kar pomeni, da večino površine (~62 %) sestavljajo lipidi (Min in sod. 2003). Ti lipidi so predvsem sfingolipidi (večinoma cerebrozid) in holesterol, ki so ključni za neprehodnost urotelijske pregrade (Hicks in sod. 1974, Vergara in sod. 1974, Stubbs in sod. 1979, Hill in sod. 2000). Urotelijski plaki tako organizirajo in omejuje gibanje lipidov. Takšna rigidna membrana zmanjša permeabilnost in tudi apikalno endocitozo, kar prepreči internalizacijo zunajceličnih substanc (Kreft in sod. 2009b). Dodatno, zaradi specifične razporeditve UP v membrani, so njihove zunajcelične domene večje od citoplazemskih, kar povzroča asimetrijo. Vsak membranski enosloj ima tako zelo različno sestavo in lahko deluje kot samostojna pregrada, kar prispeva k nepermeabilnosti (Negrete in sod. 1996b, Hill in sod. 2000, Min in sod. 2003). Neposredna vloga UP pri permeabilnosti pregradi je bila dokazana v raziskavi, kjer so imeli uroteliji miši z izbitim genom za UPIIIa večjo permeabilnost za vodo, sečnino, Na⁺ in K⁺ ione (Hu in sod. 2002).

2.1.5.5 Lipidna sestava membran

Lipidi v membranah vplivajo na permeabilnost membran. Spremenjena sestava lipidov vpliva na interakcije med UP in lahko celo zmanjša količino UP (Bongiovanni in sod. 2005). Sestava lipidov vpliva na organizacijo in rigidnost membrane in posledično tudi vpliva na endocitozo, reciklažo veziklov in lizosomsko razgradnjo (Grasso in sod. 2012). Lipidna sestava endocitiranih veziklov dodatno določa stopnjo puščanja njihovih vsebin v citoplazmo (Grasso in sod. 2009). Membrane PUC morajo maksimalno preprečiti uhajanje toksičnih snovi v svojo citoplazmo in apikalni endosomi dejansko imajo zelo nizko permeabilnost za vodo, sečnino in NH₃ (Chang in sod. 1994).

2.1.5.6 Eksocitoza in kompenzacijska endocitoza

Sečni mehur prestaja ciklične spremembe prostornine, katerim se prilagodi z morfološkimi spremembami in eksocitozo veziklov (Wang in sod. 2003a, Apodaca 2004). Neraztegnjene PUC so kubične, vsebujejo mnogo diskoidalnih fuziformnih veziklov (DFV) in imajo močno nagubano plazmalemo. Raztegnjene PUC pa so daljše, vsebujejo malo DFV in imajo sploščeno plazmalemo (Truschel in sod. 2002). Raztegovanje lahko povzroči do 50 % povečanje apikalne površine PUC zaradi eksocitoze DFV, kar kaže, da razgrinjanje nagubane plazmaleme ni edini mehanizem, uporabljen med polnjenjem mehurja (Minsky in sod. 1978, Truschel in sod. 2002, Wang in sod. 2003a, Yu in sod. 2009). Subapikalna citokeratinska mreža omogoča vzdrževanje mehanskega stresa. Obenem ima mreža mnogo tunelov, ki se raztezajo med polnjenjem mehurja in omogočajo transport DFV do apikalne plazmaleme (Veranic in

sod. 2002). Eksocitozi, sproženi z raztegovanjem, sledi kompenzacijska endocitoza apikalne plazmaleme (Truschel in sod. 2002, Khandelwal in sod. 2010). Z endocitozo nastajajo apikalni endosomi (Khandelwal in sod. 2010), ki se razlikujejo od DFV, ki se sintetizirajo *de novo* (Apodaca 2004, Khandelwal in sod. 2008). Končna destinacija endocitirane membrane je lizosom, kjer se razgradi (Truschel in sod. 2002, Khandelwal in sod. 2010).

2.1.5.7 Konstitutivna endocitoza

Med postnatalnim razvojem imajo diferencirane PUC zvišano endocitotsko aktivnost, ki regulira razvoj urotelija. Ko so PUC diferencirane, pa se njihova apikalna endocitotska aktivnost značilno zmanjša (Romih in sod. 1994). Minimalna endocitoza prispeva k permeabilnostni pregradi s tem, da minimalizira internalizacijo potencialno toksičnih substanc. Zmanjšana endocitoza je verjetno posledica rigidnosti velikih urotelijskih plakov in specifične prerazporeditve citoskeleta (Kreft in sod. 2009a).

2.2 URINARNI TRAKT V TKIVNEM INŽENIRSTVU

Tkivno inženirstvo proizvaja nova ali nadomestna tkiva, ki zamenjajo poškodovana ali patološka tkiva (Baker in sod. 2009). Potreba po učinkovitih metodah v regenerativni medicini urinarnega trakta je zelo aktualna, saj je okvar urinarnega trakta, kot so prirojene napake, rak, poškodbe, infekcije in vnetja, veliko (Atala 2011). Preživetje večine sesalskih celic je odvisno od pritrditve na ustrezno podlago. Različni biomateriali služijo kot umetni zunajcelični matriksi (ZCM) in morajo izzvati biološke in mehanske funkcije nativnega ZCM, zato morajo imeti primerne mehanske lastnosti in regulirati celično adhezijo, proliferacijo, migracijo ter diferenciacijo (Kim in sod. 2000a). Biomaterial mora biti biološko razgradljiv in tudi porozen, da omogoča dobro integracijo z gostiteljskim tkivom ter difuzijo hranil in presnovnih odpadkov (Falke in sod. 2000, Yang in sod. 2001, Baker in sod. 2009). Lahko celo služi kot skladišče, ki sprošča rastne dejavnike in druge bioaktivne molekule. Obstajajo tri vrste biomaterialov: naravni materiali, brezcelični tkivni nosilci in sintetični polimeri α -hidroksi kislin (Kim in sod. 2000a).

2.2.1 Sintetični nosilci

Sintetični polimerni biomateriali so lahko samo iz poliglikolne kisline, polimlečne kisline ali kopolimer mlečne in glikolne kisline (Falke in sod. 2000). Sintetični materiali imajo prednost, da je njihovo proizvodnja hitra, ponovljiva in fleksibilna ter se lažje

izogne kontaminaciji. Dodatno lahko kontroliramo njihovo mehansko moč, mikrostrukturo in hitrost razgradnje s fizikalnim ali kemičnim zamreženjem (Baker in sod. 2009, Atala 2011). Njihova slabost pa je pomanjkanje biološkega prepoznavanja (Kim in sod. 2000a, Cheng in sod. 2010).

2.2.2 Brezcelični tkivni nosilci

Brezcelični tkivni nosilci so naravni nosilci brez celic, vsebujejo pa veliko kolagena (Atala 2011). Najbolj pogosto uporabljeni tkivi sta submukoza tankega črevesa (SIS; angl. *small-intestinal submucosa*) ter submukoza sečnega mehurja (BAMG; angl. *bladder acellular matrix graft*). Uporaba SIS v regenerativni medicini povzroči mnogo komplikacij, kot so infekcije, metabolične motnje, urolitaze, perforacije, povečano izločanje mukusa ter malignost (Dahms in sod. 1998, Falke in sod. 2000, Subramaniam in sod. 2011). Tako je primernejši BAMG, ki nastane z odstranitvijo mukoze iz stene mehurja (Probst in sod. 1997). BAMG ima znižano vsebnost DNA, vendar obdrži kolagene I, III, IV, elastin, laminine in fibronektin in tako obdrži svojo mehansko moč (Probst in sod. 1997, Dahms in sod. 1998, Bolland in sod. 2007, Farhat in sod. 2008). BAMG ima mehanske in strukturne lastnosti zelo podobne nativnemu tkivu mehurja (Probst in sod. 1997), ne tvori toksinov, je biokompatibilen z urotelijskimi celicami in ima zmanjšano imunogenost (Bolland in sod. 2007, Cheng in sod. 2010).

2.2.3 Urotelij *in vitro*

Presadki so lahko brez celic ali pa že pred implantacijo nasadimo urotelijske celice na njihovo površino. Izkazalo se je, da presadki z nasajenimi celicami bolje uspevajo (Falke in sod. 2000, Atala 2011). Za takšne avtologne rekonstrukcije urinarnega trakta je potrebno uspešno gojiti urotelijske celice *in vitro*. Urotelijske celice morajo biti sposobne tvoriti urotelij, ki je čim bolj podoben nativnemu uroteliju z izraženimi označevalci diferenciranosti in funkcionalnostjo. Številne študije so pokazale uspešno vzpostavitev funkcionalnega in diferenciranega urotelija *in vitro* z visokim TER, nizko permeabilnostjo ter prisotnostjo UPIIIa, dezmosomov, ZO-1 in vseh skladov celic s primernimi CK profili (Southgate in sod. 1994, Kreft in sod. 2002, Cross in sod. 2005, Kreft in sod. 2006, Turner in sod. 2008, Zani in sod. 2009, Kreft in sod. 2010, Kreft in sod. 2012). Izkazalo se je, da urotelijske celice potrebujejo serum in fiziološko koncentracijo Ca^{2+} ionov za stratifikacijo in diferenciacijo (Rubenwolf in sod. 2011, Visnjar in sod. 2012).

2.3 AMNIJSKA MEMBRANA

AM in horionska membrana (HM) sta del placente, izvirata pa iz zigote. HM sestavljajo trofoblasti in mezenhimske celice, kot so fibroblasti, medtem ko je AM večinoma brezcelična in zlahka ločena od HM (Calvin in sod. 2007). AM je sestavljena iz enoskladnega epitelija iz amnijskih epiteljskih celic (AEC) in spodaj ležečega vezivnega tkiva (strome), ki s številnimi kolagenskimi in elastinskimi vlakni daje AM mehansko odpornost (Campbell in sod. 1989). AM določa mehansko moč placente (Oxlund in sod. 1990), a je zaradi elastinskih vlaken tudi elastična (Hieber in sod. 1997). Sestava kolagenskih vlaken določa njeno mehansko moč (Malak in sod. 1993). V bazalni lamini je kolagen IV, v stromi pa večinoma kolageni I in III, kot tudi kolageni V, VI, VII ter proteoglikani, fibronektin, elastin, laminin-1, -2, -4-7, -10 in -11 (Malak in sod. 1993, Fukuda in sod. 1999, Calvin in sod. 2007, Toda in sod. 2007). V bazalni lamini sta tudi integrin- $\alpha\beta 4$ in perlekan (Li in sod. 2006, Hopkinson in sod. 2008). AEC se pritrjajo na bazalno lamino s hemidezmosomi (King 1982, Campbell in sod. 1989). Glavni medcelični stiki so dezmosomi na lateralni plazmalemi, kjer najdemo tudi presledkovne stike (King 1982). Prisotni so tudi TS, ki so sestavljeni iz okludina, ZO-1 ter klavdinov-1, -3, -4 in -7 (Kobayashi in sod. 2009), vendar se TS prekinajo v pozni nosečnosti (Kobayashi in sod. 2010a). Kljub prisotnosti TS je epitelij AM puščajoč epitelij z nizkim TER in visoko permeabilnostjo (Kobayashi in sod. 2010b, Ross 2011). Visoko permeabilnost ima zaradi širokih medceličnih prostorov, ki omogočijo prehod substanc po paracelularni poti (King 1983, Matsubara in sod. 1991, Iwasaki in sod. 2003). AEC vsebujejo tudi AQP-1, -3, -8 in -9 (Wang in sod. 2006, Beall in sod. 2007, Shengbiao in sod. 2007). Poleg velike mehanske moči in visoke permeabilnosti ima AM še mnogo drugih primernih lastnosti za njeno uporabo v tkivnem inženirstvu.

2.3.1 Pomen AM v tkivnem inženirstvu

AM predstavlja velik potencial za regeneracijo tkiv. AM deluje protimikrobno in protivnetno, ima nizko imunogenost, prepreči brazgotinjenje, pospeši epitelizacijo in njene celice so sposobne razvoja v vse tri zarodne plasti, a niso tumorogene (Toda in sod. 2007, Niknejad in sod. 2008, Liu in sod. 2010a). Mnogo raziskav je pokazalo uspešno uporabo AM kot nosilca za celične kulture iz hondrocitov (Krishnamurithy in sod. 2011), melanocitov (Redondo in sod. 2011), epiteljskih celic roženice (Koizumi in sod. 2000b), keratocitov (España in sod. 2003) in urotelijskih celic (Sharifiaghdas in sod. 2007), kot tudi za izdelavo krvnih žil (Lee in sod. 2012) in osteogensko diferenciacijo mezenhimatskih celic (Chen in sod. 2012). Kot nosilec se je AM izkazala tako za gojenje celic *in vitro* kot tudi za transplantacije, ki so potekale brez komplikacij

in z uspešnim izidom (Scaggiante in sod. 1987, Sakuragawa in sod. 1992, Hasegawa in sod. 2004, Samandari in sod. 2004, Redondo in sod. 2011, Arai in sod. 2012).

2.3.1.1 AM spodbuja epitelizacijo

AEC izločajo veliko rastnih dejavnikov, kot so EGF, TGF, KGF, HGF in bFGF, ki lahko spodbujajo epitelizacijo po transplantaciji (Koizumi in sod. 2000c). AM promovira proliferacijo epitelijskih celic (Shao in sod. 2004) kot tudi celjenje ran z inhibicijo proteaz, kot so MMP-II in -IX. (Kim in sod. 2000b). AM vsebuje mnogo drugih proteaznih inhibitorjev, kot so α_2 -antiplazmin, α_2 -makroglobulin, α_1 -antitripsin, α_1 -antikimotripsin in inter- α_1 -tripsin inhibitor (Na in sod. 1999).

2.3.1.2 AM deluje proti bakterijsko

AM je sposobna zavirati rast bakterij in tudi tako pomaga pri celjenju ran (Talmi in sod. 1991). AEC vsebujejo tudi antimikrobne molekule defenzine HBD1-3 in elafin (King in sod. 2007).

2.3.1.3 AM zavira brazgotinjenje

Uporaba AM za pokrivanje živcev (Meng in sod. 2011) in jeter (Sant'Anna in sod. 2011) je zmanjšalo stopnjo brazgotinjenja in sintezo kolagena. Ker AM inhibira signalno pot, v katero je vključen transformirajoči rastni dejavnik- β (TGF- β), prepreči brazgotinjenje med celjenjem ran. AM zniža izražanje TGF β -1-3, TGF receptorjev, α -aktina gladkih mišic, fibronektina in integrina- α_5 , kar vse zavira TGF- β signalizacijo ter sintezo DNA in diferenciacijo miofibroblastov (Tseng in sod. 1999). AM tudi zniža izražanje CD44, integrina- β_1 in FGFR1/flg (angl. *Fibroblast Growth Factor Receptor 1*) in tako TGF- β signalizacijo in proliferacijo fibroblastov (Lee in sod. 2000). Hialuronska kislina (HA) je multifunkcionalni nesulfatirani GAG in je prisoten v visokih koncentracijah v stromi AM. HA se veže na težke verige (HC) inter- α -inhibitorja in tako tvori HC·HA kompleks. HC·HA zavira aktivnost TGF- β_1 promotorja in tako prepreči brazgotinjenje, ima pa tudi protivnetno vlogo (He in sod. 2009).

2.3.1.4 AM deluje protivnetno in ima nizko imunogenost

AM zavira delovanje celic imunskega sistema. Zavira imunske odzive vnetnih mononuklearnih celic periferne krvi (MCPK) (Wolbank in sod. 2007), tako da jih s svojimi visokimi koncentracijami HA veže in ujame, vključno z limfociti (Higa in sod. 2005). HC·HA v stromi povzroči tudi smrt makrofagov (He in sod. 2009). Poleg strome tudi AEC aktivno zavirajo odzivnost limfocitov (Bailo in sod. 2004). AEC zavirajo

kemotaktično aktivnost nevtrofilcov in makrofagov, zmanjšajo proliferacijo in celo inducirajo apoptozo limfocitov T in B. Dodatno izločajo dejavnike, kot je MIF (angl. *Macrophage migration-Inhibitory Factor*), ki zavirajo celice imunskega sistema (Li in sod. 2005). AEC zavirajo izražanje proteinov HLA II na antigen predstavitevni celicah in so vir protivnetnih dejavnikov (Kamiya in sod. 2005). Amnijske mezenhimske celice (AMC) preprečijo diferenciacijo monocitov v dendritske celice in znižajo izražanje HLA-DR ter zavirajo celice T in antigen predstavitevne celice (Magatti in sod. 2009). AMC zavirajo proliferacijo MCPK in tudi zmanjšajo sintezo interferona- γ in interleukina IL-17 (Kang in sod. 2012) kot tudi IL-1 α in IL-1 β ter zvišajo izražanje IL-1RA (angl. *InterLeukin-1 Receptor Antagonist*) (Solomon in sod. 2001). IL-1RA je protivnetni protein, ki ga izražajo amnijske celice skupaj z vsemi štirimi tkivnimi inhibitorji metaloproteaz TIMP in protivnetnim citokinom IL-10 (Hao in sod. 2000). AMC preprečijo sintezo vnetnih citokinov, kot so TNF- α , CXCL10, CXCL9 in CCL5 (Magatti in sod. 2009). AM vsebuje tudi Fas-ligand, ki deluje imunosupresivno (Runic in sod. 1998, Kubo in sod. 2001, Li in sod. 2005).

Nekatere študije so pokazale, da AEC ne izražajo niti antigene razreda II (HLA-DP, -DQ in -DR) na svojih površinah (Sakuragawa in sod. 1995) niti HLA-A, -B, -C ali β_2 mikroglobulinov razreda I (Akle in sod. 1981, Adinolfi in sod. 1982). Ena je pokazala, da samo zelo majhen del AEC izražajo HLA razredov I in II, kar se sklada z zelo majhno možnostjo zavrnitve (Ilancheran in sod. 2007). Druga je pokazala, da AEC izražajo klasične HLA-A, -B in -C (Hammer in sod. 1997). AEC tudi izražajo antigen, ki igra vlogo pri imunotoleranci – neklasični nepolimorfni HLA-G razreda I (Hammer in sod. 1997, Lefebvre in sod. 2000, Kubo in sod. 2001, Szekeres-Bartho 2002) in celo zvišajo izražanje HLA-G drugih celic *in vitro* (Higa in sod. 2006). Nazadnje pa je študija pokazala, da več populacij sestavlja AMC, ki so lahko HLA-DR pozitivne ali negativne. Ta ugotovitev razjasni problematiko prisotnosti HLA-DR pozitivnih celic ter njihove sposobnosti zavirati ali stimulirati imunske celice (Magatti in sod. 2008).

2.3.1.5 AM je pluripotentna

AEC imajo fenotip podoben matičnim celicam (Bailo in sod. 2004). AEC tvorijo sferoidne strukture *in vitro*, ki ohranijo lastnosti matičnih celic in izražajo označevalce, tipične za matične celice, kot so Oct-4 in nanog (Miki in sod. 2005), kot tudi SRY-box 2 in SSEA-4. AEC so klonogene in se lahko diferencirajo v celice vseh treh zarodnih plasti: v kardiomiocite, miocite, osteocite, adipocite, pankreatocite, hepatocite, nevrocite in astrocite *in vitro* (Ilancheran in sod. 2007). Izvorna celična linija izpeljana iz AM je ohranila normalni kariotip neskončno dolgo *in vitro* in izraža značilni označevalec matičnih celic, alkalno fosfatazo (Tamagawa in sod. 2004).

2.3.1.6 AM ni tumorogena in zavira proliferacijo rakavih celic

AEC ne izražajo telomeraz in so netumorogene (Miki in sod. 2005) ter ne tvorijo teratomov po transplantaciji (Ilancheran in sod. 2007). AMC zmanjšajo proliferacijo rakavih celičnih linij tako, da ustavijo celični cikel v G_0/G_1 fazi. Zmanjšajo tudi izražanje ciklinov in od ciklinov odvisnih kinaz, medtem ko povečajo izražanje inhibitorjev od ciklina odvisnih kinaz, kot sta p15 in p21 (Magatti in sod. 2012).

2.3.2 Shranjevanje AM

Obstaja več načinov shranjevanja AM, ki pa vendarle vplivajo na viabilnost njenih celic. Viabilnost celic v mediju pri 37 °C, sobni temperaturi ali 4 °C je največja, a se vseeno zmanjša za do 85 %. Shrambi v glicerolu pri 4 °C sledi takojšnja celična smrt (Hennerbichler in sod. 2007). Ena raziskava je pokazala, da je po zamrzovanju okoli 50 % celic še viabilnih (Kubo in sod. 2001), medtem ko so druge pokazale, da vsakršno zamrzovanje pod 0 °C močno zmanjša celično viabilnost (Kruse in sod. 2000, Hennerbichler in sod. 2007). Da celice ne preživijo zamrzovanja, podpira dejstvo, da ni zavrnitvenih reakcij po transplantacijah. Vendar po zamrzovanju ostane ohranjena osnovna morfologija AM, in sicer z epitelijem in bazalno lamino, ki izraža kolagene IV, VII, laminin-5 in fibronektin (Kruse in sod. 2000, Thomasen in sod. 2011). Shramba AM na -70 °C ne vpliva na njene biomehanske lastnosti (Oxlund in sod. 1990) in tudi ne na njeno permeabilnost (Resch in sod. 2010). Dalj časa zamrznjene AM še vedno izražajo pomembne rastne dejavnike za epitelizacijo (Koizumi in sod. 2000c) in protivnetne proteine IL-1RA, TIMP in IL-10 (Hao in sod. 2000, Thomasen in sod. 2011). Druga raziskava pa pravi, da zamrzovanje amnijskih celic zmanjša njihovo sposobnost zavirati MCPK (Wolbank in sod. 2007).

2.3.3 Različni konstrukti AM

AM je uporaben nosilec za *ex vivo* ekspanzijo celic v tkivnem inženirstvu in se lahko namesti na tri načine: s stromalno stranjo navzgor (sAM), z epitelijsko stranjo navzgor (eAM) in z bazalno lamino, z odstranjenimi epitelijskimi celicami, navzgor (gAM). Topografija različnih nosilcev AM močno vpliva na rast in morfogenezo celic (Hsiao in sod. 2011). Za odstranjevanje epitelijskih celic je uveljavljenih več metod. Slabost uporabe EDTA ali dispaze je, da razgradita tudi bazalno lamino (Hopkinson in sod. 2008). Termolizin pa specifično katalizira hidrolizo peptidnih vezi med hidrofobnimi aminokislinami in učinkovito odstrani epitelijske celice ter ohranja integriteto bazalne lamine in spodaj ležeče strome (Hopkinson in sod. 2008, Liu in sod. 2010b). Uporablja se tudi SDS (angl. *Sodium Dodecyl Sulphate*) s proteaznimi inhibitorji in z nukleazami,

ki temeljito odstrani celice in ohrani matriks. Decelularizacija zmanjša vsebino DNA ne pa mehanske moči ali elastičnosti tkiva. Odstranjevanje celičnih komponent naj bi preprečilo imunski odziv in zavrnitev ob transplantaciji (Wilshaw in sod. 2006). Vendar gAM vsebuje manj proteinov in rastnih dejavnikov kot nativna AM (Koizumi in sod. 2000c). Vseeno je gAM bila uspešna pri gojenju melanocitov (Redondo in sod. 2011) in se je izkazala kot najboljši substrat za rast in diferenciranost epiteljskih celic roženice (Koizumi in sod. 2000a, Koizumi in sod. 2000b, Li in sod. 2006). Nosilca sAM in gAM sta se izkazala za boljše nosilca kot eAM za rast submandibularnih žlezniških eksplantatov (Hsiao in sod. 2011). sAM se je izkazala za najbolj učinkovito za rast dentalnih apikalnih papilarnih celic (Chen in sod. 2012) in je tudi dober nosilec za rast in ohranjanje fenotipa keratocitov (España in sod. 2003).

2.3.4 AM v tkivnem inženirstvu urinarnega trakta

Zaradi vseh koristnih lastnosti se AM uporablja tudi za rekonstrukcije urinarnega trakta. Že leta 1982 so uspešno uporabili humano AM za rekonstrukcijo zajčjega sečnega mehurja. Integriteta sečnega mehurja je bila ohranjena, reepitelizacija je bila uspešna in urotelija je dobro toleriral AM (Norris in sod. 1982). Tudi drugi so uspešno uporabili AM pri rekonstrukcijah urinarnega trakta, kjer se je urotelija regeneriral z reepitelizacijo in ni prišlo do vnetja (Iijima in sod. 2007, Koziak in sod. 2007, Shakeri in sod. 2009). Tudi rast uroteljskih celic na AM *in vitro* se je izkazala za uspešno. Uroteljske celice, gojene na brezcelični AM, so rasle v več skladih in izražale tako dezmosome kot hemidezmosome (Sharifiaghdas in sod. 2007). Tudi druga raziskava je potrdila, da se uroteljske celice uspešno pritrjujejo in rastejo na eAM, sAM in gAM ter dosežejo visoko stopnjo diferenciranosti (Dragin 2010). Nasprotno opozarjajo Sartoneva in sod. (2011), da je proliferativnost uroteljskih celic na AM nizka in da izgubljajo uroteljski fenotip. Po dveh tednih je odmrla večina uroteljskih celic. Tako je primernost AM za gojenje uroteljskih celic še vedno vprašljiva.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 HRANILNI MEDIJ

Hranilni medij je bil prilagojen za gojenje prašičjih urotelijskih celic; in sicer z dodanim 2,5 % fetalnim govejim serumom (FBS), ki naj bi spodbujal proliferacijo in diferenciacijo urotelijskih celic. Medij smo menjali šestkrat na teden.

Preglednica 1: Sestava hranilnega medija za prašičje urotelijske celice.

Sestavine medija	Koncentracije
MCDB 153 (Sigma, M 7403)	50 %
A-DMEM (Gibco, 12491-015)	50 %
Adenin (Sigma, A 2786, 5 g)	15 µg/ml
Inzulin (Sigma, I 1882, 1 mg)	5 µg/ml
Hidrokortizon (Sigma, H 0888, 1 g)	0,5 µg/ml
Fosfoetanolamin (Sigma, P 0503, 1 g)	0,1 mM
Glutamax (Gibco, 35050-038, 100 ml, 200 mM)	4 mM
Streptomycin (KC, Fatol, 1 g)	100 µg/ml
Penicilin (KC, Pliva, 10 ⁶ U)	100 U/ml
FBS (Gibco, 10108-165)	2,5 %

3.2 PRAŠIČJE UROTELIJSKE CELICE

3.2.1 Odmrzovanje in nasajanje celic

Uporabljali smo prašičje urotelijske celice, ki so bile izolirane iz prašičjega sečnega mehurja. Bile so globoko zamrznjene v tekočem dušiku in jih je bilo treba čim hitreje odmrzniti. Epruvete s celicami smo odtajevali 1 minuto (min) v vodni kopeli na 37 °C ter centrifugirali (5 min, 200 g, 23 °C). Nastali pelet celic smo resuspendirali z ustreznim volumnom hranilnega medija in odvzeli 50 µl celične suspenzije, ki smo jo zmešali z 10 µl tripanskega modrila. Tripansko modrilo prodira skozi poškodovano plazmalemo in tako označuje mrtve celice. S hemocitometrom smo prešteli žive in mrtve celice ter izračunali njihovo viabilnost in skupno število. S tem smo lahko nasajali celice s primernimi nasaditvenimi gostotami v gojitvene stekleničke (*Tissue Culture Flasks, TPP*), na sintetične nosilce (*Falcon Cell Culture Insert, BD*) ter na vpete AM. Celične kulture smo gojili v CO₂-inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂ atmosferi in

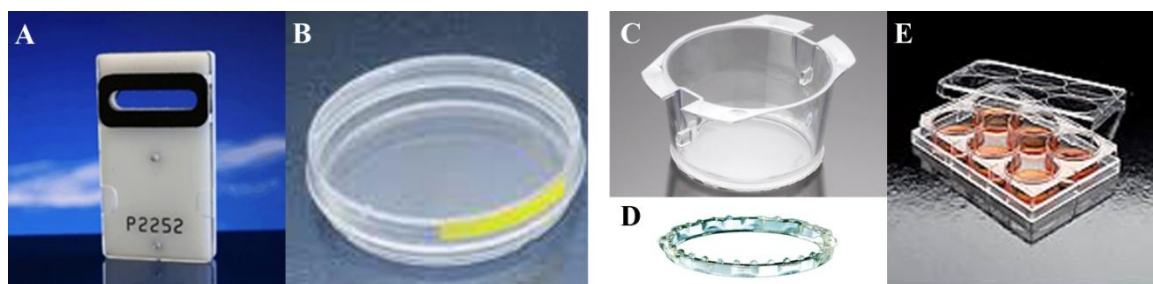
100 % relativni zračni vlažnosti). Rast celic smo spremljali z invertnim mikroskopom *Leica DM IL*. Z menjavanjem hranilnega medija smo celicam dodajali hranilne snovi ter odstranjevali presnovne produkte in mrtve celice.

Ko so se urotelijske celice razmnožile do 70–90 % konfluentnosti, smo jih presadili na nove podlage. Najprej smo celicam odstranili hranilni medij in dodali ustrezní volumen proteolitičnega encima Triple Select (*Gibco*). Pustili smo jih približno 15 min v CO₂-inkubatorju z vmesnim stresanjem. Ko smo z invertnim mikroskopom opazili, da so se celice odlepile in zaokrožile, smo celice sprali s hranilnim medijem in jih centrifugirali (5 min, 200 g, 23 °C). Supernatant smo odstranili, celice resuspendirali v ustreznem volumnu medija in jih prešteli. Urotelijske celice III.–VI. pasaže smo naprej presajali z nasaditvenimi gostotami od $2,6 \cdot 10^4$ c/cm² do $2,2 \cdot 10^5$ c/cm². Vendar za vse nadaljnje meritve transepitelijske upornosti, permeabilnosti in imunofluorescence smo prašičje urotelijske celice III.–VI. pasaže (PuIII–VI) nasadili z nasaditveno gostoto $2 \cdot 10^5$ c/cm² na sintetične nosilce površine 0,9 cm² iz polimera PET (polietilen tereftalat) s porami velikosti 0,4 μm (*Falcon Cell Culture Insert, BD*) ali na AM površine 4,2 cm² ali 1 cm².

3.3. AMNIJSKA MEMBRANA

3.3.1 Pridobitev, shranjevanje, odmrzovanje in vpenjanje AM

AM uporabljene v našem 1. in 2. poskusu so bile vzete dne 15. 7. 2011, v 3. poskusu pa dne 7. 9. 2011. Shranjene so bile v mediju Eagle's z glicerolom (v razmerju 1 : 1) ter zamrznjene pri –80 °C. AM smo najprej pustili na sobni temperaturi, da se odtalijo in jih potem 2 x zaporedno spirali v PBS ter 2 x v hranilnem mediju. Sprane AM smo vpeli na različne nosilce. Za 1. način vpenjanja smo uporabili nastavke, namenjene uporabi v difuzijskih celicah (*Sliders for Snapwell Chambers P2252, Physiological Instruments*). Spodnjo polovico nastavka smo položili v plastično petrijevko (*TPP, Tissue Culture Dishes*) in na njene zobce ob luknji nataknili AM, ki smo jo nato trdno pripeli še z zgornjo polovico nastavka. Sestavljen nastavek smo zalili s hranilnim medijem (Slika 1A–B). Za 2. način vpenjanja smo uporabili nosilce s PET membrano (*Falcon Cell Culture Insert, BD*), a vendar smo le-tem PET membrano izrezali s skalpelom in jo nadomestili z AM, ki smo jo vpeli na nosilec z obročem (*Scaffdex, Tempere, Finland*) ter dodatno fiksirali s sterilno elastično gumico (Slika 1C–D). Nosilce z AM, vpeto z obročkom, smo postavili v plastične večprekatne petrijevke (*Falcon Tissue Culture Plate, BD*) in dodali hranilni medij v petrijevke in v nosilce (Slika 1E).



Slika 1: Oprema za gojenje celic. **A)** Nastavek za vpenjanje AM. **B)** Petrijevka, v katero smo položili nastavek. **C)** Nosilec s PET membrano. **D)** Obroček za vpenjanje AM. **E)** Šestprekatna petrijevka.

3.3.2 Priprava različnih konstruktov

Pripravili smo tri različne konstrukte AM. Pri vpenjanju AM smo bili pozorni na to, kako je obrnjena. Za 1. model konstrukta smo položili AM z epitelijem obrnjenim navzgor (eAM), za 2. pa s stromo obrnjeno navzgor (sAM). Za 3. konstrukt smo pripravili »golo« AM. AM smo spet položili z epitelijem obrnjenim navzgor, vendar smo dodali razredčen (1 : 50 s PBS) termolizin (*izoliran iz Bacillus thermoproteolyticus rokko, Sigma*). Termolizin (TL) je proteolitičen encim in omogoča odstranitev AEC. Konstrukte z dodanim TL smo pustili v CO₂-inkubatorju 22 min. Nato smo konstrukte sprali s PBS in pustili na stresalniku 15 min, da bi omogočili odlučanje vseh AEC. Zatem smo zamenjali PBS in ponovno pustili na stresalniku 15 min. Po stresanju smo PBS zamenjali s svežim hranilnim medijem. Tako smo dobili 3. konstrukt (gAM), na katerega smo tako kot na sAM in eAM lahko nasadili urotelijske celice z nasaditveno gostoto $2 \cdot 10^5$ c/cm². Rast celic smo spremljali z invertnim mikroskopom *Leica DM IL*.

3.4 MERJENJE TER

Transepitelijsko upornost smo merili z voltmetrom (*EVOM, WPI*) in elektrodami (*STX2, WPI*). V večpreklatnih petrijevkah smo merili upornost konstruktov AM, vpete z obročki, z nasajenimi urotelijskimi celicami. Pred merjenjem smo najprej sterilizirali elektrodi 5 min v 70 % etanolu (EtOH) in sprali v hranilnem mediju. Pri merjenju se je daljša elektroda dotikala dna petrijevke in tako je bila krajša elektroda postavljena tik nad membrano v nosilcu. Pri tem sta bili obe elektrodi pravokotni na petrijevko. Najprej smo izmerili upornost samih PET nosilcev oziroma same AM brez celic, ker imajo tudi te membrane ter hranilni medij določeno upornost. Po nasaditvi celic na različne nosilce AM in PET smo TER vzpostavljenih konstruktov spremljali celoten čas gojenja.

3.5 MERJENJE PERMEABILNOSTI

Dekstran je polimer anhidroglukoze s hidrodinamskim polmerom ~1,4 nm. Za potrebe sledenja dekstrana s fluorescenco so njegove hidroksilne skupine konjugirane z barvili, kot je naprimer fluorescein izotiocianat (FITC). Konjugat dekstran-FITC ni toksičen in je biološko inerten in tako je pogosto uporabljen za analize celične permeabilnosti (Vercelli in sod. 2000).

3.5.1 Analiza permeabilnosti urotelija na PET nosilcih

Prepustnost vzpostavljenih konstruktov urotelija na 0,9 cm² PET nosilcih v 12-prekatinih petrijevkah smo merili s preходом dekstrana (*FITC-dextran average mol wt 3-5,000, FD4, Sigma*). Po 23 dneh smo PuV 3 x sprali s pufrom (500 ml HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution, Gibco*) + 5 ml 1M HEPES (*Gibco*)) in jim dodali dekstran [1 mg/ml] v apikalno kamrico. Med poskusom so bili konstrukti v CO₂-inkubatorju. Po 30, 60, 90, 120 in 180 min inkubacije z dekstranom, smo odvzeli 100 µl vzorce iz bazalnih akceptorskih kamric. Vsakič smo dodali 100 µl pufru nazaj v bazalne kamrice. Iz apikalnih donorskih kamric smo odvzeli vzorce na začetku in na koncu tretiranja. Vzorce smo prenesli v mikrotitrsko ploščico (*Greiner Bio-One, 384 well plates*) in jih analizirali s čitalnikom *Infinite M1000 PRO (Tecan)*.

3.5.2 Analiza permeabilnosti urotelija na nosilcih iz AM

Po 32 dneh gojenja PuIV in 14 dneh gojenja PuVI na nosilcih iz AM, vpetih v nastavke, smo določili permeabilnost dekstrana (*FITC-dextran average mol wt 3-5,000, FD4, Sigma*) skozi konstrukte z »Easy mount« difuzijskimi celicami. Aparatura (*EM-CSYS-6 Ussing Chamber Systems, Physiological Instruments*) je sestavljena iz ogrevanega vodnega plašča, kamor so vpete difuzijske celice (*P2250 Ussing Chamber, Physiological Instruments*), ki je priključen na termostat. V difuzijske celice smo vpeli nastavke (*Sliders for Snapwell Chambers P2252, Physiological Instruments*) z vpetimi konstrukti. Cevke omogočajo dotok karbogenea (95 % O₂/5 % CO₂) in odprtine omogočijo vpetje elektrod, ki so priklopljene na vmesnik za pretvorbo signala v digitalno obliko. Tako smo zajeli podatke s programom *Clamp (Version 2,15)*. Elektrode (*P2020-S, Physiological Instruments*) so bile napolnjene s 3–4 % raztopino agarja v 3M KCl in shranjene v raztopini 3M KCl. Uporabili smo pufersko raztopino HBSS (*Gibco*). Pred merjenjem smo opravili validacijo elektrod. Elektrode za merjenje napetosti in tokovne elektrode smo vstavili v difuzijske celice in spremljali napetost elektrod v programu *Clamp*, ki mora biti ~0 mV. Upornost tekočine je bila ustrezna (med 20 in 60 Ωcm²) kot tudi asimetrija napetostnih elektrod (< 10 mV) in nato smo s

programom izničili te vrednosti. Prižgali smo termostata, ki uravnava delovno temperaturo okoli 37 °C. Odprli smo dovod karbogena, ki pufer zmerno prepiljuje. Vsako celico smo napolnili z 2,5 ml HBSS (*Gibco*). Zgornjo stran naših konstruktov smo obrnili na levo stran difuzijske celice in tako je bila leva stran donorska stran. Iz vseh celic smo iz donorske strani odstranili HBSS ter vrnili 2,5 ml HBSS z dekstranom [1,15 mg/ml]. Odvzeli smo ničelni vzorec z donorske strani in začeli s poskusom. Na 30, 60, 90, 120 in 180 min smo odvzeli vzorce (po 150 µl) iz akceptorske strani. Po vsakem odvzemu iz akceptorske strani smo vrnili enako količino HBSS (150 µl). Po 180 min smo vzorčili tudi iz donorske strani. Vse vzorce smo prenesli v mikrotitrsko ploščico (*Greiner Bio-One, 384 well plates*), jo vstavili v čitalnik *Infinite M1000 PRO* (*Tecan*) in tako dobili vrednosti fluorescence dekstrana v posameznih vzorcih izražene v RFU (*Relative Fluorescence Units*).

3.5.3 Izračun permeabilnostnega koeficienta

Najprej smo preko serijskih redčenj dekstrana in tako znanih koncentracij vzorcev dobili umeritveno krivuljo. Iz nje smo lahko izpeljali prave koncentracije dekstrana v vzorcih poskusa. Iz koncentracij [mg/ml] smo izračunali število molov v volumnu in tako naraščajočo množino dekstrana na akceptorski strani. Tako smo izračunali permeabilnostni koeficient (P_{app}) po enačbi 1:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_o} \quad \dots(1)$$

Kjer je P_{app} permeabilnostni koeficient [cm/s], dQ/dt [mmol/s] je hitrost pojava dekstrana v akceptorski celici, A [1 cm²] je površina tkiva in C_o [mg/ml] je začetna donorska koncentracija.

3.6 IMUNOFLUORESCENČNO OZNAČEVANJE

Imunofluorescenčno smo označili konstrukte, vpete z obročki in v nastavkih, in sicer PuIV po 2 ali 5 tednih in PuIII po 3 tednih gojenja.

3.6.1 Označevanje diferenciacijskih označevalcev urotelija

Za imunooznačevanje smo uporabili naslednja protitelesa: mišje monoklonsko protitelo proti **p63** (*4A4*, *Santa Cruz*), mišje monoklonsko protitelo proti **CK20** (*Ks20.8*, *Dako*), zajčje poliklonsko protitelo proti **klavdinu-8** (*Invitrogen*), zajčje poliklonsko protitelo proti **UPIIIa** (*H-180*, *Santa Cruz*) in zajčje poliklonsko protitelo proti uroplakinom v **AUM** (angl. *Asymmetric Unit Membrane*; darilo prof. dr. T – T. Sun).

Glede na uporabljena protitelesa smo konstrukte fiksirali v različnih fiksativih pri sobni temperaturi. Za označevanje s protitelesi proti AUM, CK20 in klavdinu-8 smo konstrukte 20 min fiksirali v predhodno ohlajenem 100 % EtOH. Za označevanje s protitelesi proti UPIIIa in p63 pa smo jih 5 min fiksirali v metanolu. Nato smo fiksirane konstrukte spirali v PBS 10 min in nato 30 min inkubirali v blokirnem pufu (1 % BSA v PBS). Sledila je inkubacija z razredčenimi primarnimi protitelesi: CK20 (1 : 20), UPIIIa (1 : 50), p63 (1 : 100), klavdin-8 (1 : 400) in AUM (1 : 2000) čez noč pri 4 °C. Naslednji dan smo spirali 20 min v PBS. Nato smo dodali kozja sekundarna protitelesa proti zajčjim ali mišjim antigenom, konjugirana z Alexa Flour 555 ali 488 (*Invitrogen*), razredčena 1 : 200. V sekundarnih protitelesih smo inkubirali v temi 90 min in nato spirali 20 min v PBS. Nazadnje smo membrane prenesli na objektna stekelca, dodali kapljico raztopine proti bledenju fluorescence *Vectashield* in pokrili s krovnikom.

3.6.2 Označevanje kromatina z DAPI

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) je fluorescenčno barvilo, ki se veže na kromatin in obarva jedra modro. Kapljico *Vectashield* z DAPI smo dodali na pripravljene membrane, preden smo jih pokrili s krovnikom.

3.7 PRIPRAVA HISTOLOŠKIH PARAFINSKIH REZIN

3.7.1 Priprava parafinskih rezin konstruktov za imunohistokemijo

Konstrukte urotelijskih celic na AM smo fiksirali za pripravo parafinskih rezin. Konstrukte smo fiksirali v fiksativu Bouin ali 4 % formalinu čez noč pri 4 °C. Naslednji dan smo jih spirali v PBS 90 min. Nato smo vzorce dehidrirali v alkoholih naraščajočih

koncentracij: po 15 min v 30 % EtOH, 50 % EtOH, 70 % EtOH in 90 % EtOH ter 30 min v 100 % EtOH. Sledilo je bistrenje s ksilolom: po 15 min v mešanici ksilol: 100 % EtOH (3 : 7) in ksilol: 100 % EtOH (1 : 1) in še 20 min v 100 % ksilolu. Dehidrirane vzorce smo dali v tekoč parafin čez noč na 60 °C in naslednji dan predstavili v svež tekoč parafin ter spet pustili čez noč na 60 °C. Naslednji dan smo vzorce vklopili v parafinske bloke. Pripravljene parafinske bloke smo narezali z mikrotomom (*Leica RM 2135*) na 5 µm debele rezine in jih pritrdili na objektna stekelca.

3.7.2 Priprava parafinskih rezin AM za histologijo

AM smo fiksirali v 10 % formalinu (1 ml formalin + 65 g Na₂HPO₄ + 40 g NaH₂PO₄ x 2H₂O + 9 ml dH₂O) čez noč pri 4 °C. Naslednji dan smo jih spirali v PBS 90 min. Nato smo vzorce dehidrirali v alkoholih naraščajočih koncentracij: 20 min v 70 % EtOH, 2 x po 20 min v 96 % EtOH in 3 x po 20 min v 100 % EtOH. Sledilo je bistrenje s ksilolom: 2 x po 20 min v 100 % ksilolu. Dehidrirane vzorce smo dali v tekoč parafin za 90 min na 60 °C in nato predstavili v svež tekoč parafin in spet pustili 90 min na 60 °C. Naslednji dan smo jih vklopili v parafinske bloke. Pripravljene parafinske bloke smo narezali z mikrotomom (*Leica RM 2135*) na 5 µm debele rezine in jih pritrdili na objektna stekelca.

3.8 HISTOLOŠKO IN HISTOKEMIJSKO BARVANJE AM

Za vsa histološka barvanja smo najprej parafinske rezine deparafinizirali in hidrirali. Rezine smo po vrsti potopili 2 x po 5 min v ksilol, 2 min v 100 % EtOH ter po 1 min v 96 % EtOH, 70 % EtOH in dH₂O. Tako hidrirane rezine smo nato obarvali. Po barvanju smo preparate dehidrirali: v 70 % EtOH 1 min, 96 % EtOH 1 min, 100 % EtOH 2 min in nazadnje zbistrili v ksilolu 2 x po 5 min. Vsem preparatom smo dodali kapljico vklopnega medija *Entellan new* (*Merck*) in jih pokrili s krovnikom.

3.8.1 Barvanje hematoksilin – eozin

Hidrirane rezine smo barvali v hematoksilinu (*Weigert's iron hematoxylin solution*, *Sigma*) 45 sekund (s), nato sprali v dH₂O ter potopili v eozin (*Merck*) 2 min. Potem smo jih spet sprali v dH₂O in dehidrirali.

3.8.2 Barvanje alciansko modrilo

Hidrirane rezine smo najprej barvali z barvilom za jedra (1 g Nuclear Fast Red (*Sigma*) + 9,7 g $\text{Al}_2(\text{SO}_4)18\text{H}_2\text{O}$) 15 min in sprali z dH_2O . Nato smo jih barvali z alcianskim modrilom pri pH 2,5 (2 g Alcian Blue (*Sigma*) + 100 ml 0,5 % CH_3COOH) 15 min, sprali z dH_2O in dehidrirali.

3.8.3 Barvanje PAS

Za pripravo Schiffovega reagenta smo 100 ml dH_2O zavreli in ohladili na 70 °C. Dodali smo 0,5 g bazičnega fuksina in ponovno zavreli in ohladili do 50 °C. Nato smo dodali 1 ml 36 % HCl, 1 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ in žlico aktivnega oglja, premešali in pustili pri 4 °C čez noč. Naslednji dan smo filtrirali raztopino. Hidrirane rezine smo dali v 0,5 % periodovo kislino H_5IO_6 za 5 min. Nato smo jih sprali v dH_2O , dali v Schiffov reagent za 30 min pri 4 °C in spet sprali. Barvali smo v hematoksilinu za 20 s, sprali v dH_2O in dehidrirali.

3.8.4 Barvanje Calleja

Hidrirane rezine smo najprej barvali v barvilu orcein (1 g orceina + 100 ml 100 % EtOH + 0,5 ml konc. HCl + 25 ml dH_2O) 12 min ter sprali z H_2O . Nato smo rezine barvali s hematoksilinom 3 min in sprali s H_2O . Nazadnje smo jih barvali v raztopini karmina v pikrinski kislini (1 g indiga carmin + 200 ml pikrinske kisline) 15 min ter dehidrirali.

3.8.5 Barvanje Verhoeff van Gieson

Za pripravo barvila Verhoeff smo raztopili 0,5 g barvila hematoksilin (*Sigma C:I:75290*) v 50 ml 100 % EtOH. Dodali smo 20 ml Lugolove raztopine (2 % I_2 + 4 % KI) ter 20 ml FeCl_3 in premešali. Za pripravo raztopine Van Gieson smo združili 7 ml 1 % kislega fuksina in 93 ml pikrinske kisline ter filtrirali. Hidrirane rezine smo barvali 20 min z barvilom Verhoeff, nato sprali z dH_2O . Zatem smo rezinam dodali 0,2 % FeCl_3 za 5 s, sprali z dH_2O , potopili v 70 % EtOH 1 min in sprali z dH_2O . Nazadnje smo rezine barvali z barvilom Van Gieson 5 min ter sprali z dH_2O in dehidrirali.

3.8.6 Barvanje Weigert van Gieson

Hidrirane rezine smo dali v raztopino Weigert A in Weigert B (*Reagena*) (1 : 1), pustili 20 min in nato sprali z dH_2O . Potem smo rezinam dodali 1 % HCl v 70 % EtOH za 5 s in nato sprali z dH_2O . Nazadnje smo rezine inkubirali v raztopini Van Gieson (*Reagena*) 2 min, ponovno sprali z dH_2O in dehidrirali.

3.9 IMUNOHISTOKEMIJSKO OZNAČEVANJE UROTELIJA NA AM

Za imunooznačevanje smo uporabili naslednja protitelesa: mišje monoklonsko protitelo proti **p63** (4A4, *Santa Cruz*), mišje monoklonsko protitelo proti **CK20** (*Ks20.8, Dako*), mišje monoklonsko protitelo proti **CK7** (*OV-TL12/30, Dako*), zajčje poliklonsko protitelo proti **UPIIIa** (*H-180, Santa Cruz*) in zajčje poliklonsko protitelo proti uroplakinom v **AUM** (*darilo prof. dr. T. – T. Sun*).

Pripravljene parafinske rezine smo najprej deparafinizirali v ksilolu 2 x po 5 min, po 5 min v 100 % EtOH, 90 % EtOH in 70 % EtOH ter 2 x po 5 min v dH₂O. Nato smo jih inkubirali v 3 % H₂O₂ metanolu 10 min in spirali v PBS 3x po 5 min in še v dH₂O 2 min. Za odmaskiranje antigenov (angl. *antigen retrieval*) smo parafinske rezine ali segrevali v citratnem pufri v mikrovalovni pri 600W 3 x po 5 min ali jim dodali raztopino tripsina (3 tabletki (*Sigma*) v 3ml dH₂O) pri 37 °C 10 min. Nato smo jih ohladili in spirali v PBS 3 x po 5 min ter blokirali v 5 % BSA v PBS 60 min. Potem smo dodali primarno protitelo proti p63 (1 : 100), CK20 (1 : 20), CK7 (1 : 20), UPIIIa (1 : 50) ali AUM (1 : 2000) in inkubirali čez noč pri 4 °C. Naslednji dan smo rezine sprali 3 x po 5 min. Nato smo mišjim protitelesom dodali biotinizirana poliklonska zajčja sekundarna protitelesa proti mišjim antigenom (*Dako*) in zajčjim protitelesom dodali biotinizirana prašičja sekundarna protitelesa proti zajčjim antigenom (*Dako*) (razredčena 1 : 100) in inkubirali 60 min. Potem smo rezine sprali 6 x po 5 min v PBS. Nato smo dodali ABC kompleks (1500µl 0,05M TRIS HCl pH 7,6 + 15 µl A (*Vectastain*) + 15 µl B (*Vectastain*)), inkubirali 30 min in sprali 3 x po 5 min v PBS. Dodali smo raztopino DAB (3 tabletki DAB (*SigmaFast*) + 3 tabletki sečnine (*SigmaFast*) v 3 ml deionizirane H₂O) za 10 min in sprali v dH₂O 3 x po 1 min. Potem smo rezine barvali s hematoksilinom 25 s, sprali z dH₂O, potopili v litijev karbonat 30 s in sprali z dH₂O. Nazadnje smo rezine dehidrirali v 70 % EtOH 2 min, 90 % EtOH 5 min, 100 % EtOH 5 min in 2x v ksilolu po 5 min. Sledilo je vklopjanje v medij *Entellan new* (*Merck*) in pokrivanje s krovniki.

Vse pripravljene preparate rezin smo pregledali in poslikali s svetlobnim mikroskopom *Nikon Eclipse TE300*.

3.10 IMUNOFLUORESCENČNO OZNAČEVANJE AKVAPORINOV

Za imunooznačevanje smo uporabili naslednja protitelesa: kozje poliklonsko protitelo proti **AQP-2** (C-17, *Santa Cruz*), kozje poliklonsko protitelo proti **AQP-3** (C-18, *Santa Cruz*) in zajčje poliklonsko protitelo proti **AQP-9** (H-40, *Santa Cruz*).

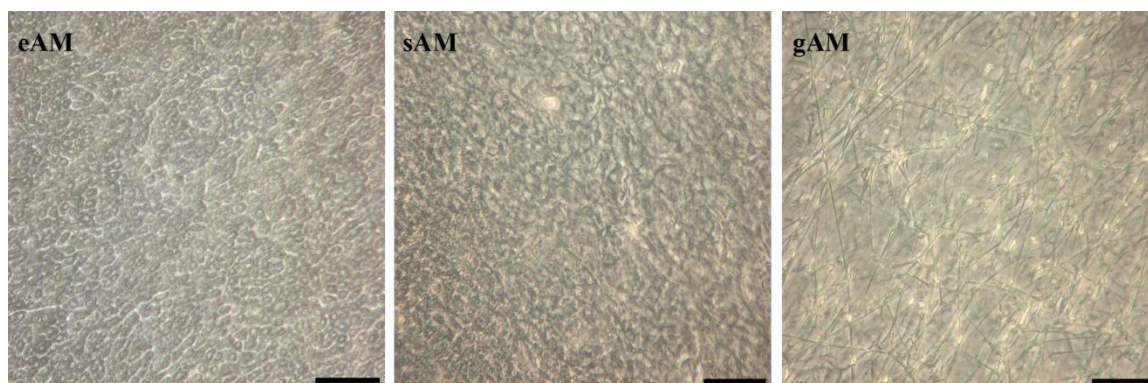
Parafinske rezine smo deparafinizirali v ksilolu 2 x po 5 min, po 5 min v 100 % EtOH, 90 % EtOH in 70 % EtOH ter 2 x po 5 min v dH₂O. Nato smo rezine segrevali v citratnem pufri (pH 6) v mikrovalovni pečici pri 600W 3 x po 5 min. Potem smo jih sprali v dH₂O, ohladili in blokirali v 5 % BSA v PBS 45 min. Sledila je inkubacija z razredčenimi primarnimi protitelesi proti AQP-2 (1 : 50), AQP-3 (1 : 200) in AQP-9 (1 : 50) čez noč pri 4 °C. Naslednji dan smo jih sprali v PBS 4 x v 20 min. Sledila je 60-minutna inkubacija s kozjimi sekundarnimi protitelesi proti zajčjim antigenom ali zajčjimi sekundarnimi protitelesi proti kozjim antigenom, konjugiranimi z Alexa Flour 555 ali 488 (*Invitrogen*), razredčenimi 1 : 200. Sprali smo rezine s PBS 6 x v 30 min in jim nato dodali kapljico *Vectashield* in pokrili s krovnikom.

Vse preparate za imunofluorescenco smo pregledali in poslikali s fluorescenčnim mikroskopom *Nikon Eclipse TE300* ali *Axiolmager.ZI* s kamero in dodatkom *ApoTome* (*Zeiss*), s katerim lahko slikamo optične rezine s pomočjo programa *AxioVision Rel. 4.8*.

4 REZULTATI

4.1 TOPOGRAFIJA NOSILCEV eAM, sAM in gAM

Vzpostavili smo tri nosilce iz AM (Slika 2). Na eAM, z navzgor obrnjenim epitelijem, so se videle AEC z jedri, kar dokazuje, da se morfološka integriteta AM ohrani tudi po postopkih shranjevanja in po vpenjanju v nastavke ali z obročki. Pri sAM, z gor obrnjeno stromo, so se zaradi tankosti AM videli obrisi AEC pod stromo. gAM je bila brez epitelijskih celic, kar kaže, da je bilo tretiranje s TL uspešno. Na membrani ni bilo celic, vendar je bila integriteta ZCM ohranjena in so bila vidna kolagenska vlakna.

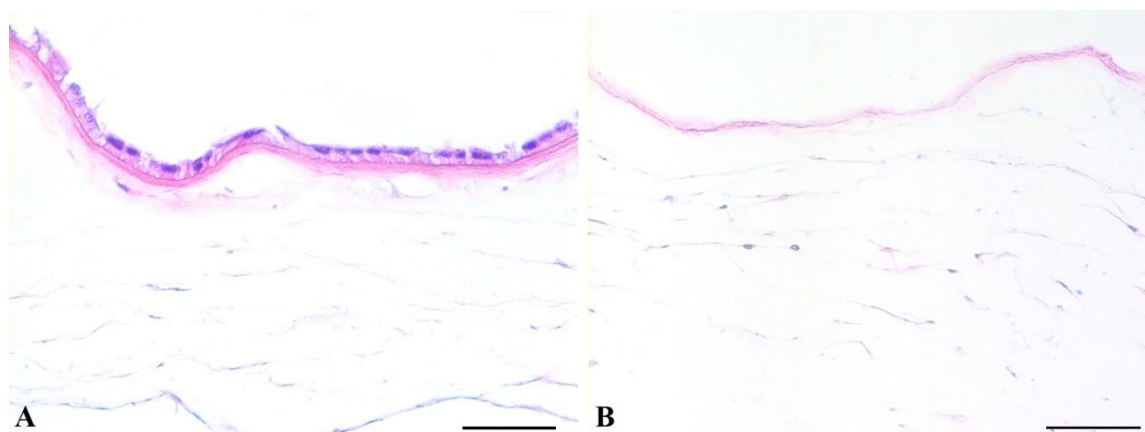


Slika 2: Topografija nosilcev iz AM. Na eAM so vidne AEC, na sAM vezivno tkivo in na gAM kolagenska vlakna. Merilce: 100 μ m.

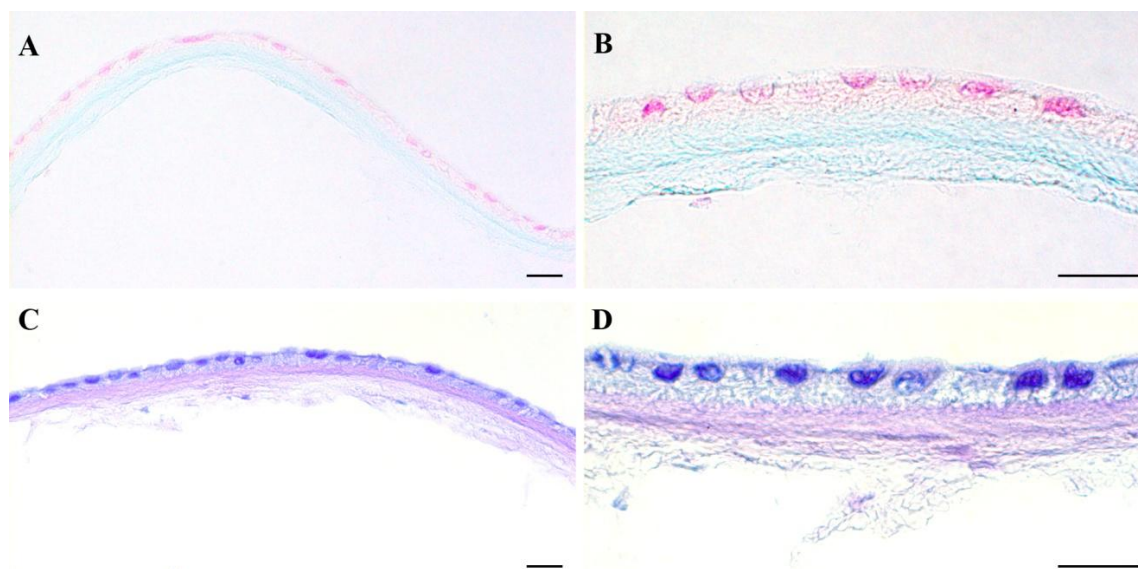
4.2 HISTOLOGIJA IN HISTOKEMIJA NOSILCEV IZ AM

Ocenili smo vpliv zamrzovanja in 15-mesečnega shranjevanja pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ na histološko zgradbo AM. Izpostavili smo AM enakim razmeram, kot so potrebne za rast urotelijskih celic *in vitro*. Nosilce iz AM smo 28 dni gojili v CO_2 -inkubatorju v hranilnem mediju, ki smo ga vsak drugi dan menjali. Po 28 dneh smo s histološkim barvanjem HE in z različnimi histokemijskimi barvanji ovrednotili zgradbo in sestavo AM.

Z barvanjem HE smo obarvali jedra temno vijolično ter citoplazmo in ZCM rožnato. Barvilo hematoksilin obarva nukleinske kisline temno vijolično in eozin nespecifično obarva proteine rožnato (Fischer in sod. 2008). Barvanje je pokazalo, da je AM ohranila svojo integriteto z enoskladnim epitelijem, bazalno lamino in stromo. Pri gAM je tretiranje s TL učinkovito odstranilo AEC, vendar ohranilo bazalno lamino in stromo (Slika 3).



Slika 3: AM nosilci barvani s hematoksilinom-eozinom. **A)** Intaktna AM z AEC in bazalno lamino. **B)** AM je po tretiranju s TL brez AEC. Merilce: $50\text{ }\mu\text{m}$.

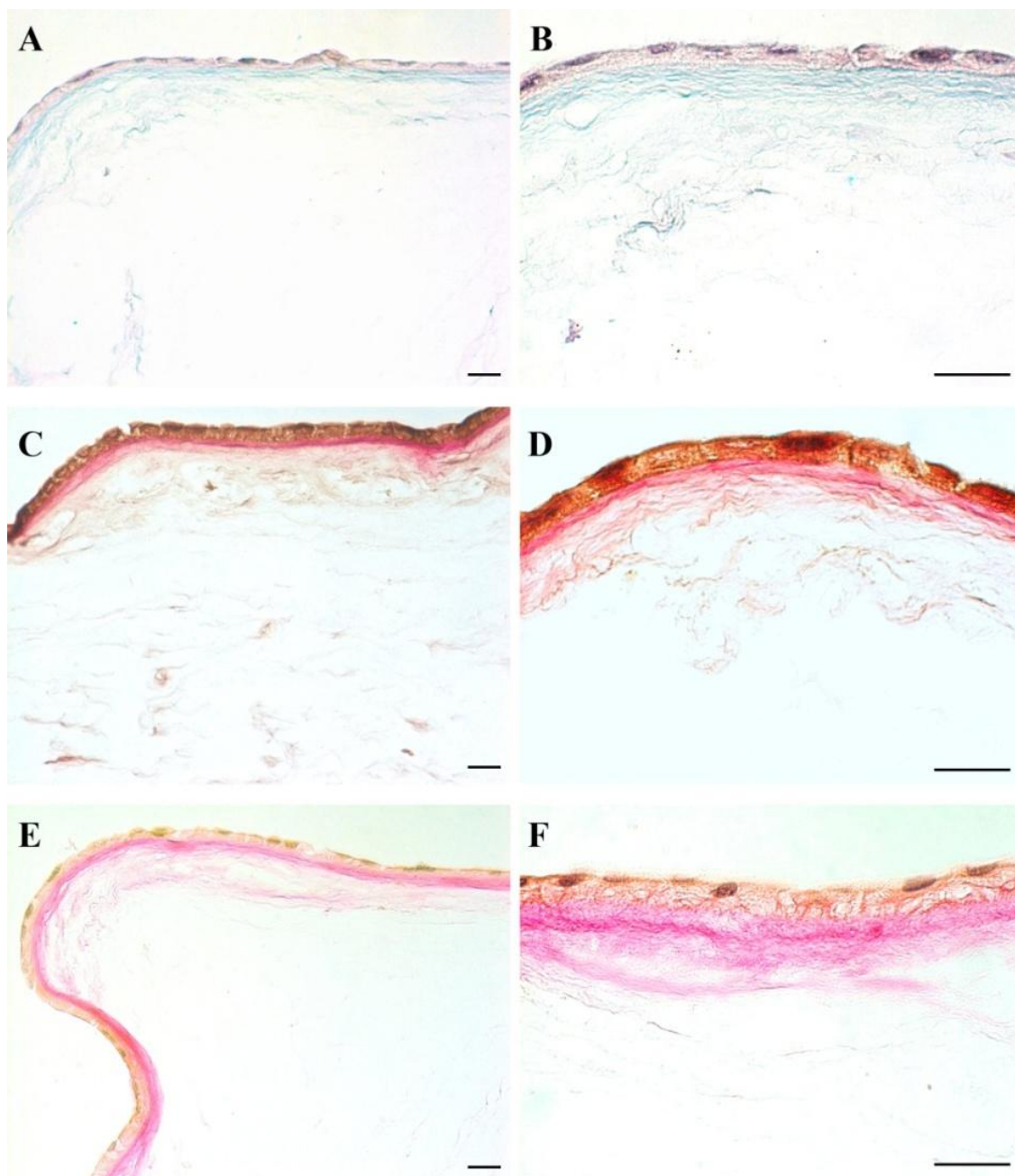


Slika 4: Histokemijsko barvanje AM z alcianskim modrilom in barvanjem PAS. **A–B)** AM barvana z alcianskim modrilom: jedra so obarvana rdeče, citoplazma rožnato in kisli proteoglikani modro. **C–D)** AM barvana s PAS: jedra so obarvana vijolično in nevtralni proteoglikani rožnato. Merilce: 20 μm .

Alciansko modrilo je polivalentno bazično kationsko barvilo, ki pri pH 2,5 obarva karboksilirane ali sulfatirane kisle GAG, vključno s hialuronsko kislino in mezenhimske mucine modro. Barvilo *Nuclear fast stain* obarva jedra rdeče in citoplazmo rožnato (Slika 4A–B). Modro obarvana stroma kaže prisotnost kislih proteoglikanov, ki so ključni za interakcije med celicami in matriksom, celično proliferacijo in adhezijo, pritrjevanju rastnih dejavnikov, aktivaciji kemokinov in citokinov ter imajo vlogo pri regulaciji permeabilnosti, vnetja, celjenju ran in mehansko funkcijo, ki ohranja zgradbo tkiv (Yung in sod. 2007). Sulfatirani polisaharidi so zelo pogosti v vezivnih tkivih in močno vežejo vodo (Mourao 1991). Z barvanjem PAS smo tudi dokazali prisotnost molekul vezivnih tkiv in bazalne lamine, predvsem nevtralnih proteoglikanov, ki jih je periodova kislina skupaj s Schiffovim reagentom obarvala rožnato (Slika 4C–D).

Z barvanjem Calleja smo dokazali prisotnost kolagenskih vlaken v stromi AM, Kolagenska vlakna so se obarvala modro zaradi karmina v pikrinski kislini (Slika 5A–B). Z barvanjem Verhoeff van Gieson smo tudi dokazali prisotnost kolagenov pod epitelijem, ki so se obarvali rdeče zaradi fuksina (Slika 5C–D). Z barvanjem Weigert van Gieson smo tudi s fuksinom dokazali prisotnost kolagena v vezivnem tkivu, ki se je rdeče obarval pod rumeno-rjavim epitelijem, obarvanim s pikrinsko kislino (Slika 5E–F). Kolagenov je v AM veliko in so pomembni za mehansko moč. Elastinskih vlaken nismo dokazali z metodo barvanja Calleja, kjer naj bi kislina orcein obarvala elastinska

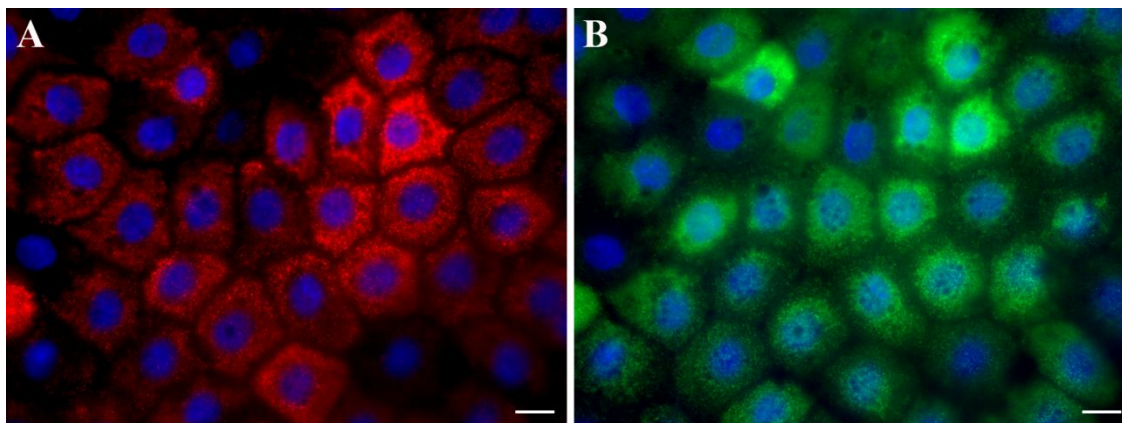
vlakna rdeče. Vendar z metodo barvanja Verhoeff van Gieson naj bi hematoksilin skupaj s FeCl_3 in Lugolovo raztopino obarval elastinska vlakna in jedra črno. Jedra so se namesto črno obarvala rjavo. Tudi v stromi so bila rjava vlakna, za katera predvidevamo, da so elastinska, saj so elastini prisotni v AM (Hieber in sod. 1997, Calvin in sod. 2007).



Slika 5: Histokemijska barvanja AM. **A–B)** Barvanje Calleja: jedra so rjava in kolagenska vlakna modra; **C–D)** barvanje Verhoeff van Gieson: jedra so rjava, kolagenska vlakna rdeča in elastinska vlakna rjava; **E–F)** barvanje Weigert van Gieson: jedra so rjava, citoplazma rumena in kolagenska vlakna rdeča. Merilce: 20 μm .

4.3 IMUNOFLUORESCENCA AM

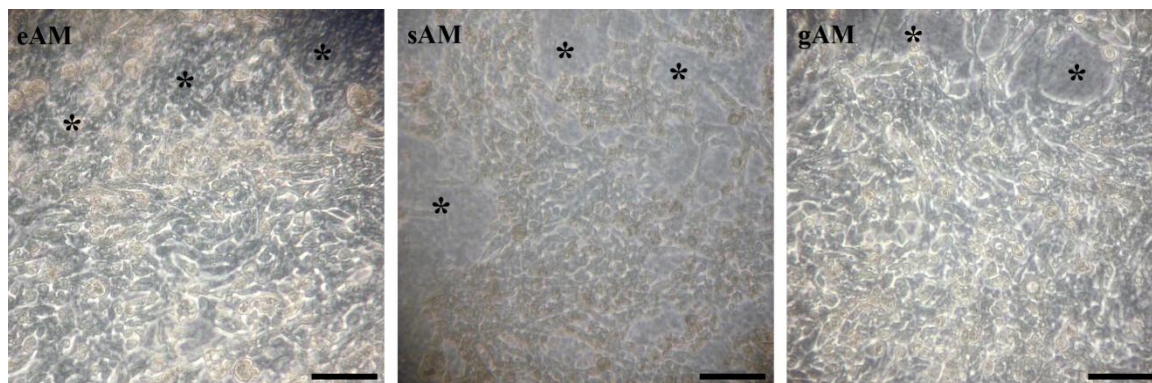
Po 14 dneh v hranilnem mediju smo analizirali permeabilnost vzpostavljenih nosilcev iz AM, vpetih v nastavke. Spremljali smo prehod dekstrana skozi AM, ki smo jo nato še imunofluorescenčno označili. Dekstran je prehajal skozi AEC in jih tudi obarval zeleno. S protitelesi proti klavdinu-8 smo označili AM. Kot smo pričakovali, AM ni tesen epitelij in tako ne vsebuje klavdina-8 med AEC (Slika 6B). Tesni stiki so prekinjeni in med njimi so široki medcelični prostori, ki povzročajo visoko permeabilnost. Imunofluorescenčno smo dokazali prisotnost CK20 v citoplazmi AEC (slika 6A). AEC so poligonalne celice velikosti $\sim 20 \mu\text{m}$. Epitelij je bil dobro ohranjen tudi po zamrzovanju, shrambi, vpenjanju in poskusu permeabilnosti.



Slika 6: Imunofluorescenca AM. **A)** Prisotnost CK20 (rdeče) v citoplazmi AEC. **B)** Prisotnost dekstrana (zeleno) v AEC. Med celicami so široki medcelični prostori brez klavdina-8. Merilce: $10 \mu\text{m}$.

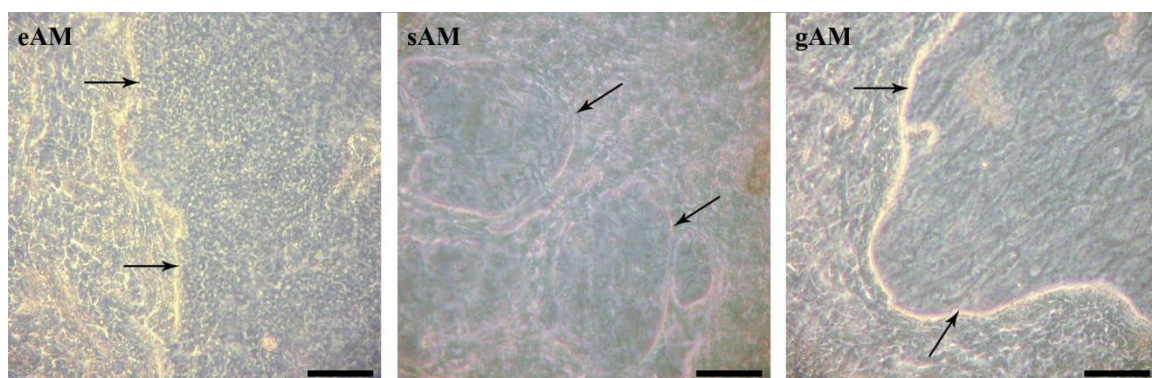
4.4 RAST PRAŠIČJIH UROTELIJSKIH CELIC NA NOSILCIH IZ AM

Dva dni po nasaditvi PuVI z gostoto $2 \cdot 10^5$ c/cm² na AM, vpete z obročki, so se urotelijske celice razraščale po podlagi AM. Količina prerasle podlage je bila približno enaka na eAM, sAM in gAM (Slika 7).



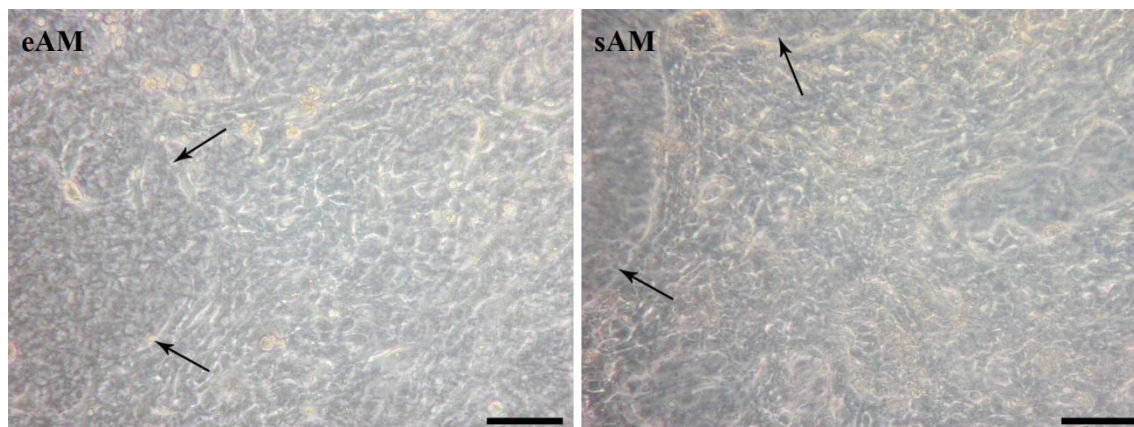
Slika 7: Kulture prašičjih urotelijskih celic 2 dni po nasaditvi na različne nosilce iz AM. Celice še niso dosegle konfluentnosti, vidijo se predeli AM, kjer se celice še niso razrasle (*). Merilce: 100 μ m.

Osem dni po nasaditvi PuIV z gostoto $2 \cdot 10^5$ c/cm² na AM, vpete z obročki, so se celice še vedno razraščale po podlagi. Popolne konfluentnosti niso dosegle. Količina prerasle podlage je bila približno enaka na eAM, sAM in gAM (Slika 8).



Slika 8: Kulture prašičjih urotelijskih celic 8 dni po nasaditvi na različne nosilce iz AM. Celice še niso dosegle konfluentnosti, vidi se njihov rob rasti (→). Merilce: 100 μ m.

14 dni po nasaditvi PuIII z gostoto $2 \cdot 10^5$ c/cm² na AM, vpete z obročki, celice še niso dosegle popolne konfluentnosti. Količina prerasle podlage je bila približno enaka na eAM in sAM. Na konstruktu gAM pa je prišlo do okužbe.



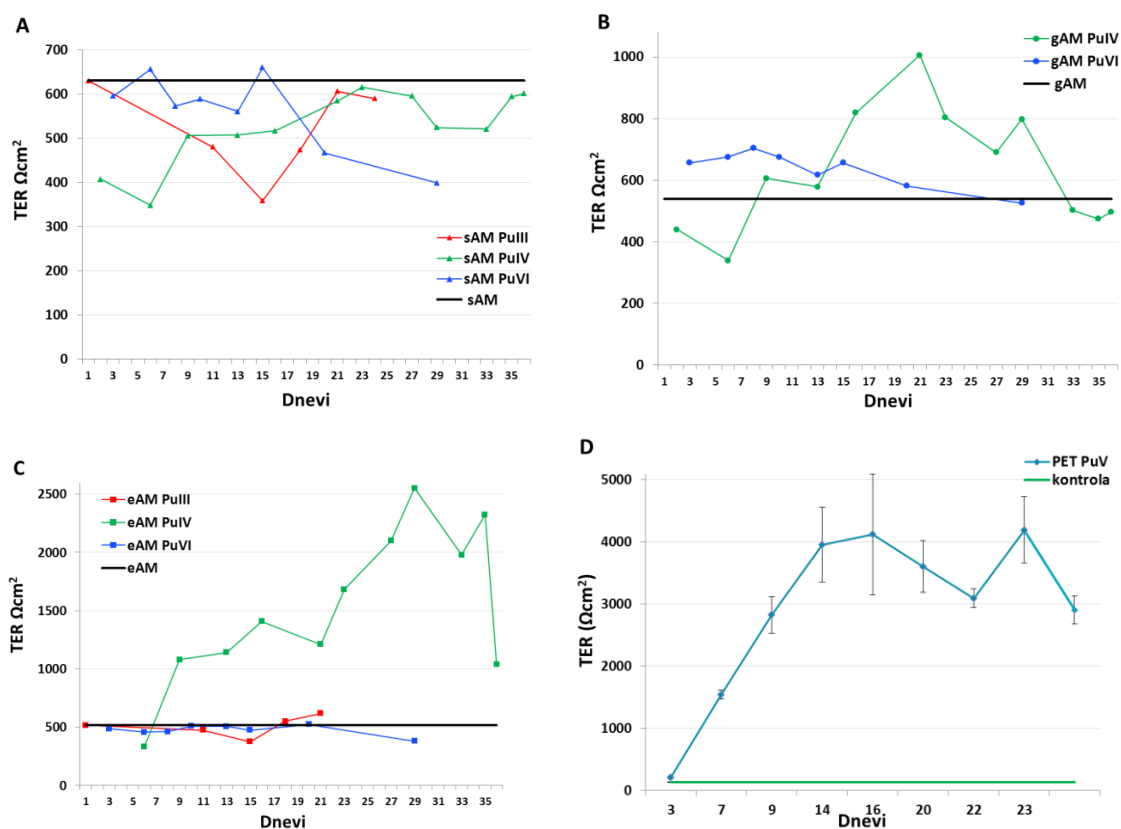
Slika 9: Kulture prašičjih urotelijskih celic 14 dni po nasaditvi na različne nosilce iz AM. Celice še niso dosegle konfluentnosti, vidi se njihov rob rasti (→). Merilce: 100 μ m.

Tudi ob koncu gojenja celice niso dosegle popolne konfluentnosti. Medtem ko so celice PuIII in PuIV na AM, vpete z obročki, ostale pritrjene do konca gojenja, so se celice PuVI na AM, vpete z obročki, že po enem tednu popolnoma odluščile. Tudi celice PuIV, ki so bile dvakrat ločeno nasajene na AM, vpete v nastavke, se niso pritrdile na noben nosilec iz AM.

4.5 VREDNOSTI TRANSEPITELIJSKE UPORNOSTI KONSTRUKTOV

Preden smo nasadili PuIII, smo zmerili vrednosti TER samih AM brez celic. eAM je imela povprečno vrednost TER $516,6 \Omega\text{cm}^2$, sAM $630,0 \Omega\text{cm}^2$ in gAM $539,5 \Omega\text{cm}^2$. Vrednosti TER same AM smo prikazali z ravno črno črto (Slika 10) in tako spremljali rast (ali padec) TER v primerjavi z začetno upornostjo same AM.

Na konstruktih urotelijskih celic in nosilcev AM so bile izmerjene najvišje vrednosti TER naslednje: sAM + PuIII $606,2 \Omega\text{cm}^2$, sAM + PuIV $614,6 \Omega\text{cm}^2$ in sAM + PuVI $659,4 \Omega\text{cm}^2$ (Slika 10A); gAM + PuIV $1005 \Omega\text{cm}^2$ in gAM + PuVI $704,2 \Omega\text{cm}^2$ (Slika 10B); eAM + PuIII $618,8 \Omega\text{cm}^2$, eAM + PuIV $2551 \Omega\text{cm}^2$ in eAM + PuVI $523,6 \Omega\text{cm}^2$ (Slika 10C).



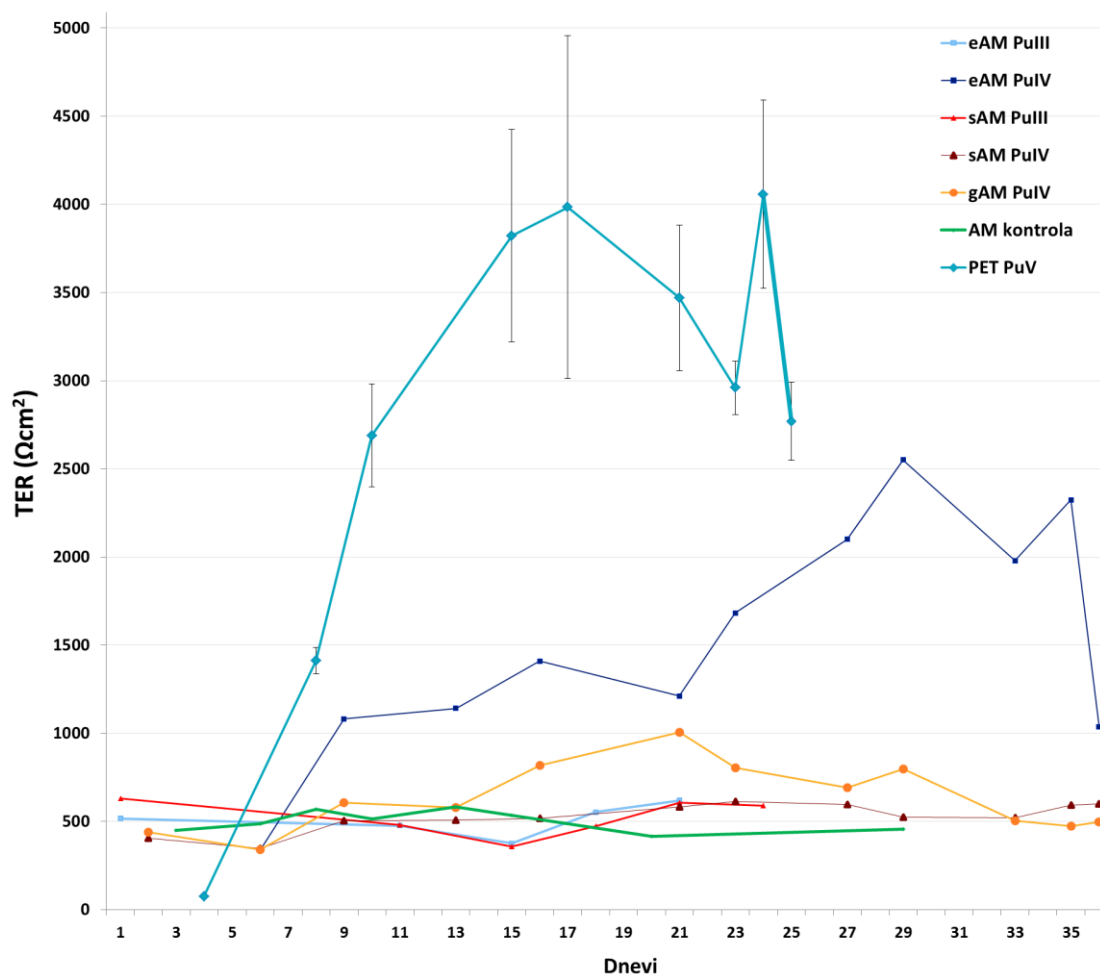
Slika 10: Vrednosti TER konstrukтов prašičjih urotelijskih celic na posameznih nosilcih. **A)** sAM. **B)** gAM. **C)** eAM. **D)** PET nosilci. N=6. Ravne črne črte so vrednosti TER same AM in ravna zelena črta je vrednost TER samega nosilca PET.

V prvem poskusu PuIII (rdeči črti v Slikah 10A in 10C) niso dosegle konfluentnosti in tako niso bistveno povečale TER konstruktov. Vrednost TER konstruktov je celo padla pod začetno vrednostjo TER samih AM.

V drugem poskusu so se vrednosti TER bolj razlikovale (zelene črte v Slikah 10A-C). Vrednost TER PuIV na gAM je dosegla $1005 \Omega\text{cm}^2$, kar že velja za tesni epitelij. TER PuIV na eAM je dosegla še višjo vrednost $2550 \Omega\text{cm}^2$, kar nakazuje na zelo uspešno rast urotelijskih celic in tvorbo tesnega urotelija. Vendar so bile te vrednosti še vedno značilno nižje od vrednosti TER, izmerjenih na konstruktih iz urotelijskih celic na sintetičnih PET nosilcih.

V tretjem poskusu smo vključili kontrolo, vpeto AM, na katero nismo nasadili celice. Njena začetna vrednost TER je bila $449,4 \Omega\text{cm}^2$ in je tekom poskusa nihala med $415,8 \Omega\text{cm}^2$ in $583,8 \Omega\text{cm}^2$ (zelena črta v Sliki 11). PuVI v tretjem poskusu niso dosegle konfluentnosti in so se celo odluščile (modre črte v Slikah 10A-C). Vrednosti TER konstruktov, na katere smo nasadili PuVI, niso bile bistveno višje od TER kontrole brez nasajenih PuVI. Tudi z mikroskopom smo videli, da so se celice odluščile v prvih dneh gojenja in zato so bile vrednosti TER vseh konstruktov podobne kot kontrola brez celic.

Preden smo PuV nasadili na PET nosilce, smo izmerili TER nosilcev brez celic. Povprečno upornost hranilnega medija in nosilca je bila $133,7 \Omega\text{cm}^2$ (zelena ravna črta v Sliki 10D). To vrednost smo odšteli od vseh naknadno izmerjenih vrednosti TER. PuV na sintetičnih PET nosilcih so dosegle vrednost $4057 \pm 533,6 \Omega\text{cm}^2$, kar je značilno več od vrednosti TER na AM. Po 14 dneh so že dosegle vrednost TER $3822 \pm 602,6 \Omega\text{cm}^2$ (Slika 11).



Slika 11: Vrednosti TER konstruktov prašičjih urotelijskih celic na različnih nosilcih.

Slika 11 je združen graf vrednosti TER, kjer vidimo, da so celice na PET nosilcih dosegle znatno višje vrednosti TER kot na AM. Rezultate tretjega poskusa smo izključili iz grafa, ker so se PuVI odluščile.

Tretiranje konstruktov na PET nosilcih z dekstranom je zmanjšalo TER s $4057 \pm 533,6 \Omega\text{cm}^2$ na $2770 \pm 222,3 \Omega\text{cm}^2$ (Slika 10D in Slika 11). Stanje celic se je verjetno poslabšalo zaradi pomanjkanje hranil, ker so bile celice v pufri HBSS z dodanima 1 % HEPES in dekstranom [1 mg/ml]. Kljub temu je bila vrednost TER po padcu še vedno relativno visoka in kaže, da so celice preživele tretiranje z dekstranom in, da je ostal epitelij še vedno tesen. Tesnost epitelija so tudi potrdili rezultati poskusa permeabilnosti.

4.6 VREDNOSTI PERMEABILNOSTNIH KOEFICIENTOV KONSTRUKTOV

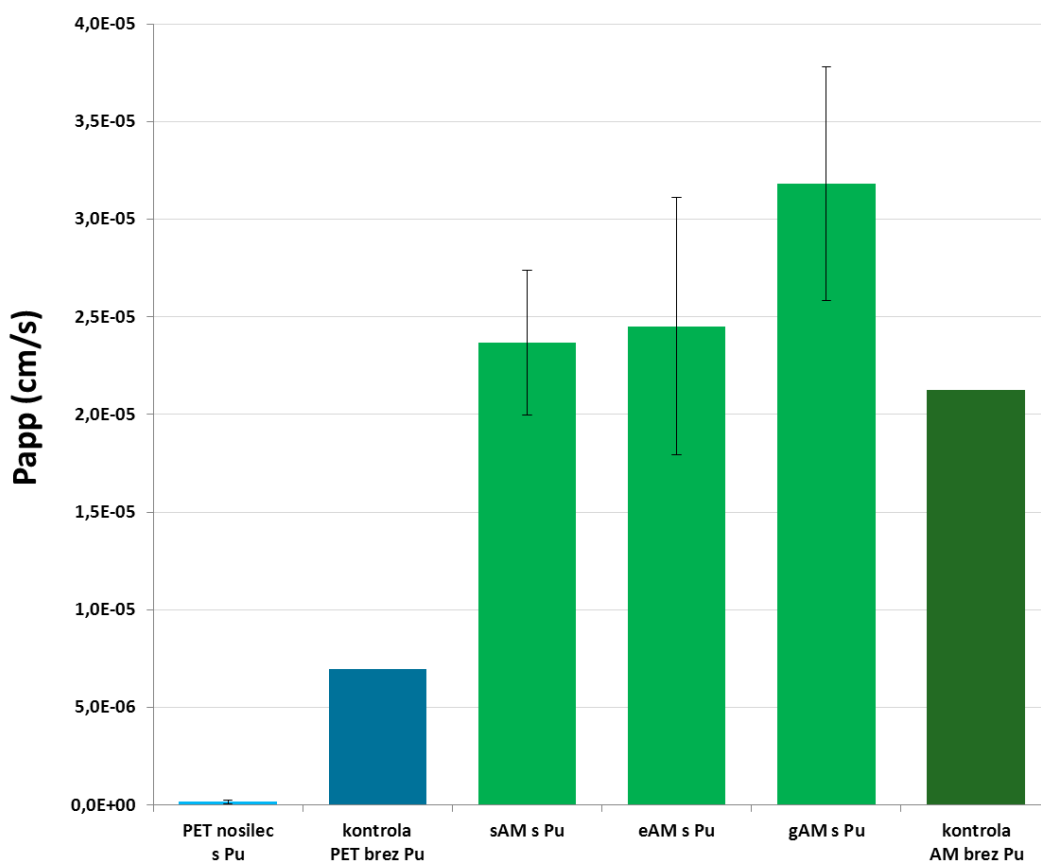
Nasadili smo PuV na nosilce PET in po 3 tednih izvedli poskus permeabilnosti. Visok izmerjen TER ($2770 \pm 222,3 \Omega\text{cm}^2$) ob koncu tretiranja z dekstranom nam je pokazal, da so urotelijske celice bile še vedno žive in da je urotelij ostal intakten.

Dvakrat smo nasadili celice PuIV na eAM, sAM in gAM, vpete na nastavke, in zmerili njihovo permeabilnost. Prvič smo celice gojili 5 tednov in drugič 2 tedna. Po gojenju smo izvedli poskus permeabilnosti. Ko smo nastavili poskus z difuzijskimi celicami, smo izmerili ustrezne vrednosti upornosti tekočine (R_f) (med 20 in $60 \Omega\text{cm}^2$) in asimetrije napetostnih elektrod (dPe) ($< 10 \text{ mV}$), nato smo s programom *Clamp* izničili te vrednosti. Vstavili smo konstrukte v difuzijske celice in spremljali živost tkiva, ki je definirana z vrednostjo transepitelijske upornosti (R_t) večja od 10Ω in absolutno vrednostjo transepitelijskega potenciala (dP) večjo od $0,7 \text{ mV}$. Izmerjeni elektrofiziološki parametri so pokazali, da naša tkiva niso živa. Noben konstrukt ni kazal R_t in dP večje od 10Ω in $0,7 \text{ mV}$ (Preglednica 2). Tudi vrednosti permeabilnostnih koeficientov in imunofluorescenca konstruktoev so potrdili odsotnost urotelijskih celic.

Preglednica 2: Elektrofiziološki parametri konstruktoev. Upornost tekočine (R_f), asimetrija napetostnih elektrod (dPe), transepitelijska upornost (R_t) in transepitelijski potencial (dP). kAM je kontrolna AM brez prašičjih urotelijskih celic.

Datum	konstrukt	R_f [Ohm]	dPe [mV]	R_t [Ohm]	dP [mV]
9.7.2012	sAM	53,3	2,1	9,0	-0,2
	sAM	54,9	0,9	1,0	-0,1
	eAM	37,3	-0,4	9,0	0,1
	eAM	42,2	-5,5	9,0	-2,6
	gAM	32,3	1,9	6,0	-0,1
19.12.2012	sAM	57,0	1,0	6,0	0,3
	sAM	37,8	-1,0	13,0	0,1
	eAM	56,0	5,3	1,0	-0,7
	gAM	47,7	-2,5	3,0	-0,1
	kAM	53,2	-0,2	1,0	0,3

PuV celice na nosilcih PET so imele izredno nizko permeabilnost ($1,63 \cdot 10^{-7} \pm 1,02 \cdot 10^{-7}$ cm/s) (Slika 12), kar kaže na to, da so dosegle konfluentnost in tvorile zelo tesen epitelij. Sama kontrola nosilca PET brez nasajenih celic je imela visoko permeabilnost ($6,98 \cdot 10^{-6}$ cm/s) in tako ni prispevala k neprehodnosti izpostavljenega urotelija na nosilcih PET. gAM je imel največjo permeabilnost ($3,18 \cdot 10^{-5} \pm 5,97 \cdot 10^{-6}$ cm/s), kar je pričakovano, saj smo AM odstranili epiteljske celice, ki bi prispevale k neprehodnosti dekstrana. sAM in eAM sta imela zelo podobni vrednosti P_{app} ($2,37 \cdot 10^{-5} \pm 3,73 \cdot 10^{-6}$ cm/s in $2,45 \cdot 10^{-5} \pm 6,60 \cdot 10^{-6}$ cm/s), kar je spet pričakovano, saj sta obe intaktni AM z epitelijem iz AEC. Kontrola, na katero pa uroteljske celice nismo nasadili, je imela P_{app} vrednost $2,12 \cdot 10^{-5}$ cm/s, kar ni bistveno nižje od ostalih konstruktoev AM, na katere smo celice nasadili. Podobne vrednosti sAM, eAM, gAM in kontrole povedo, da se celice niso uspešno pritrdile na nobeno AM. Torej vrednosti P_{app} za konstrukte dejansko izražajo P_{app} same AM. Vrednosti P_{app} so zelo visoke, in sicer med $2,12 \cdot 10^{-5}$ cm/s in $2,45 \cdot 10^{-5}$ cm/s, in so pričakovane za puščajoče epitelije kakršna je AM.

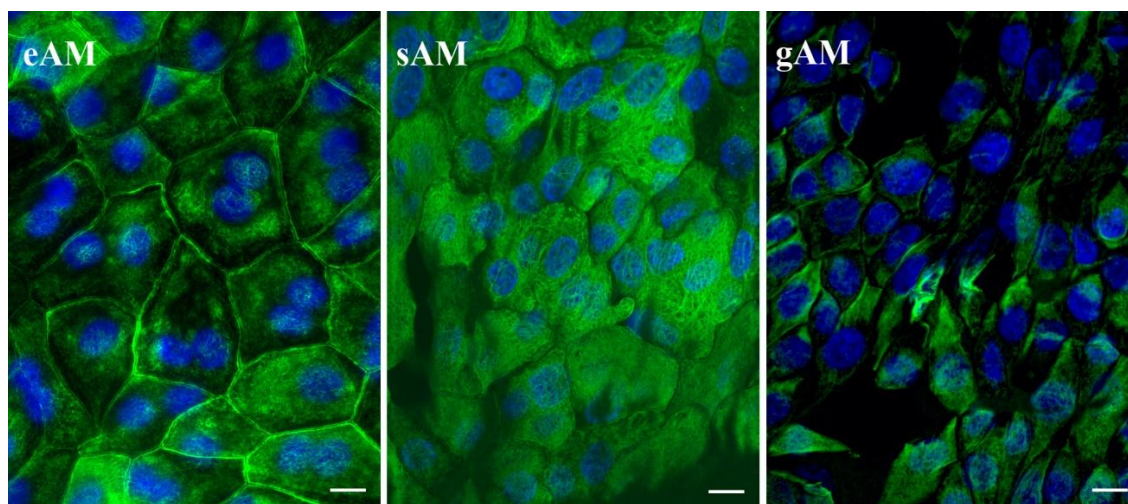


Slika 12: Permeabilnost dekstrana skozi različne konstrukte. P_{app} je permeabilnostni koeficient [cm/s]. PET, sAM in eAM: N=3; gAM: N=2.

4.7 IMUOFLUORESCENCA UROTELIJSKIH CELIC NA NOSILCIH IZ AM

4.7.1 Imunofluorescenca citokeratina 20

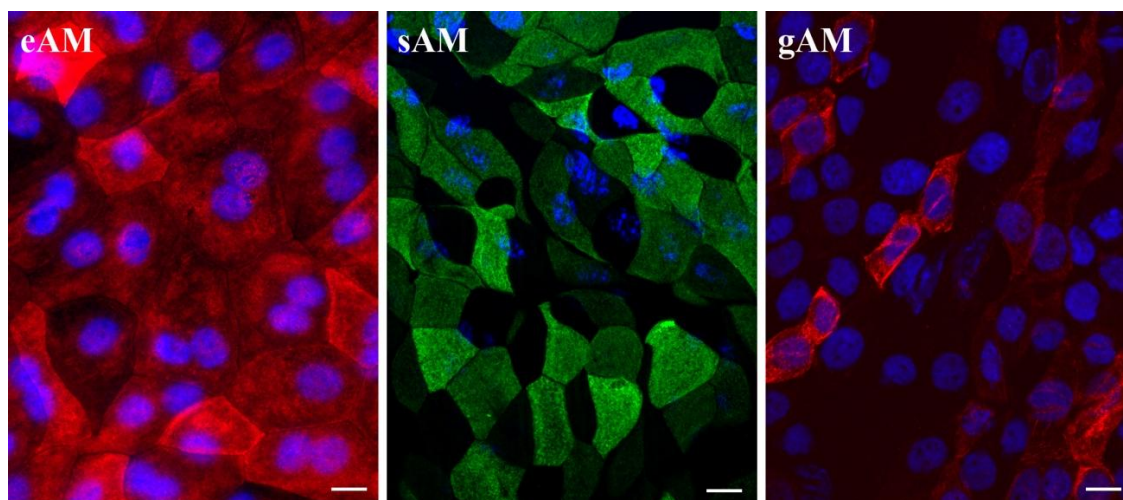
Z imunofluorescenčnim označevanjem smo na vseh konstruktih v prašičjih urotelijskih celicah subapikalno dokazali prisotnost intermediarnega filameta CK20 (Slika 13). Na eAM in sAM so bile celice velike ~ 30 μm in vse so izražale CK20. Na gAM pa so bile celice izrazito manjše (~ 15 μm) in niso vse izražale CK20. Na sAM je CK20 tvoril filamentozno mrežo.



Slika 13: Imunofluorescenca CK20 v urotelijskih celicah na vseh nosilcih iz AM. Citokeratin CK20 je obarvan zeleno in jedra modro. Merilce: 10 μm .

4.7.2 Imunofluorescenca uroplakinov

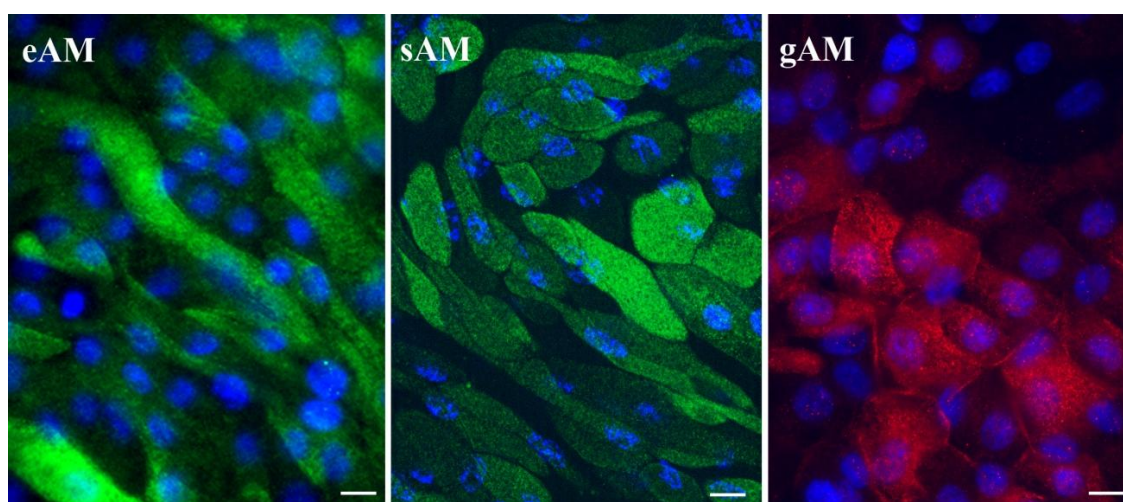
S protitelesi proti vsem štirim uroplakinom smo dokazali, da so uroplakini prisotni v urotelijskih celicah na vseh konstruktih (Slika 14). Uporabljeno protitelo se veže na UPIIIa, UPIa/Ib in UPII. Na eAM je največji delež celic izražalo uroplakine, na sAM so bile prisotne celice, ki niso izražale uroplakinov, največji delež celic, ki niso izražale uroplakinov pa je bil na gAM, kjer so tudi celice bile najmanjše.



Slika 14: Imunofluorescenca uroplakinov v urotelijskih celicah na vseh nosilcih iz AM. Uroplakini so obarvani rdeče ali zeleno in jedra modro Merilce 10 μ m.

4.7.3 Imunofluorescenca uroplakina UPIIIa

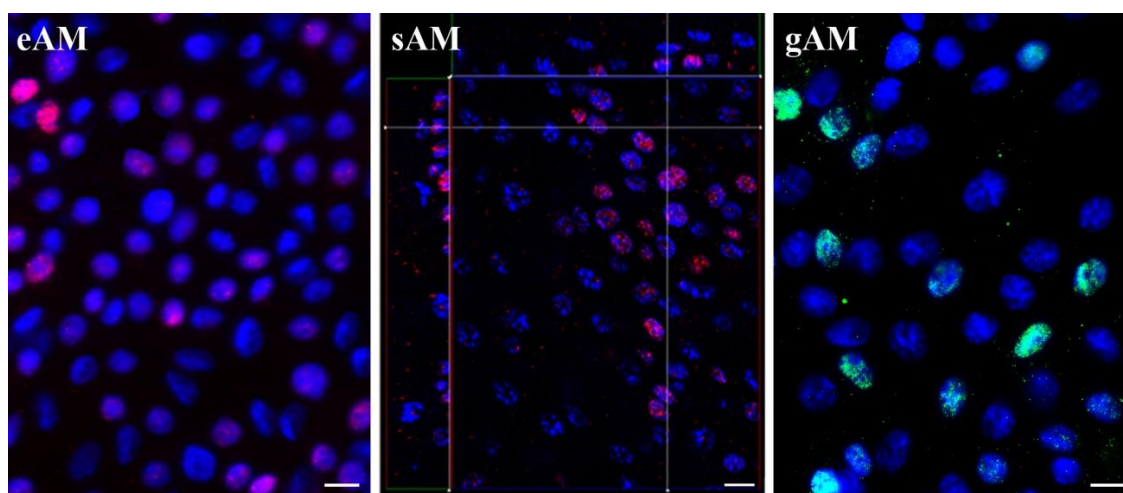
Z imunofluorescenčnim označevanjem smo dokazali prisotnost uroplakina UPIIIa v urotelijskih celicah na vseh konstruktih (Slika 15). UPIIIa je eden izmed štirih transmembranskih proteinov, ki tvorijo urotelijske plake na apikalni plazmalemi. Na vseh konstruktih je večina urotelijskih celic apikalno izražala UPIIIa, vendar so vmes tudi bile celice, ki UPIIIa niso izražale.



Slika 15: Imunofluorescenca UPIIIa v urotelijskih celicah na vseh nosilcih iz AM. Uroplakin UPIIIa je obarvan zeleno ali rdeče in jedra modro. Merilce 10 μ m.

4.7.4 Imunofluorescenca transkripcijskega dejavnika p63

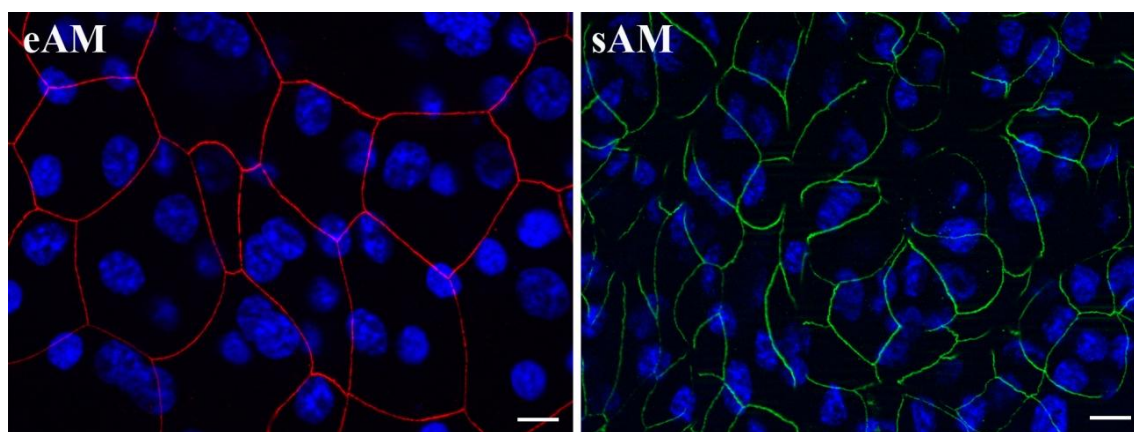
Z imunofluorescenčnim označevanjem smo dokazali prisotnost transkripcijskega dejavnika p63 v urotelijskih celicah na vseh konstruktih (Slika 16). Protitelo proti p63 je pozitivno obarvalo jedra celic. p63 je značilno prisoten v proliferajočih celicah in tako lahko nazorno pokaže, katere celice se še niso diferencirale. Na vseh konstruktih so urotelijske celice rasle v več skladih in manj kot polovica njihovih jeder je bila pozitivno označena za p63. Z optičnimi rezinami smo lahko sestavljali 3D slike in opazovali različno označevanje v različnih skladih. Slika 16 prikazuje jedra urotelijskih celic na sAM in s prečnima prerezoma pokaže, da so pretežno bazalne celice pozitivno označene, medtem ko so površinske urotelijske celice negativne za p63. Odsotnost p63 v površinskih celicah nakazuje, da niso proliferativne in da so že dosegle končno diferenciranost. Medtem ko so bazalne urotelijske celice še zmeraj proliferativne.



Slika 16: Imunofluorescenca p63 v urotelijskih celicah na vseh nosilcih iz AM. Transkripcijski dejavnik je obarvan rdeče ali zeleno in jedra modro. Črte na sAM prikažejo prečne prereze AM. Merilce 10 μm .

4.7.5 Imunofluorescenca proteina tesnega stika klavdina-8

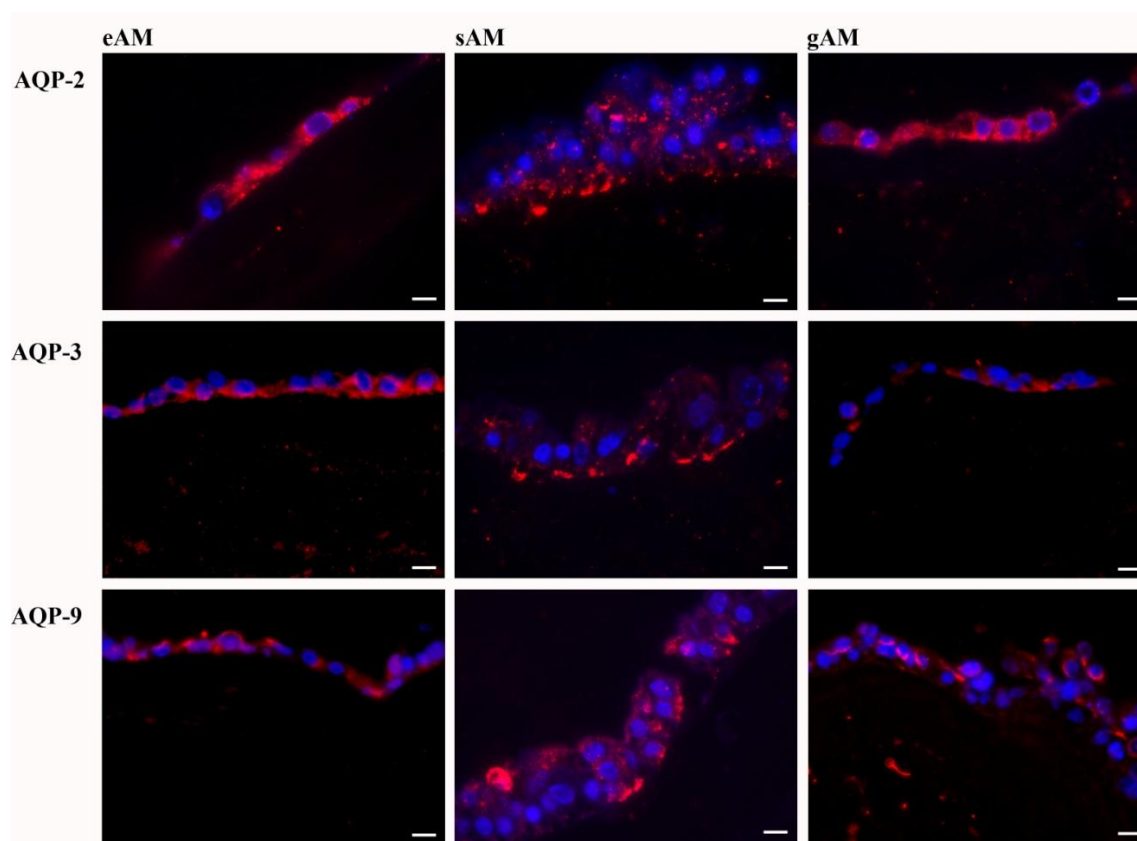
Z imunofluorescenčnim označevanjem smo dokazali prisotnost klavdina-8 na eAM in sAM (Slika 17). Klavdin-8 je značilen za diferencirane urotelijske celice in se je pojavljal samo apikalno med površinskimi celicami v zelo tanki ostri črti. Pojavljal se je povsod med celicami in nakazuje zelo dobro ohranjene tesne stike med površinskimi celicami. Zaradi okužbe PuIII na gAM ter slabih preparatov PuIV na gAM nismo uspeli dokazati prisotnosti klavdina-8 na gAM. Glede na visoke izmerjene vrednosti TER pa predvidevamo, da so tudi PUC na gAM izražale klavdin-8.



Slika 17: Imunofluorescenca klavdina-8 med urotelijskimi celicami na nosilcih iz AM. Klavdin-8 je obarvan rdeče ali zeleno in jedra modro. Merilce 10 μ m.

4.7.6 Imunofluorescenca akvaporinov

Z imunofluorescenčnim označevanjem smo dokazali prisotnost AQP-2, AQP-3 in AQP-9 v urotelijskih celicah na vseh konstruktih (Slika 18). Urotelijske celice na eAM in gAM so izražale AQP-2 v citoplazmi, na gAM pretežno bazalno. Na sAM so celice vseh skladov izražale AQP-2 le bazalno, verjetno na plazmalemi. AQP-3 je bil prisoten na bazolateralnih plazmalemah vseh celic. Nikjer pa ni bil izražen na apikalni plazmalemi. V urotelijskih celicah na eAM je bil AQP-9 izražen v citoplazmi. Na sAM in gAM pa večinoma na bazalnih plazmalemah urotelijskih celic.

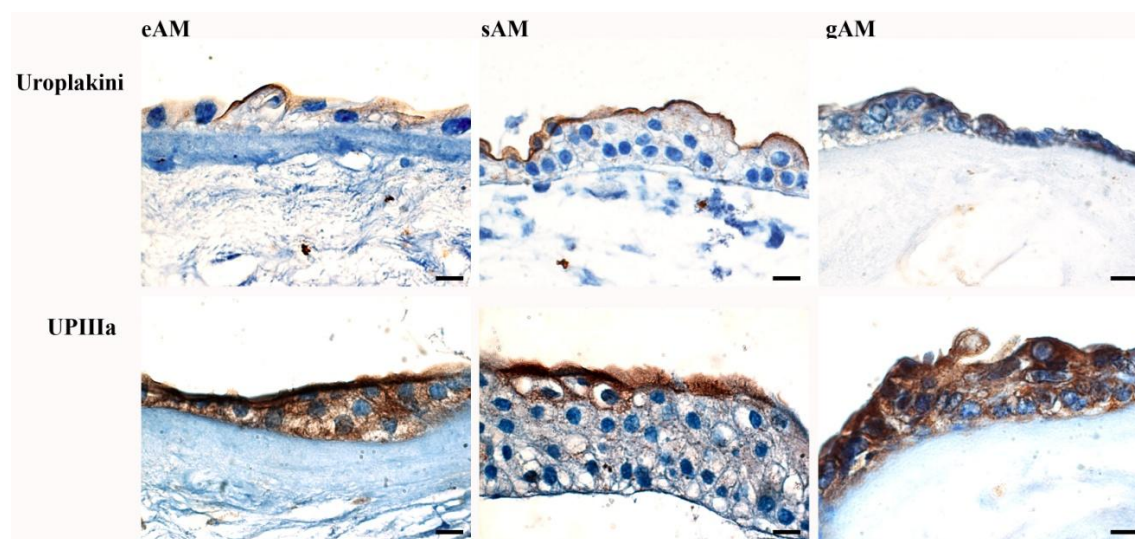


Slika 18: Imunofluorescenca akvaporinov v urotelijskih celicah na vseh nosilcih iz AM. Akvaporini so obarvani rdeče in jedra modro. AQP so izraženi pretežno bazalno. Merilce: 10 μm .

4.8 IMUNOHISTOKEMIJA UROTELIJSKIH CELIC NA NOSILCIH IZ AM

4.8.1 Imunohistokemija uroplakinov

Z imunohistokemijskim označevanjem smo dokazali prisotnost uroplakinov v urotelijskih celicah na vseh konstruktih (Slika 19) in potrdili rezultate imunofluorescenčnega označevanja. Povsod so se uroplakini izražali na apikalni površini PUC in ponekod tudi rahlo v citoplazmi. Uroplakini na apikalni plazmalemi so označevalci diferenciranih PUC in najbolj značilno so se lokalizirali na apikalnih plazmalemah urotelijskih celic, gojenih na sAM.



Slika 19: Imunohistokemija uroplakinov na vseh konstruktih. Merilce: 10 μ m.

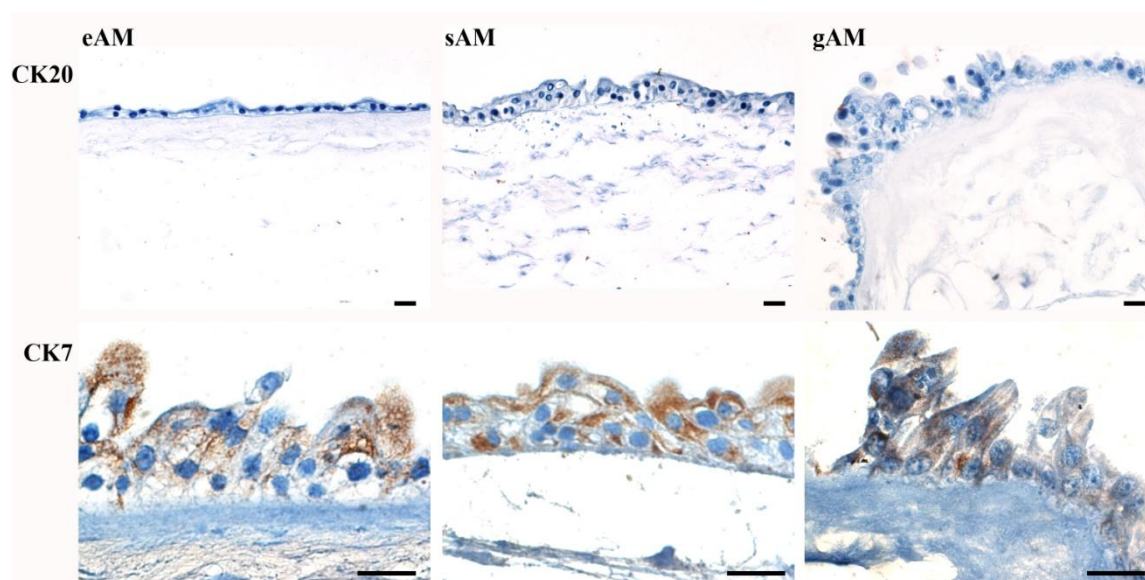
4.8.1.1 Imunohistokemija uroplakina UPIIIa

Z imunohistokemijskim označevanjem smo dokazali prisotnost uroplakina UPIIIa v urotelijskih celicah na vseh konstruktih (Slika 19). UPIIIa se je tudi zelo močno izražal v citoplazmi, ki pa je morda posledica nespecifične vezave. Vseeno je bilo njegovo izražanje močnejše na apikalni plazmalemi PUC. UPIIIa se je najmanj značilno izražal v celicah na gAM, kjer je bil enakomerno razporejen po citoplazmi in apikalni plazmalemi. Najbolj diferencirane celice so bile na sAM, kjer je bil UPIIIa prisoten le na apikalni površini PUC ter rahlo v njihovi citoplazmi.

4.8.2 Imunohistokemija citokeratinov

4.8.2.1 Imunohistokemija CK20

S protitelesi proti CK20 nismo dokazali prisotnosti CK20 v nobenih urotelijskih celicah na nobenemu konstrukt (Slika 20). Ponovili smo več poskusov, kjer smo odmaskirali proteine na različne načine (s segrevanjem v citratnem pufri in nato še s tripsinom) in rezultat za CK20 je bil vedno negativen. Glede na to, da smo z imunofluorescenčnim označevanjem dokazali CK20, je bil verjetno v tem primeru problem v metodi imunohistokemijskega označevanja parafinskih rezin.



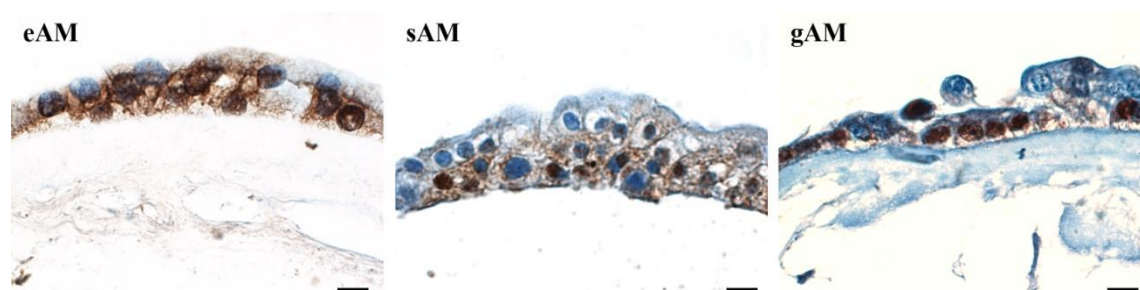
Slika 20: Imunohistokemija citokeratinov CK20 in CK7 na vseh konstruktih. Merilce: 20 μ m.

4.8.2.2 Imunohistokemija CK7

S protitelesi proti CK7 smo dokazali prisotnost tega citokeratina v urotelijskih celicah na vseh konstruktih (Slika 20). CK7 je bil prisoten v citoplazmi celic vseh skladov. Manj izrazit je bil v urotelijskih celicah na gAM.

4.8.3 Imunohistokemija transkripcijskega dejavnika p63

Z imunohistokemijskim označevanjem smo dokazali prisotnost transkripcijskega dejavnika p63 v urotelijskih celicah na vseh konstruktih (Slika 21). p63 je bil najmočneje izražen v jedrih, vendar je bila tudi citoplazma obarvana. p63 je bil značilno močneje izražen v bazalnih celicah, medtem ko so bile površinske celice manj obarvane. Neodvisno od števila skladov je bila značilna razlika med obarvanimi jedri bazalnih celic in neobarvanimi jedri površinskih celic.



Slika 21: Imunohistokemija transkripcijskega dejavnika p63 na vseh konstruktih. Merilce: 10 μ m.

Celice PuIII in PuIV so se uspešno pritrdile na AM, vpete z obročki. Po 3 in 5 tednih gojenja smo celice fiksirali, histološko obarvali s hematoksilinom-eozinom in opazovali njihovo morfološko zgradbo. Na vseh konstruktih so urotelijske celice uspevale v več skladih. Na gAM so rasle v enem skladu do štirih, na eAM v enem do petih skladov in na sAM v dveh do petih. Na sAM so bile celice najbolj konsistentno v več skladih, medtem ko so bili na eAM in gAM pogosti predeli, kjer so rasle le v enem skladu.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 AM ohrani morfologijo po dolgotrajnem shranjevanju pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

Po 15-mesečnem shranjevanju pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ AM ohrani svojo osnovno morfologijo. Epitelij AM gradijo poligonalne celice velikosti $\sim 20\text{ }\mu\text{m}$. AEC se ne prilegajo tesno, ampak jih ločujejo široki medcelični prostori, kar je posledica prekinitve tesnih stikov že med pozno nosečnostjo (Kobayashi in sod. 2010b). Dokazali smo, da AEC ne izražajo klavdina-8 v medceličnih stikih, kar je pričakovano za puščajoči epitelij. Klavdin-8 zmanjša kationsko permeabilnost (Yu in sod. 2003) in je značilen za PUC (Kreft in sod. 2006). Dokazali smo prisotnost CK20 v citoplazmi AEC. V epitelijskih celicah človeka je znanih 20 CK in CK20 je zadnji identificiran CK (Southgate in sod. 1999). Prejšnje raziskave so pokazale prisotnost CK 1, 4–8, 10, 11, 13, 14 in 17–19 v AEC (Regauer in sod. 1985, Mizoguchi in sod. 2000). Vendar ker je CK20 najnovejši odkriti CK (Moll in sod. 1990), raziskav glede prisotnosti CK20 v AM, še ni bilo. Naše imunofluorescenčno označevanje je prikazalo CK20 v citoplazmi AEC, vendar se izraža točkasto in ne tvori tako obsežne mreže, kot je vidno pri PUC.

Pod AEC sta bazalna lamina in spodaj ležeča stroma ohranjeni. Dokazali smo prisotnost kolagena v ZCM, ki je potreben za mehansko moč tkiva. V ZCM so tudi proteoglikani, ki imajo mnogo bioloških funkcij kot so adhezija celic, vezava rastnih dejavnikov in hidracija tkiv (Mourao 1991, Yung in sod. 2007). Perlekan je heparan sulfatni proteoglikan v AM, ki veže rastne dejavnike in sodeluje v celični adheziji (Murdoch in sod. 1992). Tudi hialuronska kislina je prisotna v ZCM in igra vlogo pri preprečevanju brazgotinjenja in zaviranju delovanja imunskih celic (He in sod. 2009). S histokemijskim barvanjem Verhoeff van Gieson smo dokazali prisotnost elastinskih vlaken v ZCM. Elastini dajo AM prožnost, kar je bistveno za uporabo AM v tkivnem inženirstvu, še posebej pri rekonstrukcijah urinarnega trakta in sečnega mehurja, saj je tkivo izpostavljeno raztegotovanju in potrebno je, da je tudi nosilec, kot je AM, elastičen.

Na morfološkem nivoju smo dokazali ohranjeno integriteto AM in tudi drugi so dokazali ohranjene strukturne komponente in biomehanske lastnosti AM po zamrznitvi (Oxlund in sod. 1990, Kruse in sod. 2000, Thomasen in sod. 2011). Toda na ultrastrukturnem nivoju z elektronsko mikroskopijo so prikazali, da so nekatere AEC skrčene in nepravilnih oblik, s poškodovanimi mikrovili in poškodbami v plazmalemi in, da so se ponekod odluščile po dolgotrajni zamrznitvi (Hopkinson in sod. 2008).

5.1.2 AEC ne preživijo zamrzovanja

Z meritvijo elektrofizioloških parametrov AM z elektrodami v difuzijskih celicah smo dokazali, da AEC niso žive. Spremljali smo transepitelijski potencial in transepitelijsko upornost in tako opredelili vitalnost in integriteto tkiva (Peternel in sod. 2012). Potencial in upornost sta bila vedno manj kot 0,7 mV in 10 Ω . Nizek potencial kaže, da celice niso aktivno prenašale ionov skozi membrane. Nizka vrednost upornosti predstavlja zelo nizko upornost tkiva proti pasivnemu pretoku ionov. Bilo je že potrjeno, da AEC ne preživijo zamrzovanja, kar podpira dejstvo, da se ne pojavijo imunološke reakcije po transplantacijah (Kruse in sod. 2000, Hennerbichler in sod. 2007). Naša raziskava je dodatno potrdila nefunkcionalnost AEC z elektrofiziološkimi meritvami.

5.1.3 AM ima nizek TER in visoko permeabilnost

Vrednosti TER AM smo tudi izmerili z voltmetrom in elektrodami. Naše meritve TER AM se ujemajo z meritvami drugih avtorjev, ki so prav tako merili upornost v večprekatni petrijevki in so izmerili povprečen TER AM $\sim 580 \Omega\text{cm}^2$ (Kobayashi in sod. 2010b). Ta vrednost TER je še vedno relativno nizka in je posledica odsotnosti tesnih stikov med AEC. Vendar se te vrednosti ne skladajo z meritvami v difuzijskih celicah. Vrednosti, izmerjene v večprekatnih petrijevkah, so bile mnogo višje in so nihale med 449–630 Ωcm^2 , medtem ko so vrednosti upornosti, izmerjene v difuzijskih celicah, bile manj od 10 Ωcm^2 . Dokazano je že bilo, da so vrednosti TER, izmerjene z elektrodami v petrijevkah, višje od vrednosti, izmerjenih v difuzijskih celicah. V difuzijskih celicah je porazdelitev toka skozi epitelij bolj enakomerna, medtem ko z uporabo velikih elektrod v majhni petrijevki pride do prostorskih omejitev, ki spremenijo porazdelitev toka (Karp in sod. 2002). Vendar je vseeno tako veliko odstopanje vrednosti nepričakovano in je morda povezano z načini meritev, razliko med medijem in pufrom, ali s tem, kako tesno je bila AM vpeta na nosilcih in nastavkih za difuzijske celice.

Naše izmerjene vrednosti P_{app} za dekstran pri intaktni AM so bile med $1,14 \cdot 10^{-5}$ in $3,18 \cdot 10^{-5}$ cm/s. Druga raziskava je zmerila vrednost P_{app} $0,44 \cdot 10^{-5}$ cm/s za saharozo skozi svežo intaktno AM morskega prašička (North in sod. 1976). Saharosa ima radij 0,46 nm in tako manjšega od dekstrana (Guo in sod. 2003). Predvidevamo, da so naše višje izmerjene vrednosti P_{app} posledica zamrzovanja AM ali pa razlik med človeškimi AM in AM morskih prašičkov. AM ima zelo visoko (več kot 130 x večjo) permeabilnost v primerjavi z urotelijem. AM je tudi veliko bolj permeabilna (več kot 3 x) kot sintetični nosilci PET, ki imajo P_{app} $6,98 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Nosilci PET imajo pore

velike 400 nm, a vseeno veliko bolje zadržujejo dekstran s hidrodinamskim polmerom 1,4 nm kot AM. Klavdinske pore imajo premer 0,4 nm (Anderson in sod. 2009) in bi tako morale dekstran zadržati. Ker je bila permeabilnost dekstrana visoka, vemo, da imajo zamrznjene AM iz pozne nosečnosti prekinjene medcelične stike in tako prepuščajo molekule, kot je dekstran, skozi. Dodatno nam je imunofluorescenca pokazala, da je veliko dekstranov prišlo v citoplazmo AEC verjetno zaradi poškodovanih plazmalem.

AM je zelo permeabilna, še veliko bolj od sintetičnih membran PET, a vendarle je odporna na mehanske raztezke zaradi visoke vsebnosti kolagena, kar jo naredi zelo primerno za nosilec v tkivnem inženirstvu, kjer je visoka permeabilnost nujna za učinkovito difuzijo hranil in presnovnih odpadkov.

5.1.4 Termolizin učinkovito odstrani AEC in omogoča rast urotelijskih celic

Z 22-minutno inkubacijo s TL smo učinkovito odstranili AEC. Na gAM ni bilo AEC na AM, bazalna lamina pa je ostala ohranjena. Točno delovanje TL še ni razjasnjeno, ampak se sklepa, da specifično razgradi dezmosome (Gragnani in sod. 2007) in hemidezmosome (Hopkinson in sod. 2008). Dokazali so, da je rast izoliranih celic zelo visoka po tretiranju s TL in tako lahko sklepamo, da TL ne zmanjša viabilnosti celic (Germain in sod. 1993). To potrjujejo tudi naši rezultati, saj so urotelijske celice uspešno rasle tudi na gAM. TL ne odstrani fibroblastov iz strome (Germain in sod. 1993, Liu in sod. 2010b) in tako ne prepreči izločanja pomembnih molekul iz fibroblastov v ZCM, ki delujejo kot adhezijski ligandi. Ohranjena bazalna lamina nudi pritrjevalno podlago in njeni proteini, kot so kolageni, laminini in fibronektini regulirajo morfogenezo epitelija, rast, proliferacijo in diferenciacijo celic ter preprečijo apoptozo (Hopkinson in sod. 2008, Niknejad in sod. 2008). TL ni odstranil bazalne lamine in je tudi ohranil stromo. Komponente strome nismo analizirali na ultrastrukturnem nivoju, vendar so Hopkinson in sod. (2008) dokazali prisotnost kolagenov IV, VII, laminin-5, integrinov- $\alpha 6$ in $-\beta 4$ tudi po tretiranju s TL.

5.1.5 AM, vpeta na nastavku, ni primeren nosilec za gojenje urotelijskih celic

Praščje urotelijske celice se niso pritrdile na AM, vpete na nastavkih za difuzijske celice, ki so bile položene v petrijevkah. Iste celice uporabljene v teh poskusih pa so se pritrdile na AM, vpete z obročki, položene v večprekatne petrijevke. Torej domnevamo, da tovrstno gojenje na nastavkih ni primerno za gojenje urotelijskih celic. Morda se obe polovici ne spneta tako tesno, da bi preprečili puščanje celic ven iz reže. Ker je reža zelo ozka (5 x 22 mm), je velik del površine v stiku s plastiko nastavka in morda ta

plastika ne ustreza celicam. Poleg tega je zaradi majhnosti reže zračni mehurček pogosto nastal ob položitvi nastavka v medij v petrijevki. Zaradi zračnega mehurčka in občasnim puščanjem iz zgornje strani je lahko prišlo do pomanjkanje stika AM z medijem in tako do neprimerne okolja za gojenje celic. Potrebno bi bilo poskus ponoviti na drugem modelu nastavka, specifično narejenega za gojenje celic (*Physiological Instruments*).

5.1.6 AM, vpeta z obročkom, omogoča diferenciacijo urotelijskih celic

Urotelijske celice se uspešno pritrjujejo na AM, kot so podobne raziskave že pokazale (Sharifiaghdas in sod. 2007, Dragin 2010, Sartoneva in sod. 2011). Celice so tvorile do 5 skladov, podobno kot pri drugi raziskavi, kjer so tvorile do 4 sklade (Sharifiaghdas in sod. 2007). Urotelij, vzpostavljen na sAM, je bil najbolj uspešen. Na vseh AM so urotelijske celice tvorile do 4 ali 5 skladov, vendar so samo na sAM enakomerno rasle v več skladih; medtem pa so na eAM in gAM bili le občasni predeli sestavljeni iz več skladov. Medtem ko so Sharifiaghdas in sod. (2007) dokazali le prisotnost dezmosomov in hemidezmosomov urotelijskih celic, gojenih na AM, smo mi dodatno dokazali izražanje diferenciacijskih označevalcev. Urotelijske celice, gojene na eAM, sAM in gAM, so izražale značilne UP in CK. UP so bili prisotni pretežno na apikalni membrani, a tudi v citoplazmi. Najbolj diferencirane so bile urotelijske celice na sAM, ki so tvorile enoten večskladen urotelij, z UP le v apikalni plazmalemi. CK7 je značilen za vse sklade urotelija in je bil močno izražen v citoplazmi urotelijskih celic na vseh konstruktih. Subapikalno izražanje CK20 v PUC je značilnost diferenciranega urotelija in tako razporejen CK20 smo dokazali na vse konstruktih. Najslabše so izražale UP in CK urotelijske celice, gojene na gAM. Na gAM je manjši delež urotelijskih celic izražal UP in CK in izražanje je bilo šibkejše. Celice so bile tudi manjše na gAM kot na sAM ali eAM. Odsotnost transkripcijskega dejavnika p63 je tudi znak diferenciacije (Karni-Schmidt in sod. 2011). Na vseh konstruktih so prevladovali celice z jedri, katera niso izražala p63, kar dokazuje, da niso proliferajoče in so dosegle končno diferenciacijo. p63 je bil izražen samo v jedrih bazalnih celic, ne glede na število skladov.

Praščice urotelijske celice tvorijo tesne stike na nosilcih iz AM. Najpomembnejša lastnost urotelija je njegova neprehodnost, ki preprečuje internalizacijo potencialno strupenih snovi iz urina. Tesni stiki med PUC preprečijo paracelularni transport skozi urotelij. Klavdin-8 zmanjša permeabilnost paracelularne poti in je značilen za diferencirane PUC. Urotelijske celice, gojene na AM, so tvorile tesne linije klavdina-8 med seboj. Izražanje klavdina-8 je bilo zelo močno na sAM in eAM. Žal na gAM nismo uspeli videti klavdina-8 zaradi problematične metodologije imunofluorescenčnega označevanja. AM je zelo tanka in mukozna in po rezanju na več manjših koščkov se ti

koščki zlepijo skupaj, kar vpliva na proces imunooznačevanja ter oteži prenos na objektno stekelce in opazovanje z mikroskopom. Poskuse bi bilo treba ponoviti. Najbolje bi bilo gojiti celice na manjših nosilcih (morda za v 24-prekatne petrijevke) in izvajati imunofluorescenčno označevanje direktno na vpeto membrano. Tako se ne bi zlepila in bi vedeli, katera stran je zgornja z urotelijskimi celicami. To bi olajšalo prenos na stekelce in zmanjšalo možnost poškodbe celic.

5.1.7 Urotelij, vzpostavljen na AM, izraža akvaporine podobno kot nativni urotelij

Dokazali smo izražanje AQP-2, -3 in -9 na vseh konstruktih. V nativnem uroteliju je AQP-2 prisoten na vseh plazmalemah urotelijskih celic, razen na apikalni plazmalemi PUC in je tudi šibkeje prisoten v citoplazmi vseh celic (Spector in sod. 2002). Naši vzpostavljeni uroteliji so pokazali podobno izražanje. AQP-2 je bil v vseh konstruktih prisoten v citoplazmi urotelijskih celic. Na sAM je bil AQP-2 izražen na bazalnih plazmalemah vseh urotelijskih celic, ni pa bil prisoten na apikalni plazmalemi PUC. AQP-3 je v nativnem uroteliju prisoten le na plazmalemah in ni prisoten v citoplazmi. AQP-3 je najmočnejše izražen na bazalnih plazmalemah bazalnih celic in ni prisoten na apikalni plazmalemi PUC (Spector in sod. 2002, Rubenwolf in sod. 2009). Naši vzpostavljeni uroteliji so kazali enako izražanje na vseh konstruktih. PUC so izražale AQP-3 samo bazalno in ne na apikalnih plazmalemah. To je bilo spet najbolj nazorno v primeru sAM, kjer je bil AQP-3 izražen le na bazalni plazmalemi bazalnih celic. Podobnost z nativnim urotelijem kaže na visoko diferenciranost vzpostavljenega urotelija *in vitro*. Lokalizacija AQP je odvisna od stopnje diferenciranosti in dostave AQP iz Golgijevega aparata v plazmalemo med nastajanjem medceličnih stikov. V proliferajočih celicah *in vitro* je AQP-3 večinoma citoplazemski, medtem ko se prerazporedi na plazmalemo v diferenciranih celicah *in vitro* (Rubenwolf in sod. 2009). Tudi izražanje AQP-9 kaže na diferenciranost urotelijskih celic. AQP-9 ni prisoten v proliferajočih celicah, medtem ko je prisoten v diferenciranih celicah v nativnem uroteliju in uroteliju *in vitro* (Rubenwolf in sod. 2009, Rubenwolf in sod. 2012). Vse urotelijske celice na vseh nosilcih AM so izražale AQP-9 in tako predvidevamo, da so bile celice diferencirane. Medtem ko so Rubenwolf in sod. (2009) dokazali AQP-9 le v citoplazmi, smo v našem poskusu dokazali izražanje AQP-9 pretežno na bazalnih plazmalemah urotelijskih celicah, ki so v več skladih in tako predvidevamo, da so celice terminalno diferencirane. AQP-3 in -9 sta akvagliceroporina in ne prenašata samo vode, ampak tudi majhne nenabite molekule, kot je sečnina. Tako predvidevajo, da delujeta skupaj z ureo transporterjem-B pri prenašanju sečnine skozi bazalne sklade urotelija (Rubenwolf in sod. 2012). Na tak način bi lahko urotelij imel vlogo pri uravnavanju sestave urina.

5.1.8 Prašičje urotelijske celice ne tvorijo funkcionalne pregrade na AM

Prašičje urotelijske celice, gojene na nosilcih PET, so dosegle vrednost TER $4057 \pm 533,6 \Omega\text{cm}^2$, kar pomeni, da so tvorile zelo tesen epitelij. Z vrednostjo TER $>3000 \Omega\text{cm}^2$ smo dokazali, da je vzpostavljen urotelij dosegel funkcionalno lastnost, podobno nativnemu uroteliju (Cross in sod. 2005). Medtem ko urotelijske celice, ki so rasle v istih razmerah, na AM niso dosegle tako visoke vrednosti TER. Najuspešnejše so bile celice na eAM, ki so v enem primeru dosegle najvišjo vrednost TER $2551 \Omega\text{cm}^2$. Tudi na gAM so v enem primeru dosegle vrednost $1005 \Omega\text{cm}^2$. Medtem ko pa v ostalih poskusih urotelijske celice niso prispevale k upornosti in so izmerjene vrednosti TER nihale okoli vrednosti same AM.

Sicer pa vemo, da so urotelijske celice dosegle molekularno diferenciranost in tako lahko sklepamo, da so vrednosti TER nizke zato, ker celice niso dosegle konfluentnosti. Tudi z mikroskopom smo videli, da so bila območja konstrukta brez celic. Naši rezultati so primerljivi z izsledki Sartoneve in sod. (2010), kjer so se urotelijske celice sicer pritrdile na golo AM, vendar niso uspešno proliferirale in se je njihovo število manjšalo tekom gojenja.

AM za prva dva poskusa so bile od iste osebe in prašičje urotelijske celice so se uspešno pritrdile in diferencirale. AM za tretji poskus so bile vzete iz druge osebe in na njej celice niso rasle. Morda je sama AM pomembna spremenljivka, ki vpliva na rast celic.

Urotelijske celice niso dosegle konfluentnosti na AM in tako nismo mogli dosledno zmeriti TER kot tudi ne permeabilnosti konstruktov. Za nadaljnje ponovitve poskusov bo najprej treba vzpostaviti konfluentno kulturo prašičjih urotelijskih celic. Naše nasaditvene gostote so bile že maksimalne, saj pri večjih gostotah celic pride do inhibicije rasti. Morda bi dosegli konfluentnost na manjši površini AM ali pa z dodatnimi zunajceličnimi signalnimi molekulami, npr. mitogeni.

5.2 SKLEPI

- AM ne preživi shranjevanja v mediju Eagle's z glicerolom pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, vendar ohrani svojo osnovno morfologijo in kemijsko sestavo.
- AEC ne izražajo proteina tesnega stika klavdina-8, v citoplazmi pa izražajo intermediarni filament CK20.
- AM ima nizek TER in zelo visoko permeabilnost, kar je značilno za puščajoče epitelije.
- AM, vpeta na nastavku za difuzijske celice, ni primerna za gojenje urotelijskih celic.
- AM, vpeta z obročkom, je primeren nosilec za molekularno diferenciacijo prašičjih urotelijskih celic. Urotelijske celice tvorijo do 5-skladen urotelij in izražajo diferenciacijsko specifične proteine: uroplakine, CK7, CK20 ter klavdin-8. Transkripcijski dejavnik p63, specifičen za proliferajoče celice, izražajo le urotelijske celice v bazalnem skladu urotelija.
- Izražanje akvaporinov v uroteliju, vzpostavljenem na AM, je podobno nativnemu uroteliju in kaže na visoko stopnjo diferenciacije urotelijskih celic.
- Najvišjo stopnjo diferenciacije so dosegle prašičje urotelijske celice, gojene na stromi AM.
- Vzpostavljeni uroteliji na nosilcih iz AM niso tvorili funkcionalne permeabilnostne pregrade.

6 POVZETEK

V tkivnem inženirstvu so izrednega pomena lastnosti nosilca, ki morajo omogočiti integracijo v gostiteljsko tkivo in nuditi primerno okolje za rast in diferenciacijo celic. AM je do sedaj bila uspešno uporabljena pri transplantacijah in *ex vivo* ekspanziji mnogih vrst celic. AM ima velik potencial za regeneracijo, saj deluje protivnetno in antimikrobno, preprečuje brazgotinjenje, spodbuja epitelizacijo in izloča rastne dejavnike. O uporabi AM kot nosilca urotelijskih celic še ni veliko znanega in tako smo proučevali rast prašičjih urotelijskih celic na različnih nosilcih AM. Amnijske epitelijske celice so poligonalne oblike. Tvorijo epitelij s širokimi medceličnimi prostori in ne izražajo proteina tesnega stika klavdina-8. Tako je TER nizek in permeabilnost AM velika zaradi paracelularnega transporta med celicami. Pod epitelijem AM ležita bazalna lamina in stroma, bogati s kolageni in s proteoglikani. AM je zelo primerna kot nosilec v tkivnem inženirstvu, ker je zelo prepustna in ima primerno sestavo molekul. Prašičje urotelijske celice, gojene na AM, so dosegle visoko stopnjo diferenciacije. Površinske urotelijske celice so izražale uroplakine na apikalnih površinah, subapikalno mrežo CK20 in tvorile tesne stike s klavdinom-8. Vzpostavljen urotelij je bil večskladen in vsi skladi so izražali CK7 v citoplazmi. Dodatno so le jedra bazalnih celic izražala p63, značilen za proliferajoče celice, medtem ko površinske celice niso izražale p63, kar kaže na njihovo terminalno diferenciacijo. Vzpostavljen urotelij je bil podoben nativnemu uroteliju v izražanju AQP -2, -3 in -9. Najbolj diferenciran je bil urotelij, vzpostavljen na stromi AM, ki je bil najbolj podoben nativnemu uroteliju. Čeprav so se prašičje urotelijske celice molekularno diferencirale, niso dosegle konfluentnosti in tako nismo mogli dosledno izmeriti vrednosti TER niti permeabilnosti vzpostavljenega urotelija. Za uspešno rekonstrukcijo urinarnega trakta je odločilno, da na novo vzpostavljen urotelij tvori tako neprehodno krvno-urinsko pregrado kot nativni urotelij. Dokazali smo, da AM omogoča pritrjevanje in diferenciacijo prašičjih urotelijskih celic, vendar celice niso zadostno proliferirale, da bi ustvarile neprepustno pregrado. Morda bi v pravem okolju *in vivo* bila proliferacija boljša. Tako so rezultati preliminarni in bo treba dodatno ponoviti poskuse z namenom vzpostaviti funkcionalen urotelij.

7 VIRI

- Acharya, P., J. Beckel, W. G. Ruiz, E. Wang, R. Rojas, L. Birder in G. Apodaca (2004). Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287(2): F305-318
- Adinolfi, M., C. A. Akle, I. McColl, A. H. Fensom, L. Tansley, P. Connolly, B. L. Hsi, W. P. Faulk, P. Travers in W. F. Bodmer (1982). Expression of HLA antigens, beta 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature*, 295(5847): 325-327
- Akle, C. A., M. Adinolfi, K. I. Welsh, S. Leibowitz in I. McColl (1981). Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet*, 2(8254): 1003-1005
- Al-Sadi, R., K. Khatib, S. Guo, D. Ye, M. Youssef in T. Ma (2011). Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 300(6): G1054-1064
- Amasheh, S., N. Meiri, A. H. Gitter, T. Schoneberg, J. Mankertz, J. D. Schulzke in M. Fromm (2002). Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci*, 115(Pt 24): 4969-4976
- Anderson, J. M. (2001). Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci*, 16: 126-130
- Anderson, J. M. in C. M. Van Itallie (2009). Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(2): a002584
- Angelow, S., R. Ahlstrom in A. S. Yu (2008). Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295(4): F867-876
- Apodaca, G. (2004). The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic*, 5(3): 117-128
- Arai, N., H. Tsuno, M. Okabe, T. Yoshida, C. Koike, M. Noguchi in T. Nikaido (2012). Clinical application of a hyperdry amniotic membrane on surgical defects of the oral mucosa. *J Oral Maxillofac Surg*, 70(9): 2221-2228
- Araki, I., S. Du, H. Kobayashi, N. Sawada, T. Mochizuki, H. Zakoji in M. Takeda (2008). Roles of mechanosensitive ion channels in bladder sensory transduction and overactive bladder. *Int J Urol*, 15(8): 681-687
- Atala, A. (2011). Tissue engineering of human bladder. *Br Med Bull*, 97: 81-104
- Bailo, M., M. Soncini, E. Vertua, P. B. Signoroni, S. Sanzone, G. Lombardi, D. Arienti, F. Calamani, D. Zatti, P. Paul, A. Albertini, F. Zorzi, A. Cavagnini, F. Candotti, G. S. Wengler in O. Parolini (2004). Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation*, 78(10): 1439-1448
- Baker, S. C., G. Rohman, J. Southgate in N. R. Cameron (2009). The relationship between the mechanical properties and cell behaviour on PLGA and PCL scaffolds for bladder tissue engineering. *Biomaterials*, 30(7): 1321-1328
- Balkovetz, D. F. (2006). Claudins at the gate: determinants of renal epithelial tight junction paracellular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290(3): F572-579
- Barbieri, C. E. in J. A. Pietsenpol (2006). p63 and epithelial biology. *Exp Cell Res*, 312(6): 695-706

- Beall, M. H., S. Wang, B. Yang, N. Chaudhri, F. Amidi in M. G. Ross (2007). Placental and membrane aquaporin water channels: correlation with amniotic fluid volume and composition. *Placenta*, 28(5-6): 421-428
- Birder, L. A. (2005). More than just a barrier: urothelium as a drug target for urinary bladder pain. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289(3): F489-495
- Bolland, F., S. Korossis, S. P. Wilshaw, E. Ingham, J. Fisher, J. N. Kearney in J. Southgate (2007). Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering. *Biomaterials*, 28(6): 1061-1070
- Bongiovanni, G. A., A. R. Eynard in R. O. Calderon (2005). Altered lipid profile and changes in uroplakin properties of rat urothelial plasma membrane with diets of different lipid composition. *Mol Cell Biochem*, 271(1-2): 69-75
- Calvin, S. E. in M. L. Oyen (2007). Microstructure and mechanics of the chorioamnion membrane with an emphasis on fracture properties. *Ann N Y Acad Sci*, 1101: 166-185
- Campbell, S., T. D. Allen, B. B. Moser in J. D. Aplin (1989). The translaminal fibrils of the human amnion basement membrane. *J Cell Sci*, 94 (Pt 2): 307-318
- Chang, A., T. G. Hammond, T. T. Sun in M. L. Zeidel (1994). Permeability properties of the mammalian bladder apical membrane. *Am J Physiol*, 267(5 Pt 1): C1483-1492
- Chen, Y. J., M. C. Chung, C. C. Jane Yao, C. H. Huang, H. H. Chang, J. H. Jeng in T. H. Young (2012). The effects of acellular amniotic membrane matrix on osteogenic differentiation and ERK1/2 signaling in human dental apical papilla cells. *Biomaterials*, 33(2): 455-463
- Cheng, H. L., Y. Loai, M. Beaumont in W. A. Farhat (2010). The acellular matrix (ACM) for bladder tissue engineering: A quantitative magnetic resonance imaging study. *Magn Reson Med*, 64(2): 341-348
- Claude, P. (1978). Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol*, 39(2-3): 219-232
- Clausen, C., S. A. Lewis in J. M. Diamond (1979). Impedance analysis of a tight epithelium using a distributed resistance model. *Biophys J*, 26(2): 291-317
- Cross, W. R., I. Eardley, H. J. Leese in J. Southgate (2005). A biomimetic tissue from cultured normal human urothelial cells: analysis of physiological function. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289(2): F459-468
- Cummins, P. M. (2012). Occludin: one protein, many forms. *Mol Cell Biol*, 32(2): 242-250
- Dahms, S. E., H. J. Piechota, R. Dahiya, T. F. Lue in E. A. Tanagho (1998). Composition and biomechanical properties of the bladder acellular matrix graft: comparative analysis in rat, pig and human. *Br J Urol*, 82(3): 411-419
- Dragin, U. (2010). Amnijska membrana kot nosilec urotelija in njena vloga pri diferenciaciji urotelijskih celic. Diplomsko delo. Biotehniška fakulteta. Univerza v Ljubljani.,
- Espana, E. M., H. He, T. Kawakita, M. A. Di Pascuale, V. K. Raju, C. Y. Liu in S. C. Tseng (2003). Human keratocytes cultured on amniotic membrane stroma preserve morphology and express keratocan. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(12): 5136-5141
- Falke, G., J. Caffaratti in A. Atala (2000). Tissue engineering of the bladder. *World J Urol*, 18(1): 36-43

- Farhat, W. A., J. Chen, J. Haig, R. Antoon, J. Litman, C. Sherman, K. Derwin in H. Yeger (2008). Porcine bladder acellular matrix (ACM): protein expression, mechanical properties. *Biomed Mater*, 3(2): 025015
- Feil, G., S. Maurer, U. Nagele, J. Krug, C. Bock, K. D. Sievert in A. Stenzl (2008). Immunoreactivity of p63 in monolayered and in vitro stratified human urothelial cell cultures compared with native urothelial tissue. *Eur Urol*, 53(5): 1066-1072
- Fischer, A. H., K. A. Jacobson, J. Rose in R. Zeller (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc*, 2008: pdb prot4986
- Frings, S. M., R. D. Purves in A. D. Macknight (1990). Ion channels in urinary bladder. *Ren Physiol Biochem*, 13(1-2): 112-128
- Fromter, E. in J. Diamond (1972). Route of passive ion permeation in epithelia. *Nat New Biol*, 235(53): 9-13
- Fukuda, K., T. Chikama, M. Nakamura in T. Nishida (1999). Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea*, 18(1): 73-79
- Germain, L., M. Rouabhia, R. Guignard, L. Carrier, V. Bouvard in F. A. Auger (1993). Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns*, 19(2): 99-104
- Gragani, A., C. S. Sobral in L. M. Ferreira (2007). Thermolysin in human cultured keratinocyte isolation. *Braz J Biol*, 67(1): 105-109
- Grasso, E. J. in R. O. Calderon (2009). Urinary bladder membrane permeability differentially induced by membrane lipid composition. *Mol Cell Biochem*, 330(1-2): 163-169
- Grasso, E. J. in R. O. Calderon (2012). Urothelial endocytic vesicle recycling and lysosomal degradative pathway regulated by lipid membrane composition. *Histochem Cell Biol*,
- Guo, P., A. M. Weinstein in S. Weinbaum (2003). A dual-pathway ultrastructural model for the tight junction of rat proximal tubule epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285(2): F241-257
- Hammer, A., H. Hutter, A. Blaschitz, W. Mahnert, M. Hartmann, B. Uchanska-Ziegler, A. Ziegler in G. Dohr (1997). Amnion epithelial cells, in contrast to trophoblast cells, express all classical HLA class I molecules together with HLA-G. *Am J Reprod Immunol*, 37(2): 161-171
- Hao, Y., D. H. Ma, D. G. Hwang, W. S. Kim in F. Zhang (2000). Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*, 19(3): 348-352
- Harnden, P., I. Eardley, A. D. Joyce in J. Southgate (1996). Cytokeratin 20 as an objective marker of urothelial dysplasia. *Br J Urol*, 78(6): 870-875
- Harnden, P., N. Mahmood in J. Southgate (1999). Expression of cytokeratin 20 redefines urothelial papillomas of the bladder. *Lancet*, 353(9157): 974-977
- Hasegawa, M., H. Fujisawa, Y. Hayashi in J. Yamashita (2004). Autologous amnion graft for repair of myelomeningocele: technical note and clinical implication. *J Clin Neurosci*, 11(4): 408-411
- Hauser, P. J., D. A. Buethe, J. Califano, T. M. Sofinowski, D. J. Culkun in R. E. Hurst (2009). Restoring barrier function to acid damaged bladder by intravesical chondroitin sulfate. *J Urol*, 182(5): 2477-2482
- He, H., W. Li, D. Y. Tseng, S. Zhang, S. Y. Chen, A. J. Day in S. C. Tseng (2009). Biochemical characterization and function of complexes formed by hyaluronan and the heavy chains of inter-alpha-

- inhibitor (HC*HA) purified from extracts of human amniotic membrane. *J Biol Chem*, 284(30): 20136-20146
- Hennerbichler, S., B. Reichl, D. Pleiner, C. Gabriel, J. Eibl in H. Redl (2007). The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. *Cell Tissue Bank*, 8(1): 1-8
- Hicks, R. M., B. Ketterer in R. C. Warren (1974). The ultrastructure and chemistry of the luminal plasma membrane of the mammalian urinary bladder: a structure with low permeability to water and ions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 268(891): 23-38
- Hieber, A. D., D. Corcino, J. Motosue, L. B. Sandberg, P. J. Roos, S. Y. Yu, K. Csiszar, H. M. Kagan, C. D. Boyd in G. D. Bryant-Greenwood (1997). Detection of elastin in the human fetal membranes: proposed molecular basis for elasticity. *Placenta*, 18(4): 301-312
- Higa, K., S. Shimmura, J. Shimazaki in K. Tsubota (2005). Hyaluronic acid-CD44 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma. *Cornea*, 24(2): 206-212
- Higa, K., S. Shimmura, J. Shimazaki in K. Tsubota (2006). Ocular surface epithelial cells up-regulate HLA-G when expanded in vitro on amniotic membrane substrates. *Cornea*, 25(6): 715-721
- Hill, W. G. in M. L. Zeidel (2000). Reconstituting the barrier properties of a water-tight epithelial membrane by design of leaflet-specific liposomes. *J Biol Chem*, 275(39): 30176-30185
- Hopkinson, A., V. A. Shanmuganathan, T. Gray, A. M. Yeung, J. Lowe, D. K. James in H. S. Dua (2008). Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*, 14(4): 371-381
- Hsiao, Y. C., H. W. Lee, Y. T. Chen, T. H. Young in T. L. Yang (2011). The impact of compositional topography of amniotic membrane scaffold on tissue morphogenesis of salivary gland. *Biomaterials*, 32(19): 4424-4432
- Hu, P., S. Meyers, F. X. Liang, F. M. Deng, B. Kachar, M. L. Zeidel in T. T. Sun (2002). Role of membrane proteins in permeability barrier function: uroplakin ablation elevates urothelial permeability. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283(6): F1200-1207
- Hurst, R. E., S. W. Rhodes, P. B. Adamson, C. L. Parsons in J. B. Roy (1987). Functional and structural characteristics of the glycosaminoglycans of the bladder luminal surface. *J Urol*, 138(2): 433-437
- Iijima, K., Y. Igawa, T. Imamura, T. Moriizumi, T. Nikaido, I. Konishi in O. Nishizawa (2007). Transplantation of preserved human amniotic membrane for bladder augmentation in rats. *Tissue Eng*, 13(3): 513-524
- Ilancheran, S., A. Michalska, G. Peh, E. M. Wallace, M. Pera in U. Manuelpillai (2007). Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod*, 77(3): 577-588
- Iwasaki, R., S. Matsubara, T. Takizawa, T. Takayama, T. Yashiro in M. Suzuki (2003). Human amniotic epithelial cells are morphologically homogeneous: enzymehistochemical, tracer, and freeze-substitution fixation study. *Eur J Histochem*, 47(3): 223-232
- Jost, S. P. (1989). Cell cycle of normal bladder urothelium in developing and adult mice. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 57(1): 27-36
- Kamiya, K., M. Wang, S. Uchida, S. Amano, T. Oshika, N. Sakuragawa in J. Hori (2005). Topical application of culture supernatant from human amniotic epithelial cells suppresses inflammatory reactions in cornea. *Exp Eye Res*, 80(5): 671-679

- Kang, J. W., H. C. Koo, S. Y. Hwang, S. K. Kang, J. C. Ra, M. H. Lee in Y. H. Park (2012). Immunomodulatory effects of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci*, 13(1): 23-31
- Karni-Schmidt, O., M. Castillo-Martin, T. H. Shen, N. Gladoun, J. Domingo-Domenech, M. Sanchez-Carbayo, Y. Li, S. Lowe, C. Prives in C. Cordon-Cardo (2011). Distinct expression profiles of p63 variants during urothelial development and bladder cancer progression. *Am J Pathol*, 178(3): 1350-1360
- Karp, P. H., T. O. Moninger, S. P. Weber, T. S. Nesselhauf, J. L. Launspach, J. Zabner in M. J. Welsh (2002). An in vitro model of differentiated human airway epithelia. Methods for establishing primary cultures. *Methods Mol Biol*, 188: 115-137
- Khandelwal, P., S. N. Abraham in G. Apodaca (2009). Cell biology and physiology of the uroepithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*, 297(6): F1477-1501
- Khandelwal, P., W. G. Ruiz in G. Apodaca (2010). Compensatory endocytosis in bladder umbrella cells occurs through an integrin-regulated and RhoA- and dynamin-dependent pathway. *EMBO J*, 29(12): 1961-1975
- Khandelwal, P., W. G. Ruiz, E. Balestreire-Hawryluk, O. A. Weisz, J. R. Goldenring in G. Apodaca (2008). Rab11a-dependent exocytosis of discoidal/fusiform vesicles in bladder umbrella cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(41): 15773-15778
- Kim, B. S., C. E. Baez in A. Atala (2000a). Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol*, 18(1): 2-9
- Kim, J. S., J. C. Kim, B. K. Na, J. M. Jeong in C. Y. Song (2000b). Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res*, 70(3): 329-337
- King, A. E., A. Paltoo, R. W. Kelly, J. M. Sallenave, A. D. Bocking in J. R. Challis (2007). Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta*, 28(2-3): 161-169
- King, B. F. (1982). Cell surface specializations and intercellular junctions in human amniotic epithelium: an electron microscopic and freeze-fracture study. *Anat Rec*, 203(1): 73-82
- King, B. F. (1983). The permeability of human amniotic epithelium: studies using lanthanum as a tracer. *Anat Rec*, 207(4): 557-561
- Kiuchi-Saishin, Y., S. Gotoh, M. Furuse, A. Takasuga, Y. Tano in S. Tsukita (2002). Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol*, 13(4): 875-886
- Kobayashi, K., T. Inai, Y. Shibata in M. Yasui (2009). Dynamic changes in amniotic tight junctions during pregnancy. *Placenta*, 30(10): 840-847
- Kobayashi, K., I. Kadohira, M. Tanaka, Y. Yoshimura, K. Ikeda in M. Yasui (2010a). Expression and distribution of tight junction proteins in human amnion during late pregnancy. *Placenta*, 31(2): 158-162
- Kobayashi, K., H. Miwa in M. Yasui (2010b). Inflammatory mediators weaken the amniotic membrane barrier through disruption of tight junctions. *J Physiol*, 588(Pt 24): 4859-4869
- Koizumi, N., N. J. Fullwood, G. Bairaktaris, T. Inatomi, S. Kinoshita in A. J. Quantock (2000a). Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(9): 2506-2513

- Koizumi, N., T. Inatomi, A. J. Quantock, N. J. Fullwood, A. Dota in S. Kinoshita (2000b). Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea*, 19(1): 65-71
- Koizumi, N. J., T. J. Inatomi, C. J. Sotozono, N. J. Fullwood, A. J. Quantock in S. Kinoshita (2000c). Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res*, 20(3): 173-177
- Koster, M. I., S. Kim, A. A. Mills, F. J. DeMayo in D. R. Roop (2004). p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev*, 18(2): 126-131
- Koziak, A., M. Salagierski, A. Marcheluk, R. Szczesniewski in M. Sosnowski (2007). Early experience in reconstruction of long ureteral strictures with allogenic amniotic membrane. *Int J Urol*, 14(7): 607-610
- Kreft, M. E., D. Di Giandomenico, G. V. Beznoussenko, N. Resnik, A. A. Mironov in K. Jezernik (2010). Golgi apparatus fragmentation as a mechanism responsible for uniform delivery of uroplakins to the apical plasma membrane of uroepithelial cells. *Biol Cell*, 102(11): 593-607
- Kreft, M. E., K. Jezernik, M. Kreft in R. Romih (2009a). Apical plasma membrane traffic in superficial cells of bladder urothelium. *Ann N Y Acad Sci*, 1152: 18-29
- Kreft, M. E. in H. Robenek (2012). Freeze-fracture replica immunolabelling reveals urothelial plaques in cultured urothelial cells. *PLoS One*, 7(6): e38509
- Kreft, M. E., R. Romih, M. Kreft in K. Jezernik (2009b). Endocytotic activity of bladder superficial urothelial cells is inversely related to their differentiation stage. *Differentiation*, 77(1): 48-59
- Kreft, M. E., R. Romih in M. Sterle (2002). Antigenic and ultrastructural markers associated with urothelial cytodifferentiation in primary explant outgrowths of mouse bladder. *Cell Biol Int*, 26(1): 63-74
- Kreft, M. E., M. Sterle in K. Jezernik (2006). Distribution of junction- and differentiation-related proteins in urothelial cells at the leading edge of primary explant outgrowths. *Histochem Cell Biol*, 125(5): 475-485
- Kreplak, L., H. Wang, U. Aebi in X. P. Kong (2007). Atomic force microscopy of Mammalian urothelial surface. *J Mol Biol*, 374(2): 365-373
- Krishnamurthy, G., P. N. Shilpa, R. E. Ahmad, S. Sulaiman, C. L. Ng in T. Kamarul (2011). Human amniotic membrane as a chondrocyte carrier vehicle/substrate: in vitro study. *J Biomed Mater Res A*, 99(3): 500-506
- Kruse, F. E., A. M. Jousen, K. Rohrschneider, L. You, B. Sinn, J. Baumann in H. E. Volcker (2000). Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 238(1): 68-75
- Kubo, M., Y. Sonoda, R. Muramatsu in M. Usui (2001). Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(7): 1539-1546
- Lacaz-Vieira, F., M. M. Jaeger, P. Farshori in B. Kachar (1999). Small synthetic peptides homologous to segments of the first external loop of occludin impair tight junction resealing. *J Membr Biol*, 168(3): 289-297
- Lavelle, J., S. Meyers, R. Ramage, S. Bastacky, D. Doty, G. Apodaca in M. L. Zeidel (2002). Bladder permeability barrier: recovery from selective injury of surface epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283(2): F242-253
- Lee, P. H., S. H. Tsai, L. Kuo, C. Y. Hwang, C. Y. Kuo, V. C. Yang in J. K. Chen (2012). A prototype tissue engineered blood vessel using amniotic membrane as scaffold. *Acta Biomater*, 8(9): 3342-3348

- Lee, S. B., D. Q. Li, D. T. Tan, D. C. Meller in S. C. Tseng (2000). Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res*, 20(4): 325-334
- Lefebvre, S., F. Adrian, P. Moreau, L. Gourand, J. Dausset, S. Berrih-Aknin, E. D. Carosella in P. Paul (2000). Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells. *Hum Immunol*, 61(11): 1095-1101
- Lewis, S. A. (2000). Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol*, 278(6): F867-874
- Lewis, S. A. in J. M. Diamond (1976). Na⁺ transport by rabbit urinary bladder, a tight epithelium. *J Membr Biol*, 28(1): 1-40
- Lewis, S. A. in N. K. Wills (1983). Apical membrane permeability and kinetic properties of the sodium pump in rabbit urinary bladder. *J Physiol*, 341: 169-184
- Li, H., J. Y. Niederkorn, S. Neelam, E. Mayhew, R. A. Word, J. P. McCulley in H. Alizadeh (2005). Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(3): 900-907
- Li, W., H. He, C. L. Kuo, Y. Gao, T. Kawakita in S. C. Tseng (2006). Basement membrane dissolution and reassembly by limbal corneal epithelial cells expanded on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(6): 2381-2389
- Lilly, J. D. in C. L. Parsons (1990). Bladder surface glycosaminoglycans is a human epithelial permeability barrier. *Surg Gynecol Obstet*, 171(6): 493-496
- Liu, J., H. Sheha, Y. Fu, L. Liang in S. C. Tseng (2010a). Update on amniotic membrane transplantation. *Expert Rev Ophthalmol*, 5(5): 645-661
- Liu, Z., P. Zhang, Y. Zhou, H. Qin in T. Shen (2010b). Culture of human intestinal epithelial cell using the dissociating enzyme thermolysin and endothelin-3. *Braz J Med Biol Res*, 43(5): 451-459
- Lucien, N., P. Bruneval, F. Lasbennes, M. F. Belair, C. Mandet, J. Cartron, P. Bailly in M. M. Trinh-Trang-Tan (2005). UT-B1 urea transporter is expressed along the urinary and gastrointestinal tracts of the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288(4): R1046-1056
- Magatti, M., S. De Munari, E. Vertua, L. Gibelli, G. S. Wengler in O. Parolini (2008). Human amnion mesenchyme harbors cells with allogeneic T-cell suppression and stimulation capabilities. *Stem Cells*, 26(1): 182-192
- Magatti, M., S. De Munari, E. Vertua, C. Nassauto, A. Albertini, G. S. Wengler in O. Parolini (2009). Amniotic mesenchymal tissue cells inhibit dendritic cell differentiation of peripheral blood and amnion resident monocytes. *Cell Transplant*, 18(8): 899-914
- Magatti, M., S. De Munari, E. Vertua in O. Parolini (2012). Amniotic membrane-derived cells inhibit proliferation of cancer cell lines by inducing cell cycle arrest. *J Cell Mol Med*, 16(9): 2208-2218
- Malak, T. M., C. D. Ockleford, S. C. Bell, R. Dalgleish, N. Bright in J. Macvicar (1993). Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta*, 14(4): 385-406
- Matsubara, S. in T. Tamada (1991). Ultracytochemical study on the permeability of the human amniotic epithelium. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 43(6): 641-646

- McCarthy, K. M., I. B. Skare, M. C. Stankewich, M. Furuse, S. Tsukita, R. A. Rogers, R. D. Lynch in E. E. Schneeberger (1996). Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci*, 109 (Pt 9): 2287-2298
- Meng, H., M. Li, F. You, J. Du in Z. Luo (2011). Assessment of processed human amniotic membrane as a protective barrier in rat model of sciatic nerve injury. *Neurosci Lett*, 496(1): 48-53
- Miki, T., T. Lehmann, H. Cai, D. B. Stolz in S. C. Strom (2005). Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*, 23(10): 1549-1559
- Min, G., G. Zhou, M. Schapira, T. T. Sun in X. P. Kong (2003). Structural basis of urothelial permeability barrier function as revealed by Cryo-EM studies of the 16 nm uroplakin particle. *J Cell Sci*, 116(Pt 20): 4087-4094
- Minsky, B. D. in F. J. Chlapowski (1978). Morphometric analysis of the translocation of luminal membrane between cytoplasm and cell surface of transitional epithelial cells during the expansion-contraction cycles of mammalian urinary bladder. *J Cell Biol*, 77(3): 685-697
- Mizoguchi, M., S. Ikeda, Y. Suga in H. Ogawa (2000). Expression of cytokeratins and cornified cell envelope-associated proteins in umbilical cord epithelium: a comparative study of the umbilical cord, amniotic epithelia and fetal skin. *J Invest Dermatol*, 115(1): 133-134
- Moll, R., T. Achtstatter, E. Becht, J. Balcarova-Stander, M. Ittensohn in W. W. Franke (1988). Cytokeratins in normal and malignant transitional epithelium. Maintenance of expression of urothelial differentiation features in transitional cell carcinomas and bladder carcinoma cell culture lines. *Am J Pathol*, 132(1): 123-144
- Moll, R., M. Divo in L. Langbein (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*, 129(6): 705-733
- Moll, R., D. L. Schiller in W. W. Franke (1990). Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J Cell Biol*, 111(2): 567-580
- Mourao, P. A. (1991). Proteoglycans, glycosaminoglycans and sulfated polysaccharides from connective tissues. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 86 Suppl 3: 13-22
- Murdoch, A. D., G. R. Dodge, I. Cohen, R. S. Tuan in R. V. Iozzo (1992). Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/perlecan). A chimeric molecule with multiple domains homologous to the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J Biol Chem*, 267(12): 8544-8557
- Na, B. K., Ji Hwan Hwang, Jae Chan Kim, Eun Jin Shin, in J. M. J. a. C. Y. S. Jae Soon K i m (1999). Analysis of human amniotic membrane components as proteinase inhibitors for development of therapeutic agent for recalcitrant keratitis. *Trophoblast Research*, 20: 453-466
- Negrete, H. O., J. P. Lavelle, J. Berg, S. A. Lewis in M. L. Zeidel (1996a). Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium. *Am J Physiol*, 271(4 Pt 2): F886-894
- Negrete, H. O., R. L. Rivers, A. H. Goughs, M. Colombini in M. L. Zeidel (1996b). Individual leaflets of a membrane bilayer can independently regulate permeability. *J Biol Chem*, 271(20): 11627-11630
- Niknejad, H., H. Peirovi, M. Jorjani, A. Ahmadiani, J. Ghanavi in A. M. Seifalian (2008). Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater*, 15: 88-99
- Norris, M. A., M. S. Cohen, M. M. Warren, S. N. Becker, P. S. Baur, Jr. in H. M. Seybold (1982). Bladder reconstruction in rabbits with glutaraldehyde-stabilized amniotic membranes. *Urology*, 19(6): 631-635

- North, P. M. in M. B. Segal (1976). A study of the transport and permeability properties of the guinea-pig amniotic membrane. *J Physiol*, 256(1): 245-256
- Oxlund, H., R. Helmig, J. T. Halaburt in N. Ulbjerg (1990). Biomechanical analysis of human chorioamniotic membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 34(3): 247-255
- Parolini, O. in M. Caruso (2011). Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: an update. *Placenta*, 32 Suppl 2: S186-195
- Parsons, C. L., D. Boychuk, S. Jones, R. Hurst in H. Callahan (1990). Bladder surface glycosaminoglycans: an epithelial permeability barrier. *J Urol*, 143(1): 139-142
- Peternel, L., K. Kristan, M. Petrussevska, T. L. Rizner in I. Legen (2012). Suitability of isolated rat jejunum model for demonstration of complete absorption in humans for BCS-based biowaiver request. *J Pharm Sci*, 101(4): 1436-1449
- Powell, D. W. (1981). Barrier function of epithelia. *Am J Physiol*, 241(4): G275-288
- Probst, M., R. Dahiya, S. Carrier in E. A. Tanagho (1997). Reproduction of functional smooth muscle tissue and partial bladder replacement. *Br J Urol*, 79(4): 505-515
- Redondo, P., A. Gimenez de Azcarate, L. Marques, M. Garcia-Guzman, E. Andreu in F. Prosper (2011). Amniotic membrane as a scaffold for melanocyte transplantation in patients with stable vitiligo. *Dermatol Res Pract*, 2011: 532139
- Regauer, S., W. W. Franke in I. Virtanen (1985). Intermediate filament cytoskeleton of amnion epithelium and cultured amnion epithelial cells: expression of epidermal cytokeratins in cells of a simple epithelium. *J Cell Biol*, 100(4): 997-1009
- Resch, M. D., B. E. Resch, E. Csizmazia, L. Imre, J. Nemeth, P. Revesz in E. Csanyi (2010). Permeability of human amniotic membrane to ofloxacin in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(2): 1024-1027
- Rickard, A., N. Dorokhov, J. Ryerse, D. J. Klumpp in J. McHowat (2008). Characterization of tight junction proteins in cultured human urothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 44(7): 261-267
- Romih, R. in K. Jezernik (1994). Endocytosis during postnatal differentiation in superficial cells of the mouse urinary bladder epithelium. *Cell Biol Int*, 18(6): 663-668
- Ross, M. G. (2011). Inflammatory mediators weaken the amniotic membrane barrier through disruption of tight junctions. *J Physiol*, 589(Pt 1): 5
- Rubenwolf, P. in J. Southgate (2011). Permeability of differentiated human urothelium in vitro. *Methods Mol Biol*, 763: 207-222
- Rubenwolf, P. C., N. T. Georgopoulos, L. A. Clements, S. Feather, P. Holland, D. F. Thomas in J. Southgate (2009). Expression and localisation of aquaporin water channels in human urothelium in situ and in vitro. *Eur Urol*, 56(6): 1013-1023
- Rubenwolf, P. C., N. T. Georgopoulos, L. A. Kirkwood, S. C. Baker in J. Southgate (2012). Aquaporin expression contributes to human transurothelial permeability in vitro and is modulated by NaCl. *PLoS One*, 7(9): e45339
- Runic, R., C. J. Lockwood, L. LaChapelle, B. Dipasquale, R. I. Demopoulos, A. Kumar in S. Guller (1998). Apoptosis and Fas expression in human fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(2): 660-666

- Sakuragawa, N., J. Tohyama in H. Yamamoto (1995). Immunostaining of human amniotic epithelial cells: possible use as a transgene carrier in gene therapy for inborn errors of metabolism. *Cell Transplant*, 4(3): 343-346
- Sakuragawa, N., H. Yoshikawa in M. Sasaki (1992). Amniotic tissue transplantation: clinical and biochemical evaluations for some lysosomal storage diseases. *Brain Dev*, 14(1): 7-11
- Samandari, M. H., M. Yaghmaei, M. Ejlali, M. Moshref in A. S. Saffar (2004). Use of amnion as a graft material in vestibuloplasty: a preliminary report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 97(5): 574-578
- Sant'Anna, L. B., A. Cargnoni, L. Ressel, G. Vanosi in O. Parolini (2011). Amniotic membrane application reduces liver fibrosis in a bile duct ligation rat model. *Cell Transplant*, 20(3): 441-453
- Sartoneva, R., S. Haimi, S. Miettinen, B. Mannerstrom, A. M. Haaparanta, G. K. Sandor, M. Kellomaki, R. Suuronen in T. Lahdes-Vasama (2011). Comparison of a poly-L-lactide-co-epsilon-caprolactone and human amniotic membrane for urothelium tissue engineering applications. *J R Soc Interface*, 8(58): 671-677
- Scaggiante, B., A. Pineschi, M. Sustersich, M. Andolina, E. Agosti in D. Romeo (1987). Successful therapy of Niemann-Pick disease by implantation of human amniotic membrane. *Transplantation*, 44(1): 59-61
- Senoo, M., F. Pinto, C. P. Crum in F. McKeon (2007). p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell*, 129(3): 523-536
- Shakeri, S., A. Haghpanah, A. Khezri, M. Yazdani, A. Monabbati, S. Haghpanah, L. Malekmakan in S. Ayrempour (2009). Application of amniotic membrane as xenograft for urethroplasty in rabbit. *Int Urol Nephrol*, 41(4): 895-901
- Shao, C., J. Sima, S. X. Zhang, J. Jin, P. Reinach, Z. Wang in J. X. Ma (2004). Suppression of corneal neovascularization by PEDF release from human amniotic membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(6): 1758-1762
- Sharifiaghdas, F., N. Hamzehiesfahani, R. Moghadasali, F. Ghaemimanesh in H. Baharvand (2007). Human amniotic membrane as a suitable matrix for growth of mouse urothelial cells in comparison with human peritoneal and omentum membranes. *Urol J*, 4(2): 71-78
- Shengbiao, W., F. Amidi, Y. Shengli, M. Beall in M. G. Ross (2007). Cyclic adenosine monophosphate regulation of aquaporin gene expression in human amnion epithelia. *Reprod Sci*, 14(3): 234-240
- Smith, P. R., S. A. Mackler, P. C. Weiser, D. R. Brooker, Y. J. Ahn, B. J. Harte, K. A. McNulty in T. R. Kleyman (1998). Expression and localization of epithelial sodium channel in mammalian urinary bladder. *Am J Physiol*, 274(1 Pt 2): F91-96
- Solomon, A., M. Rosenblatt, D. Monroy, Z. Ji, S. C. Pflugfelder in S. C. Tseng (2001). Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol*, 85(4): 444-449
- Southgate, J., P. Harnden in L. K. Trejdosiewicz (1999). Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications. *Histol Histopathol*, 14(2): 657-664
- Southgate, J., K. A. Hutton, D. F. Thomas in L. K. Trejdosiewicz (1994). Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification. *Lab Invest*, 71(4): 583-594

- Spector, D. A., J. B. Wade, R. Dillow, D. A. Steplock in E. J. Weinman (2002). Expression, localization, and regulation of aquaporin-1 to -3 in rat urothelia. *Am J Physiol Renal Physiol*, 282(6): F1034-1042
- Spector, D. A., Q. Yang, L. Klopouh, J. Deng, E. J. Weinman, D. A. Steplock, R. Biswas, M. F. Brazie, J. Liu in J. B. Wade (2008). The ROMK potassium channel is present in mammalian urinary tract epithelia and muscle. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295(6): F1658-1665
- Spector, D. A., Q. Yang, J. Liu in J. B. Wade (2004). Expression, localization, and regulation of urea transporter B in rat urothelia. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287(1): F102-108
- Spector, D. A., Q. Yang in J. B. Wade (2007). High urea and creatinine concentrations and urea transporter B in mammalian urinary tract tissues. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292(1): F467-474
- Stahelin, L. A., F. J. Chlapowski in M. A. Bonneville (1972). Luminal plasma membrane of the urinary bladder. I. Three-dimensional reconstruction from freeze-etch images. *J Cell Biol*, 53(1): 73-91
- Stubbs, C. D., B. Ketterer in R. M. Hicks (1979). The isolation and analysis of the luminal plasma membrane of calf urinary bladder epithelium. *Biochim Biophys Acta*, 558(1): 58-72
- Subramaniam, R., J. Hinley, J. Stahlschmidt in J. Southgate (2011). Tissue engineering potential of urothelial cells from diseased bladders. *J Urol*, 186(5): 2014-2020
- Szekeres-Bartho, J. (2002). Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol*, 21(6): 471-495
- Talmi, Y. P., L. Sigler, E. Inge, Y. Finkelstein in Y. Zohar (1991). Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta*, 12(3): 285-288
- Tamagawa, T., I. Ishiwata in S. Saito (2004). Establishment and characterization of a pluripotent stem cell line derived from human amniotic membranes and initiation of germ layers in vitro. *Hum Cell*, 17(3): 125-130
- Thomasen, H., M. Pauklin, B. Noelle, G. Geerling, J. Vetter, P. Steven, K. P. Steuhl in D. Meller (2011). The effect of long-term storage on the biological and histological properties of cryopreserved amniotic membrane. *Curr Eye Res*, 36(3): 247-255
- Toda, A., M. Okabe, T. Yoshida in T. Nikaido (2007). The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci*, 105(3): 215-228
- Truschel, S. T., E. Wang, W. G. Ruiz, S. M. Leung, R. Rojas, J. Lavelle, M. Zeidel, D. Stoffer in G. Apodaca (2002). Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell*, 13(3): 830-846
- Tseng, S. C., D. Q. Li in X. Ma (1999). Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol*, 179(3): 325-335
- Tsukita, S. in M. Furuse (1999). Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol*, 9(7): 268-273
- Tsukita, S., M. Furuse in M. Itoh (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(4): 285-293
- Turner, A. M., R. Subramaniam, D. F. Thomas in J. Southgate (2008). Generation of a functional, differentiated porcine urothelial tissue in vitro. *Eur Urol*, 54(6): 1423-1432

- Van Itallie, C. M. in J. M. Anderson (2004). The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology* (Bethesda), 19: 331-338
- Varley, C. L., M. A. Garthwaite, W. Cross, J. Hinley, L. K. Trejdosiewicz in J. Southgate (2006). PPARgamma-regulated tight junction development during human urothelial cytodifferentiation. *J Cell Physiol*, 208(2): 407-417
- Veranic, P. in K. Jezernik (2002). Trajectorial organisation of cytokeratins within the subapical region of umbrella cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 53(4): 317-325
- Vercelli, A., M. Repici, D. Garbossa in A. Grimaldi (2000). Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Res Bull*, 51(1): 11-28
- Vergara, J., F. Zambrano, J. D. Robertson in H. Elrod (1974). Isolation and characterization of luminal membranes from urinary bladder. *J Cell Biol*, 61(1): 83-94
- Visnjar, T., P. Kocbek in M. E. Kreft (2012). Hyperplasia as a mechanism for rapid resealing urothelial injuries and maintaining high transepithelial resistance. *Histochem Cell Biol*, 137(2): 177-186
- Wang, E., S. Truschel in G. Apodaca (2003a). Analysis of hydrostatic pressure-induced changes in umbrella cell surface area. *Methods*, 30(3): 207-217
- Wang, E. C., J. M. Lee, J. P. Johnson, T. R. Kleyman, R. Bridges in G. Apodaca (2003b). Hydrostatic pressure-regulated ion transport in bladder uroepithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285(4): F651-663
- Wang, S., F. Amidi, M. Beall, L. Gui in M. G. Ross (2006). Aquaporin 3 expression in human fetal membranes and its up-regulation by cyclic adenosine monophosphate in amnion epithelial cell culture. *J Soc Gynecol Investig*, 13(3): 181-185
- Wilshaw, S. P., J. N. Kearney, J. Fisher in E. Ingham (2006). Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Eng*, 12(8): 2117-2129
- Wolbank, S., A. Peterbauer, M. Fahrner, S. Hennerbichler, M. van Griensven, G. Stadler, H. Redl in C. Gabriel (2007). Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng*, 13(6): 1173-1183
- Yang, S., K. F. Leong, Z. Du in C. K. Chua (2001). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng*, 7(6): 679-689
- Yu, A. S., A. H. Enck, W. I. Lencer in E. E. Schneeberger (2003). Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. *J Biol Chem*, 278(19): 17350-17359
- Yu, W., P. Khandelwal in G. Apodaca (2009). Distinct apical and basolateral membrane requirements for stretch-induced membrane traffic at the apical surface of bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell*, 20(1): 282-295
- Yung, S. in T. M. Chan (2007). Glycosaminoglycans and proteoglycans: overlooked entities? *Perit Dial Int*, 27 Suppl 2: S104-109
- Zani, D., C. Simeone, N. Arrighi, A. Antonelli, A. Moroni, M. Ferrari in S. C. Cunico (2009). Tissue engineering in urinary bladder: morphological and functional characterization. *Arch Ital Urol Androl*, 81(1): 17-20

ZAHVALA

Najprej bi se rada posebej zahvalila mentorici prof. dr. Mateji Erdani Kreft, ki mi je omogočila opravljanje diplomskega dela na Inštitutu za biologijo celice. Iskreno se ji zahvaljujem za nasvete in razlage ob nastajanju diplomskega dela, vse popravke tekom pisanja, predvsem pa za prijaznost, razumevanje in čas, ki ga je vedno našla.

Zahvala gre tudi Tanji Višnjari in Urški Dragin Jerman za uvajanje v laboratorijsko delo in vse spodbudne besede. Prav tako gre zahvala asist.dr. Samu Hudoklinu za vso pomoč in nasvete tehnične narave.

Zahvaljujem se dr. Katji Kristan za vso pomoč pri analizi permeabilnosti.

Hvala tudi Nadi Pavlici Dubarič, Sanji Čebraja, Lindi Štrus in Sabini Železnik za vso pomoč v laboratoriju, kot tudi sproščeno vzdušje.

Najlepša hvala recenzentki prof. dr. Jasni Štrus za temeljit pregled diplomskega dela in koristne pripombe. Prav tako hvala prof. dr. Roku Kostanjšku za hiter pregled diplomskega dela.

Nenazadnje hvala vsem, ki so mi stali ob strani tekom študija in diplome.