

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Urška DRAGIN

**AMNIJSKA MEMBRANA KOT NOSILEC UROTELIJA IN NJENA
VLOGA PRI DIFERENCIACIJI UROTELIJSKIH CELIC**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**AMNIOTIC MEMBRANE AS A SCAFFOLD FOR UROTHELIUM AND
ITS ROLE IN DIFFERENTIATION OF UROTHELIAL CELLS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, september 2010

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

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Matejo Erdani Kreft z Inštituta za biologijo celice.

Komisija za oceno in zagovor

Predsednica: prof. dr. Jasna ŠTRUS

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Boris BULOG

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Mateja ERDANI KREFT

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

Datum zagovora: 7. 9. 2010

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.

Urška Dragin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	576.35: 612.015.3 (043.2) = 163.6
KD	amnijska membrana/urotelij/tkivno inženirstvo/nosilec/diferenciacija
AV	DRAGIN, Urška
SA	ERDANI KREFT, Mateja (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2010
IN	AMIJSKA MEMBRANA KOT NOSILEC UROTELIJA IN NJENA VLOGA PRI DIFERENCIACIJI UROTELIJSKIH CELIC
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 95 str., 1 pregl., 18 sl., 11 pril., 122 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Amnijska membrana ima številne biološke in mehanske lastnosti, ki so za tkivno inženirstvo izrednega pomena. Amnijsko membrano smo kot nosilec za urotelijske celice uporabili na tri načine. Urotelijske celice smo nasadili na (1.) intaktno in (2.) golo amnijsko membrano ali na (3.) vezivno tkivo intaktne amnijske membrane. Da bi ugotovili, ali amnijska membrana z eksokrinim delovanjem vpliva na rast in diferenciacijo urotelijskih celic, smo v medij pod sintetične nosilce, na katere smo nasadili urotelijske celice, položili intaktno amnijsko membrano. Celice smo gojili tri in sedem tednov. V vseh treh primerih uporabe amnijske membrane kot nosilca smo vzpostavili urotelij iz bazalnih, vmesnih in površinskih urotelijskih celic. Površinske urotelijske celice so najvišjo stopnjo diferenciacije dosegle, ko so rasle na vezivnem tkivu intaktne amnijske membrane. Ugotovili smo, da v medij dodana amnijska membrana inducira diferenciacijo urotelijskih celic. Po treh tednih so bile namreč površinske urotelijske celice pod vplivom amnijske membrane bolj diferencirane kot celice, ki so rasle na sintetičnih nosilcih brez vpliva amnijske membrane. V preučevanih in vitro modelih se je površina celic z uroplakini po sedmih tednih gojenja še povečala, medtem ko se je intenziteta fluorescence uroplakinov zmanjšala zaradi prerazporejanja veziklov z uroplakini. Meritve transepitelijske upornosti so pokazale, da urotelijske celice v vzpostavljenih in vitro modelih tvorijo tesen epitelij. Z diplomskim delom smo dokazali, da je amnijska membrana primeren nosilec za urotelijske celice, saj omogoča poleg uspešnega pritrjevanja celic tudi njihovo neovirano razrast in diferenciacijo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC 576.35: 612.015.3 (043.2) = 163.6

CX amniotic membrane/urothelium/tissue engineering/scaffold/differentiation

AU DRAGIN, Urška

AA ERDANI KREFT, Mateja (mentor)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2010

TI AMNIOTIC MEMBRANE AS A SCAFFOLD FOR UROTHELIUM AND ITS
ROLE IN DIFFERENTIATION OF UROTHELIAL CELLS

DT Graduation thesis (University studies)

NO XIII, 95 p., 1 tab., 18 fig., 11 ann., 122 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Amniotic membrane possesses numerous biological and mechanical properties of great importance for tissue engineering. As scaffold, amniotic membrane was used in three different ways. Urothelial cells were seeded (1.) on an intact amniotic membrane, (2.) on a denuded amniotic membrane, and (3.) on amniotic membrane stroma. In order to determine whether the amniotic membrane induces growth and differentiation of urothelial cells, an intact amniotic membrane was placed under the synthetic scaffolds in the medium, on which urothelial cells had been seeded. The cells were cultivated for three and seven weeks. In all three cases where the amniotic membrane served as a scaffold, urothelium composed of basal, intermediate and superficial cells could be established. Superficial urothelial cells reached the highest stage of differentiation when seeded on amniotic membrane stroma. After three weeks of cultivation, the superficial urothelial cells grown under the influence of amniotic membrane reached a higher stage of differentiation than the cells grown on synthetic scaffolds without the influence of amniotic membrane. In the studied *in vitro* models, the surface of urothelial cells with uroplakins increased after seven weeks of cultivation, while the fluorescence intensity of the uroplakins decreased due to the redistribution of vesicles with uroplakins. Measurements of transepithelial resistance proved that urothelial cells in established *in vitro* models form a tight epithelium. We conclude that the amniotic membrane is a suitable scaffold for the urothelial cells as it ensures unhindered growth and differentiation of superficial urothelial cells.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO SHEM	X
KAZALO GRAFOV	X
KAZALO PRILOG.....	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJI DIPLOMSKEGA DELA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 TKIVNO INŽENIRSTVO	3
2.2 RAZVOJ IZVENEMBRIONALNIH MEMBRAN.....	4
2.3 ZGRADBA AMNIJSKE MEMBRANE.....	4
2.5 AMNIJSKE EPITELIJSKE CELICE SPROŠČAJO RASTNE FAKTORJE	7
2.6 AMNIJSKA MEMBRANA KOT NOSILEC	8
2.6.1 LASTNOSTI, ZARADI KATERIH JE AMNIJSKA MEMBRANA PRIMERNA KOT NOSILEC.....	8
2.6.2 UPORABA INTAKTNE ALI GOLE AMNIJSKE MEMBRANE	11
2.6.3 AMNIJSKA MEMBRANA KOT NOSILEC RAZLIČNIH CELIČNIH KULTUR	13
2.7 PRIDOBIVANJE IN SHRANJEVANJE AMNIJSKE MEMBRANE	14
2.8 SEČNI MEHUR SESALCEV	15
2.8.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI UROTELIJA SESALCEV	15
2.8.2 DIFERENCIACIJA UROTELIJSKIH CELIC	19
2.8.3 TRANSEPITELIJSKA UPORNOST UROTELIJA	20

3 METODE DELA.....	21
3.1 PRIPRAVA IN ODMRZOVANJE AMNIJSKE MEMBRANE.....	21
3.2 DEEPITELIZACIJA AMNIJSKE MEMBRANE S TERMOLIZINOM	22
3.3 ODMRZOVANJE IN NASAJANJE PRAŠIČJIH UROTELIJSKIH CELIC.....	22
3.4 HRANILNI MEDIJ	26
3.5 PRIPRAVA PREPARATOV ZA ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO.....	26
3.5.1 PRIPRAVA VZORCEV ZA PRESEVNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP	27
3.5.2 PRIPRAVA VZORCEV ZA VRSTIČNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP	28
3.6 PRIPRAVA PARAFINSKIH VZORCEV	28
3.7 IMUNOFLUORESCENTNO OZNAČEVANJE PROTEINOV	29
3.7.1 OZNAČEVANJE KROMATINA S FLUORESCENTNIM BARVILOM DAPI..	29
3.7.2 IMUNOFLUPRESCENTNO OZNAČEVANJE AMNIJSKIH EPITELIJSKIH CELIC.....	30
3.7.2.1 Imunofluorescenca proteina tesnih stikov – okludina	30
3.7.2.2 Imunofluorescenca proteina dezmosomov – dezmozoplakina	30
3.7.3 IMUNOFLUORESCENTNO OZNAČEVANJE UROTELIJSKIH CELIC.....	31
3.7.3.1 Imunofluorescenca proteina tesnih stikov – okludina	31
3.7.3.2 Imunofluorescenca uroplakinov	31
3.8 ANALIZA FLUORESCENCE SLIK PRAŠIČJIH UROTELIJSKIH CELIC.....	32
3.8.1 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI UROPLAKINOV NA POVRŠINI PRAŠIČJIH UROTELIJSKIH CELIC.....	32
3.8.2 UGOTAVLJANJE INTENZITETE FLUORESCENCE UROPLAKINOV.....	32
3.8.3 UGOTAVLJANJE RAZPOREDITVE UROPLAKINOV PO Z-OSI.....	33
3.9 MERJENJE TRANSEPITELIJSKE UPORNOSTI.....	33
4 REZULTATI.....	35
4.1 ULTRASTRUKTURNE ZNAČILNOSTI AMNIJSKE MEMBRANE.....	35
4.2 IMUNOFLUORESCENTNO OZNAČEVANJE STIČNIH PROTEINOV AMNIJSKE MEMBRANE	37
4.3 DEEPITELIZACIJA AMNIJSKE MEMBRANE.....	37

4.4 CELIČNE KULTURE	38
4.4.1 UROTELIJSKE CELICE, NASAJENE NA SINTETIČNI NOSILEC	38
4.4.2 UROTELIJSKE CELICE, NASAJENE NA INTAKTNO N GOLO AMNIJSKO MEMBRANO	39
4.4.3 UROTELIJSKE CELICE, NASAJENE NA VEZIVNO TKIVO AMNIJSKE MEMBRANE.....	40
4.5 ULTRASTRUKTURNE ZNAČILNOSTI PRAŠIČJIH UROTELIJSKIH CELIC, NASAJENIH NA RAZLIČNE NOSILCE	41
4.5.1 UROTELIJSKE CELICE, NASAJENE NA SINTETIČNI NOSILEC	41
4.5.2 UROTELIJSKE CELICE, NASAJENE NA INTAKTNO IN GOLO AMNIJSKO MEMBRANO	44
4.5.3 UROTELIJSKE CELICE, NASAJENE NA VEZIVNO TKIVO AMNIJSKE MEMBRANE	47
4.6 IMUNOFLUORESCENTNO OZNAČEVANJE UROPLAKINOV IN OKLUDINA ..	52
4.6.1 IMUNOFLUORESCENCA UROPLAKINOV	52
4.6.2 POVRŠINA CELIC Z IZRAŽENIMI UROPLAKINI JE ODVISNA OD NOSILCA.....	54
4.6.3 INTENZITETA FLUORESCENCE UROPLAKINOV.....	58
4.6.4 RAZPOREDITEV UROPLAKINOV PO Z-OSI	62
4.6.5 IMUNOFLUORESCENCA OKLUDINA, PROTEINA TESNIH STIKOV	64
4.7 TRANSEPITELIJSKA UPORNOST	66
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	68
5.1 RAZPRAVA	68
5.1.1 AMNIJSKA MEMBRANA TUDI PO SHRANJEVANJU PRI - 80 °C OHRANI ZNAČILNO STRUKTURO	69
5.1.2 AMNIJSKA MEMBRANA JE PRIMEREN NOSILEC ZA UROTELIJ.....	70
5.1.2.1 Urotelijske celice se najhitreje razraščajo na vezivnem tkivu amnijske membrane.....	71
5.1.2.2 Površinske urotelijske celice se najbolj diferencirajo na vezivnem tkivu amnijske membrane.....	73

5.1.2.3 Površinske urotelijske celice na intaktni amnijski membrani dosežejo po treh tednih gojenja višjo stopnjo diferenciacije kot celice na goli amnijski membrani	75
5.1.3 AMNIJSKA MEMBRANA Z EKSOKRINIM DELOVANJEM VPLIVA NA DIFERENCIACIJO UROTELIJSKIH CELIC.....	76
5.1.4 POVRŠINA CELIC Z IZRAŽENIMI UROPLAKINI SE PO DALJŠEM ČASU GOJENJA UROTELIJSKIH CELIC POVEČA, INTENZITETA FLUORESCENCE UROPLAKINOV PA ZMANJŠA	78
5.1.5 MED POVRŠINSKIMI CELICAMI SO RAZVITI FUNKCIONALNI TESNI STIKI.....	79
5.1.6 UPORABA AMNIJSKE MEMBRANE V REGENERATIVNI MEDICINI SEČNEGA MEHURJA.....	80
5.2 SKLEPI.....	82
6 POVZETEK	83
7 LITERATURA.....	85

KAZALO SLIK

Slika 1: Prašičji urotelij je prehoden epitelij, zgrajen iz več skladov celic	17
Slika 2: Različne podlage za nasajanje celic	24
Slika 3: Epitelijski voltmeter s pripadajočim parom elektrod	34
Slika 4: Površina poligonalno oblikovanih AEC..	35
Slika 5: Ultrastrukturna zgradba AEC.....	36
Slika 6: Imunofluorescentno označena dezmozoplakin in okludin.	37
Slika 7: Odstranjevanje AEC s ternolizinom	38
Slika 8: Celične kulture, nasajene na različne podlage.	40
Slika 9: Površinske urotelijske celice, nasajene na sintetične nosilce, po treh in sedmih tednih gojenja.	42
Slika 10: Ultrastrukturna zgradba površinskih urotelijskih celic, nasajenih na sintetične nosilce, po treh tednih gojenja.	44
Slika 11: Površinske urotelijske celice, nasajene na intaktno in golo amnijsko membrano. ..	46
Slika 12: Ultrastrukturna zgradba površinskih urotelijskih celic, nasajenih na intaktno in golo amnijsko membrano	47
Slika 13: Urotelijske celice, nasajene na vezivno tkivo amnijske membrane, po treh tednih gojenja	48
Slika 14: Površinske urotelijske celice, nasajene na vezivno tkivo amnijske membrane, po treh in sedmih tednih gojenja pri različnih povečavah.....	49
Slika 15: Ultrastrukturna zgradba površinskih urotelijskih celic, nasajenih na vezivno tkivo amnijske membrane, po treh in sedmih tednih gojenja	51
Slika 16: Imunofluorescenca uroplakinov	53
Slika 17: Primerjava površine celic z izraženimi uroplakini, nasajenih na različne podlage, po treh in sedmih tednih.	57

Slika 18: Imunofluorescenca okludina 65

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava hranilnega medija, prilagojenega za gojenje urotelijskih celic 26

KAZALO SHEM

Shema 1: Shematski prikaz razvoja tkivnega nadomestka in vitro..... 3

Shema 2: Shematski prikaz zgradbe dveh plodovih ovojníc, amniona in horiona 7

Shema 3: Shematski prikaz poskusov 25

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Povprečna površina celic z uroplakini, glede na nosilce, po treh tednih gojenja 55

Graf 2: Povprečna površina celic z uroplakini po treh in sedmih tednih gojenja celičnih kultur..... 58

Graf 3: Povprečna intenziteta fluorescence uroplakinov po treh tednih gojenja..... 60

Graf 4: Povprečna intenziteta fluorescence uroplakinov po treh in sedmih tednih gojenja celičnih kultur 61

Graf 5: Razporeditev uroplakinov po z-osi v urotelijskih celicah, nasajenih na različne nosilce, po treh in sedmih tednih gojenja.. 63

Graf 6: Razporeditev uroplakinov po z-osi v urotelijskih celicah, nasajenih na intaktno in golo amnijsko membrano, po treh tednih gojenja..... 64

Graf 7: Primerjava TER prašičjih urotelijskih celic, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane, s celicami, ki so rasle na kontrolnih poroznih membranah 67

KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Povprečna površina celic z uroplakini, glede na nosilce, po treh tednih gojenja v μm^2
- Priloga B:** Povprečna površina celic z uroplakini, glede na nosilce, po sedmih tednih gojenja v μm^2
- Priloga C:** Povprečna površina celic z uroplakini, glede na nosilce, po treh tednih gojenja v %.
- Priloga D:** Povprečna površina celic z uroplakini, glede na nosilce, po sedmih tednih gojenja v %.
- Priloga E:** Povprečna intenziteta fluorescence uroplakinov, glede na nosilce, po treh tednih gojenja.
- Priloga F:** Povprečna intenziteta fluorescence uroplakinov, glede na nosilce, po sedmih tednih gojenja.
- Priloga G:** Razporeditev uroplakinov po z-osi v tri tedne starih urotelijskih celicah, nasajenih na različne nosilce.
- Priloga H:** Razporeditev uroplakinov po z-osi v sedem tednov starih urotelijskih celicah, nasajenih na različne nosilce.
- Priloga I:** Razporeditev uroplakinov po z-osi v tri tedne starih urotelijskih celicah, nasajenih na intaktno in golo amnijsko membrano.
- Priloga J:** Meritve TER urotelijskih celičnih kultur, nasajenih na kontrolne membrane.
- Priloga K:** Meritve TER urotelijskih celičnih kultur, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AEC	amnijske epiteljske celice
A-DMEM	kemijsko definiran hranilni medij (angl. <i>Advance – Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>)
AM	amnijska membrana
AMsp	amnijska membrana v mediju pod porozno membrano
a.e.	arbitrarna enota intenzitete fluorescence
AUM	asimetrično odebeljena plazmalema (angl. <i>Asymmetric Unit Membrane</i>)
bFGF	rastni faktor fibroblastov (angl. <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>)
CRRY	protein CRRY (angl. <i>Complement Receptor Related Gene Y</i>)
DAPI	fluorescentno barvilo, ki obarva kromatin (4,6-diamine-2-phenylindole dihydrochloride)
DFV	vezikli diskoidalne in fuziformne oblike (angl. <i>Discoidal or Fusiform-shaped Vesicles</i>)
DMSO	dimetilsulfoksid
EDTA	kelator dvovalentnih (kovinskih) ionov etilendiaminotetraocetna kislina
EGF	epidermalni rastni faktor (angl. <i>Epidermal Growth Factor</i>)
ELISA	encimskoimunski test (angl. <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
FBS	fetalni goveji serum
GA	Golgijev aparat
HGF	hepatocitni rastni faktor (angl. <i>Hepatocyte Growth Factor</i>)
HGFR	receptor za hepatocitni rastni faktor (angl. <i>Hepatocyte Growth Factor Receptor</i>)
HLA	humani levkocitni antigeni, antigeni poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (angl. <i>Human Leukocyte Antigen</i>)
KGF	keratinocitni rastni faktor (angl. <i>Keratinocyte Growth Factor</i>)
KGFR	receptor za keratinocitni rastni faktor (angl. <i>Keratinocyte Growth Factor Receptor</i>)

MCDB153	kemijsko definiran medij
MHC	poglaviti histokompatibilnostni kompleks (angl. <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
N	velikost vzorca
PBS	fosfatni pufer
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>)
TER	transepitelijska upornost (angl. <i>TransEpithelium Resistance</i>)
TGF- α	transformirajoči rastni faktor alfa (angl. <i>Transforming Growth Factor alpha</i>)
TGF- β 1, 2, 3	transformirajoči rastni faktor beta 1, 2, 3 (angl. <i>Transforming Growth Factor beta 1, 2, 3</i>)
TL	proteolitični encim termolizin
UP	uroplakini (Ia, Ib, II, III), proteini asimetrično odebeljene membrane
ZO-1	znotrajcelični pritrjevalni protein tesnega stika

1 UVOD

Amnijska membrana ima zaradi primarne naloge, da štiti razvijajoči se plod pred izsušitvijo in zagotavlja primerno okolje za njegov razvoj, številne biološke in mehanske lastnosti, ki ji dajejo velike možnosti za uporabo v tkivnem inženirstvu. Lastnosti, zaradi katerih je amnijska membrana primerna kot tkivni nosilec, so, poleg nizke imunogenosti in antimikrobnega delovanja, tudi zaviranje vnetne reakcije, preprečevanje brazgotinjenja tkiva ter primerne mehanske lastnosti, ki so nujne za dober nosilec v tkivnem inženirstvu. Amnijsko membrano se kot nosilec lahko uporablja z epitelijem (intaktna amnijska membrana) ali brez njega (gola amnijska membrana). Prisotnost epitelijske amnijske membrane je pomembna predvsem zaradi različnih rastnih faktorjev, ki jih te celice izločajo. Mnogi pa menijo, da epiteljske celice ovirajo enakomerno razrast tkivnih nadomestkov in zmanjšajo možnost tvorbe hemidezmosomov, ki so pomembni za pritrjanje celic na bazalno lamino.

O uporabi amnijske membrane, kjer se celice, namesto na epitelij ali na bazalno lamino amnijske membrane, nasadi na vezivno tkivo amnijske membrane, je malo podatkov. Vezivno tkivo amnijske membrane predstavlja zaradi visoke vsebnosti kolagenov, glikoproteinov in proteoglikanov obetaven tkivni nosilec.

Namen našega dela je bil ugotoviti, ali je amnijska membrana primeren nosilec za urotelij in preučiti vpliv amnijske membrane na diferenciacijo urotelijskih celic.

1.1 CILJI DIPLOMSKEGA DELA

1. Ugotoviti, ali je humana amnijska membrana primeren nosilec za prašičje urotelijske celice.
2. Na podlagi dosežene stopnje diferenciacije urotelijskih celic preučiti, ali v medij pod porozno membrano dodana intaktna amnijska membrana vpliva na diferenciacijo urotelijskih celic.

3. Primerjati rast in diferenciacijo urotelijskih celičnih kultur, nasajenih na sintetične nosilce (porozne membrane), s tistimi, nasajenimi na amnijsko membrano. Stopnjo diferenciacije ovrednotiti z opisi ultrastrukturnih značilnosti celic in analizo imunofluorescenčnega označevanja specifičnih diferenciacijskih označevalcev.

4. Na podlagi hitrosti rasti ter dosežene diferenciacije urotelijskih celičnih kultur določiti, ali je kot nosilec urotelija ustrežnejša intaktna ali gola amnijska membrana ali vezivno tkivo intaktne amnijske membrane.

5. Z merjenjem transepitelijske upornosti (TER) določiti funkcionalnost urotelijske pregrade in primerjati TER med urotelijskimi celicami, nasajenimi na porozne membrane z ali brez amnijske membrane v mediju pod njimi.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

1. Amnijska membrana je primeren nosilec za rast in diferenciacijo prašičjega urotelija.

2. Urotelijske celice, nasajene na amnijsko membrano, dosežejo višjo stopnjo diferenciacije kot celice, nasajene na sintetične nosilce.

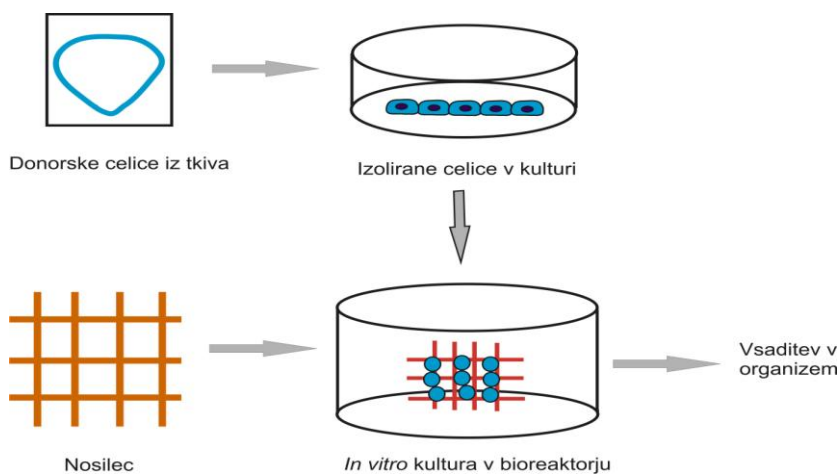
3. Gola amnijska membrana je kot nosilec urotelija ustrežnejša v primerjavi z intaktno amnijsko membrano ter vezivnim tkivom intaktne amnijske membrane.

4. Urotelijske celice, ki rastejo pod vplivom amnijske membrane, tvorijo urotelij z višjo TER kot urotelijske celice, ki rastejo v mediju brez amnijske membrane.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TKIVNO INŽENIRSTVO

Tkivno inženirstvo je interdisciplinarno razvojno-raziskovalno področje, ki za razvoj tkivnih ali organskih nadomestkov uporablja tako biološka kot inženirska načela. V zadnjem času postaja vse bolj pomembna oblika regenerativne medicine, saj terapevtski izdelki tkivnega inženirstva ponujajo možnosti za učinkovito zdravljenje ali obnovo poškodovanih ali okvarjenih tkiv. Razvoj kompleksnih tridimenzionalnih struktur *in vitro*, ki jih lahko uporabimo za obnovo, vzdrževanje ali izboljšanje nekaterih funkcij tkiv ali organov, so omogočila predvsem najnovejša znanstvena spoznanja in dosežki v celični in molekularni biologiji, fiziologiji, imunologiji, biokemiji, kirurgiji in tehnologiji polimerov. Vodilo tkivnega inženirstva je zagotoviti rast in diferenciacijo tkivno specifičnih celic na različno oblikovanih nosilcih iz biološko skladnih (biokompatibilnih) in biološko razgradljivih (biodegradabilnih) materialov (Shema 1). Prav biomateriali so za rast in diferenciacijo tkivno specifičnih celic ključnega pomena. Izbira biomaterialov je velika, kljub temu pa jih lahko razdelimo v tri večje skupine: na biomaterialne naravnega izvora (npr. kolagen ali amnijska membrana), na brezcelična tkiva (npr. acelularna submukoza tankega črevesa) in na sintetične polimere (npr. poliglikolna kislina) (Kim, 2000).



Shema 1: Shematski prikaz razvoja tkivnega nadomestka *in vitro*.

2.2 RAZVOJ IZVENEMBRIONALNIH MEMBRAN

Po oploditvi se iz ženske jajčne celice razvije zigota. Z njeno delitvijo nastane morula (16-32 celični stadij), ki se nadalje razvije v blastocisto - skupek celic, ki obdajajo centralno, s tekočino zapolnjeno, votlino, blastocel (Cör s sod., 2006). V stadiju blastociste so celice razdeljene v dve skupini: na celice, ki bodo zgradile posteljico (zunanja celična masa ali trofoblast), in na celice notranje mase, ki bodo zgradile celoten organizem. Znotrajcelično maso blastociste nadalje delimo na epiblast, iz katerega se razvije embrio, ter hipoblast, katerega celice z notranje strani obdajo blastocel in se razvijejo v endoderm rumenjake vrečke (Bizjak Mali, 2005). Pred začetkom gastrulacije (osmi dan razvoja) se z vrha epiblasta oddeli skupina celic, ki tvori amnion (Bizjak Mali, 2005). Amnijsko votlino obdajajo amnioblasti (Petrovič, 2003), iz katerih se razvije epitelij amnijske membrane, ki je ektodermalnega izvora (Toda s sod., 2007). Med procesom gastrulacije se razvije še mezenhim amniona, ki ga tvori somatični mezoderm. Amnijsko membrano in horion, najbolj zunanjo membrano, ki ovija zarodek, gradi na površini ektoderm, pod njim pa somatični mezoderm.

2.3 ZGRADBA AMNIJSKE MEMBRANE

Amnijska membrana je izvenembrionalna membrana (plodova ovojnica), ki obdaja s plodovnico napolnjeno amnijsko votlino, v kateri plava plod. V evoluciji je ključno prispevala k razvoju kopenskih vretenčarjev – amniotov (plazilcev, ptičev in sesalcev), saj omogoča razvoj, neodvisen od vodnega okolja. Njena osnovna naloga je zaščita ploda pred izsušitvijo in zagotavljanje okolja, v katerem se le-ta lahko razvija brez prekomernih vplivov iz okolice (Toda s sod., 2007).

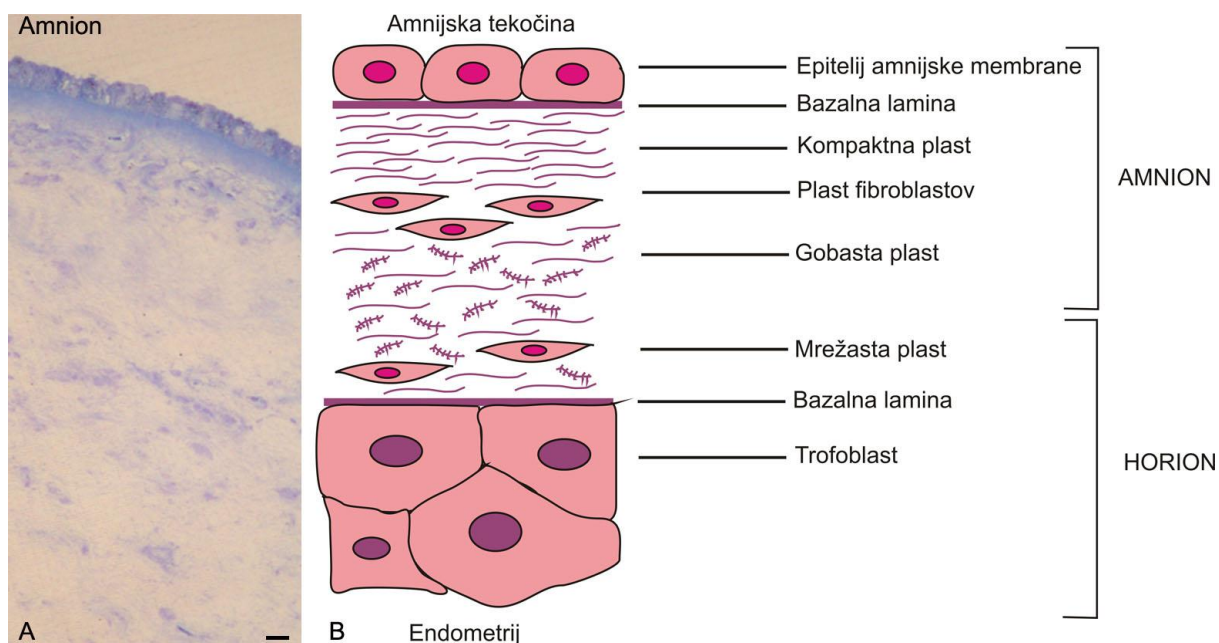
Amnijska membrana je zgrajena iz epitelija, ki meji na plod, debelejše bazalne lamine in vezivnega tkiva iz kompaktne, fibroblastne in gobaste plasti (Niknejad s sod., 2008) (Shema 2). Enoskladni epitelij amnijske membrane gradijo amnijske epitelijske celice (AEC), ki so kubične do visokoprizmatske (Bourne, 1962; Thomas, 1965), če gledamo membrano od zgoraj, pa so poligonalne oblike (Pollard s sod., 1976). AEC so enojedrne, z apikalno nameščenimi jedri nepravilnih oblik (Bourne, 1962). Nenavadna razporeditev heterokromatina v jedru nakazuje na začetno stopnjo fragmentacije le-tega, medtem ko bi, glede na organele v citoplazmi, lahko sklepali na visoko aktivnost celice (Seeds s sod., 1975; Gillebrand, 1969). Van Herendael s sod. (1977) razlaga ta pojav kot zaključno fazo zelo aktivne celice ob koncu normalne nosečnosti. Citoplazma AEC vsebuje številne organele, lipidne vključke (van Herendael s sod., 1977) ter vakuole, različnih velikosti, in vsebine (Bourne, 1962). Na površini celic so prisotni številni mikrovili, ki so pogosto nepravilnih oblik, razvejani ali celo zraščeni skupaj. Mikrovili se z apikalne površine celice nadaljujejo preko lateralne strani in molijo v medcelični prostor in tako povečajo stično površino med sosednjima celicama (van Herendael s sod., 1977). Nekatere študije (Bourne, 1962; Thomas, 1965; Lister, 1968) med sosednjimi AEC opisujejo vijugaste intercelularne kanale, vzdolž katerih so na medceličnih mejah prisotni dezmosomi, ki naj bi preprečevali prosto prehajanje amnijske tekočine po kanalu. Poleg mikrovilov se nahajajo na apikalni površini AEC kroglaste strukture, t.i. mehurčki, ki so rezultat na apokrine sekrecije celic (van Herendael s sod., 1977). Na bazalni strani AEC tvorijo stebričasto urejene izrastke, pedicele, s pomočjo katerih se sidrajo v spodaj ležeče tkivo (van Herendael s sod., 1977).

Amnijske epitelijske celice se med seboj povezujejo s številnimi dezmosomi (King, 1982; van Herendael s sod., 1977), na bazalno lamino pa se pritrjujejo s hemidezmosomi (van Herendael s sod., 1977). Starejša literatura sicer navaja, da tesnih stikov med sosednjimi AEC ni (King, 1982), novejša raziskave pa dokazujejo prisotnost proteinov tesnih stikov, kot sta na primer okcludin in ZO-1 (Kobayashi s sod., 2009). Ugotovili so, da so AEC povezane s tesnimi stiki, ki pa se v pozni nosečnosti prekinejo. Takšne prekinitve lahko povzročajo različni dejavniki,

med drugim glukokortikoidi, ki se v pozni nosečnosti nahajajo v amnijski tekočini (Kobayashi s sod., 2009).

Bazalna lamina amnijske membrane je ena najdebelejših lamin v človeškem telesu in med nosečnostjo predstavlja oporo za plod (Niknejad s sod., 2008). Vsebuje proteoglikane (perlekan) in glikoproteine (laminin, fibronektin, entaktin) ter verjetno služi kot prepustna pregrada (King, 1985). Vezivno tkivo, ki meji na bazalno lamino, je iz kompaktne plasti s številnimi vzporedno nameščenimi kolagenskimi vlakni (prevladujejo kolageni tipa I, III, V in VI) in elastini, plasti fibroblastov, v kateri sintetizirajo fibroblasti kolagen in gobaste plasti. Zadnja, ki je zaradi velike množine proteoglikanov in glikoproteinov, kot so na primer hialuronan, lumikan ter fibronektin, gobastega izgleda, meji na mrežasto plast horiona, najbolj zunanje plodove ovojnice. Povezava med membranama je rahla, zato je enostavna ločitev amnijske membrane spodaj ležečega horiona (Niknejad s sod., 2008).

Amnijska membrana ne vsebuje žil in živcev, namesto tega prehajajo vse hranilne snovi in kisik z difuzijo iz amnijske tekočine oziroma iz spodaj ležečega endometrija (decidualne membrane) (Niknejad s sod., 2008).



Shema 2: A) Zgradba amnijske membrane. Poltanka rezina. Amnijsko membrano gradi enoskladen epitelij, ki meji na lumen amnijske votline, debela bazalna lamina in vezivno tkivo. Tega sestavljajo kompaktna plast, kjer prevladujejo kolagenska vlakna, plast fibroblastov ter z glikoproteini in proteoglikani bogata gobasta plast. Merilce: 10 μ m. B) Shematski prikaz zgradbe dveh plodovih ovojnic, amniona in horiona.

2.5 AMNIJSKE EPITELIJSKE CELICE SPROŠČAJO RASTNE FAKTORJE

Amnijske epiteljske celice izražajo mRNA za številne rastne faktorje, ki stimulirajo celično proliferacijo, rast, diferenciacijo ter pospešujejo epitelizacijo in celjenje ran. Koizumi s sodelavci (2000a) je preučeval prisotnost različnih rastnih faktorjev v epiteliju in mezenhimu amnijske membrane, ki je bila mesec dni shranjena v 50 % glicerolu, na - 80 °C. Z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RT-PCR) so v amnijski membrani dokazali mRNA za epidermalni rastni faktor (EGF), transformirajoči rastni faktor alfa (TGF- α), hepatocitni rastni faktor (HGF), keratinocitni rastni faktor (KGF), rastni faktor fibroblastov (bFGF), transformirajoči rastni faktor beta 1, 2, 3 (TGF- β 1, - β 2, - β 3) ter mRNA za receptor za hepatocitni (HGFR) in keratinocitni (KGFR) rastni faktor. S testom ELISA pa so v amnijski

membrani pokazali prisotnost EGF, TGF- α , KGF, HFG in TGF- β 1, - β 2. Ko so izražanje rastnih faktorjev primerjali med intaktno amnijsko membrano in golo membrano, ki so ji odstranili epitelij, so ugotovili, da je nivo rastnih faktorjev EGF, HGF, KGF ter bFGF v intaktni membrani veliko višji kot v goli, kar nakazuje na epiteljski izvor teh. Predvidevajo, da je visok nivo izražanja EGF, HGF in KGF v epiteliju amnijske membrane eden od pglavitnih razlogov, da amnijska membrana pospešuje ob rekonstrukciji očesne površine celjenje ran.

2.6 AMNIJSKA MEMBRANA KOT NOSILEC

2.6.1 LASTNOSTI, ZARADI KATERIH JE AMNIJSKA MEMBRANA PRIMERNA KOT NOSILEC

Pri izbiri primerne nosilca za uporabo v tkivnem inženirstvu je treba upoštevati več dejavnikov. Najbolj pozorni moramo biti na biokompatibilnost - s tem se izognemo morebitnim zavrnitvenim reakcijam (Young sod., 2005). Pomembne so tudi mehanske lastnosti nosilca: stabilnost, elastičnost, prepustnost, plastičnost (Yang s sod., 2001) in lastnost nosilca, da omogoča pritrjevanje celic ter sproščanje različnih rastnih faktorjev (Walgenbach s sod., 2001).

Pritrditev celic na nosilec je v veliki meri odvisna od sestavin zunajceličnega matriksa nosilca. Prisotnost ali odsotnost določenih molekul zunajceličnega matriksa, kot so kolagen, laminin in fibronektin, ima velik vpliv na pritrjevanje in rast matičnih celic (Niknejad s sod., 2008). Celice se na molekule zunajceličnega matriksa pritrjujejo z receptorskimi molekulami integrini. Zunajcelična domena teh transmembranskih receptorjev se povezuje z molekulami zunajceličnega matriksa, medtem ko je znotrajcelična domena povezana s citoskeletom, ki se nato povezuje z jedro ovojnico, membranami organelov ter z različnimi encimi. Integrini so pomembni pri pritrjevanju celic in pri prenosu signala v celično notranjost. Vplivajo na procese, pomembne pri celičnem transportu, torej endocitozi in eksocitozi, ter na celično proliferacijo in diferenciacijo (Moiseeva, 2001). Zunajcelični matriks, ki ga izločajo AEC,

tvori bazalno lamino. Ta vsebuje vse pomembne ligandne molekule, ki omogočajo povezavo z integrini – npr. kolagen tipa III, IV in V - ter laminin, fibronektin in entaktin, kar pomeni, da predstavlja **ugoden substrat za pritrjevanje in nadaljnjo delitev celic** (Niknejad s sod., 2008).

Pomembna značilnost amnijske membrane je, da **zavira vnetno reakcijo ter brazgotinjenje** tkiva. Amnijska membrana zavira delovanje TGF- β . Ta povzroči aktivacijo fibroblastov, kar nadalje vodi v fibrozo in nastanek brazgotine (Khouw s sod., 1999). Omenjeno delovanje amnijske membrane ne razloži le dejstva, da amnijska membrana kot nosilec uravnava celjenje poškodb in obenem pospešuje rekonstrukcijo tkiva, ampak tudi, zakaj se morebitne poškodbe zarodka med nosečnostjo zacelijo brez nastanka brazgotin (Tseng s sod., 1999). Največja ovira pri transplantacijah tkiv ali organov je zavrnitvena reakcija, pri kateri imunski sistem prejemnika prepozna presadek kot tujek ter ga napade, kar vodi v vnetni odziv. V primeru rekonstrukcije tkiv s transplantacijo amnijske membrane pa do vnetja ne pride. Ugotovili so, da amnijska membrana zavira vnetne reakcije na več načinov. Tako na primer vezivno tkivo amnijske membrane zavira izražanje potencialnih vnetnih proteinov, kot sta citokina interleukin-1 α in interleukin-1 β (Solomon s sod., 2001). Epitelij amnijske membrane izraža različne protivnetne proteine, kot so: antagonist receptorja za interleukin-1, inhibitorji metaloproteinaz – TIMP -1, -2, -3, -4 - in protivnetni citokin interleukin-10 (Hao s sod., 2000). Pri zaviranju vnetne reakcije je ključno tudi delovanje hialuronske kisline, ki jo je v vezivnem tkivu amnijske membrane veliko. Hialuronska kislina deluje kot ligand za določene receptorje, npr. CD44 receptorje na limfocitih, in ima pri rekonstrukciji tkiv pomembno vlogo pri »lovljenju« celic imunskega sistema (Higa s sod., 2005).

Amnijska membrana **deluje tudi antimikrobno**. AEC namreč sintetizirajo in izločajo β 3-defenzin (King s sod., 2007). Ta spada med antimikrobne peptide, ki jih na svojih površinah navadno izražajo epiteljske celice in levkociti, ter je pomemben del prirojenega imunskega odziva (Krisanaprakornkit s sod., 1998).

Večina molekul zunajceličnega matriksa, ki ponavadi sestavljajo nosilec, je tujega izvora, zato je pred uporabo nosilca treba preučiti njegovo imunogenost. Z uporabo amnijske membrane kot nosilca se izognemo imunološkemu zapletu zaradi uporabe tujih biomaterialov (Niknejad s sod., 2008). K spoznanju o **nizki imunogenosti** amnijske membrane so pomembno prispevale študije imunskih odzivov med nosečnostjo. Glede na to, da polovico genoma zigote sestavlja DNA očeta, ima zarodek semi-alogene antigene. To pomeni, da telo matere zarodek lahko prepozna kot tujek in ga izloči. V večini primerov pride do normalne vzpostavitve nosečnosti. Iz tega lahko sklepamo, da verjetno obstajajo mehanizmi, ki ščitijo zarodek pred imunskim odzivom materinega telesa. Ugotovili so, da je glavni faktor, ki preprečuje zavrnitev trofoblata, antigen HLA-G. Izražata ga trofoblast ter AEC, najdemo pa ga tudi v amnijski tekočini. Menijo, da antigen HLA-G s tem, da deluje kot ligand za inhibitorne receptorje na naravnih celicah ubijalkah in makrofagih, povzroča imunsko toleranco (Sargent, 1993). Sporno je, ali AEC izražajo polimorfne antigene HLA-A, -B, -C, ki predstavljajo antigene citotoksičnim limfocitom T, ter tako lahko izzovejo specifični imunski odziv (Sargent, 1993). Mnoge študije (Adinolfi s sod., 1982; Bailo s sod., 2004; Kamiya s sod., 2005; Li s sod., 2005; Hori s sod., 2006; Miki s sod., 2006; Miki s sod., 2007) ugotavljajo, da celice trofoblata in AEC šibko ali sploh ne izražajo polimorfnih antigenov HLA-A, -B, -C, Banas s sodelavci (2008) razlaga, da AEC izražajo visok nivo antigenov MHC I. razreda. Zaradi specifičnega delovanja antigena HLA-G ter, kot ugotavlja večina študij, šibkega izražanja antigenov HLA-A, -B, -C, je v primeru zdravljenja s presaditvijo amnijske membrane kot nosilca možnost zavrnitve tkiva zaradi imunske reakcije manjša (Niknejad s sod., 2008). Poleg tega AEC izražajo protein CRRY (angl. *Complement Receptor Related Gene Y*), ki preprečuje molekulam komplementa (C3 in C4) označevati ter napadati tuje celice (Shimoya s sod., 2003).

Pri izbiri nosilca so pomembne tudi njegove mehanske lastnosti. Tako na primer večja togost nosilca poveča moč tega, kar je ključnega pomena pri premagovanju stresa, ki nastane zaradi rasti tkiva (Sikavitsas s sod., 2001). Togost, elastičnost ter druge biomehanske lastnosti zunajceličnega matriksa so odvisne od razmerja med kolageni, proteoglikani ter elastini

(Kiviranta s sod., 2006). Za amnijsko membrano je značilna **velika elastičnost**, potrebno je namreč, da se prilagaja gibanju zarodka (Hieber s sod., 1997), **in čvrstost**, saj mora med nosečnostjo prenesti hidrostatski pritisk amnijske tekočine (Bitar s sod., 1996). Zmanjšana elastičnost amnijske membrane lahko vodi v prezgodnje spontano pretrganje membrane, posledično v prezgoden porod (Hieber s sod., 1997). Ko so primerjali amnijske membrane prezgodnjih porodov in membrane, dobljene iz pravočasnih porodov, so ugotovili, da so te veliko bolj elastične (Benson-Martin s sod., 2006). Elastin so odkrili v vezivnem delu amnijske membrane, zgoščenega predvsem tik pod epitelijem amnijske membrane (Hieber s sod., 1997).

2.6.2 UPORABA INTAKTNE ALI GOLE AMNIJSKE MEMBRANE

Amnijsko membrano se kot nosilec lahko uporablja z epitelijem (intaktna amnijska membrana) ali brez njega (gola amnijska membrana). Odločitev, ali uporabiti intaktno ali golo amnijsko membrano, je odvisna od različnih dejavnikov, med drugim tudi od tipa celic ali tkiva, ki ga želimo gojiti (Niknejad s sod., 2008). Tako je na primer prisotnost epitelija amnijske membrane pomembna predvsem zaradi različnih rastnih faktorjev, ki jih te celice izločajo (Koizumi s sod., 2000a). Po drugi strani pa mnogi menijo, da epiteljske celice ovirajo enakomerno razrast tkivnih nadomestkov ter zmanjšajo možnost tvorbe hemidezmosomov, ki so pomembni za pritrditev celic na bazalno lamino (Burman s sod., 2004).

Večina raziskav, ki primerja primernost gole oziroma intaktne amnijske membrane za gojenje celic *in vitro*, je bilo narejenih z epitelnimi celicami roženice (Koizumi s sod., 2000b, 2007). Ugotovili so, da je rast epitelija roženice na membrani, ki so ji predhodno odstranili AEC, znatno hitrejša kot rast celic na intaktni amnijski membrani (Koizumi s sod., 2000b). Poleg tega so bile celice nasajene na golo amnijsko membrano veliko bolj podobne normalnemu epiteliju roženice. Poleg odstopanja v hitrosti rasti so razliko opazili tudi v vodilnem robu prirastka (Koizumi s sod., 2000b). Medtem ko je bil vodilni rob celic, ki so rasle na goli amnijski membrani, gladek in enoten, je bil ta pri celicah, ki so uspevale na intaktni amnijski

membrani, valovit in nepravilen. Raziskovalci pripisujejo razliko dejstvu, da je intaktna amnijska membrana z AEC v primerjavi z izpostavljenim zunajceličnim matriksom manj primeren substrat za migracijo celic (Koizumi s sod., 2000b). Koizumi s sodelavci (2007) je med celicami, ki so uspevale na intaktni amnijski membrani, opazil večje medcelične prostore v primerjavi s celicami, ki so rasle na goli amnijski membrani; prav tako epiteljske celice roženice niso bile dobro pritrjene na spodaj ležeči epitelij amnijske membrane. Raziskovalci zaključujejo, da je v namen transplantacije primernejša za rast epitelih celic roženice *in vitro* gola amnijska membrana (Koizumi s sod., 2000b, 2007).

Za pripravljanje gole amnijske membrane se trenutno uporabljajo tri metode. Pri prvi se za rahljanje povezav med celicami epitelija in bazalno lamino uporablja kelator dvovalentnih (kovinskih) ionov etilendiaminotetraocetna kislina (EDTA), pri drugi pa se uporablja encim dispaza, ki razgradi sestavine bazalne lamine, ki se povezujejo s celicami epitelija. Po obeh postopkih je treba nato še mehansko odstraniti (postrgati) epiteljske celice (Hopkinson s sod., 2008). V raziskavi, kjer so primerjali različne tehnike razgaljanja amnijske membrane, so ugotovili, da niti EDTA niti dispaza nista primerna za odstranjevanje AEC, saj v obeh primerih pride do poškodb bazalne lamine (Hopkinson s sod., 2008). Dispaza sicer učinkovito odstrani epiteljske celice, vendar s specifičnim delovanjem na kolagen IV in fibronektin poruši integriteto bazalne lamine (Spurr s sod., 1985; Stenn s sod., 1989) in jo naredi manj primerno za nadaljnjo uporabo. Uporaba EDTA pa naj bi bila v preveliki meri odvisna od kasnejšega mehanskega strganja celic epitelija (Hopkinson s sod., 2008). Obe tehniki sta se, predvsem zaradi kasnejšega strganja, ki najbolj poškoduje površino bazalne lamine, izkazali za neprimerni. Zato so raziskovalci ponudili optimalnejšo metodo z uporabo encima termolizina (Hopkinson s sod., 2008). Ta je temperaturno stabilna metaloproteinaza, izolirana iz bakterije *Bacillus thermoproteolyticus* (Heinrikson, 1977), ki brez potrebe po kasnejšem strganju učinkovito odstrani AEC in ob tem ohranja integriteto bazalne lamine (Hopkinson s sod., 2008). Natančen način delovanja termolizina še vedno ni popolnoma pojasnjen. Predvidevajo, da specifično cepi vezi v multiproteinskem kompleksu hemidezmosomov, katerega ključni del je integrin $\alpha 6/\beta 4$ (Eble s sod., 1993). V primerjavi z dispazo je torej

proteolitično delovanje termolizina bolj specifično, zato so poškodbe bazalne lamine amnijske membrane manjše.

2.6.3 AMNIJSKA MEMBRANA KOT NOSILEC RAZLIČNIH CELIČNIH KULTUR

Zaradi številnih pozitivnih, in sicer za dober nosilec potrebnih lastnosti amnijske membrane je bilo v zadnjem času opravljenih precej različnih študij, ki so preučevale uporabnost in primernost amnijske membrane kot nosilca za različne celične kulture.

Ugotovili so, da je gola amnijska membrana primeren nosilec za rast hondrocitov (Jin s sod., 2007; Diaz-Prado s sod., 2010). Amnijska membrana naj bi s svojimi edinstvenimi biokemičnimi in mehanskimi lastnostmi pozitivno vplivala tudi na regeneracijo perifernih živcev (Mohammad s sod., 2000; Mligiliche s sod., 2002). Poleg tega jim je na amnijski membrani uspelo vzgojiti endotelijske celice, na podlagi česar so jo predlagali kot primerno za uporabo v tkivnem inženirstvu ožilja (Ishino s sod., 2004; Tsai s sod., 2007). Preučevali so tudi uporabo amnijske membrane pri regeneraciji kože (Sawhney, 1989; Yang s sod., 2006; Lo s sod., 2009). Še vedno pa se amnijsko membrano kot nosilec največ uporablja pri rekonstrukcijah očesne površine (Capeans s sod., 2003; Fatima s sod., 2006). Amnijska membrana v tem primeru pripomore k razširjanju in diferenciaciji epiteljskih celic roženice *in vitro*. Po treh do štirih tednih, ko se celice v kulturi dovolj namnožijo, jih skupaj z amnijsko membrano prenesejo na očesno površino, kjer pride do vzpostavitve normalnega epitelijskega roženice (Letko s sod., 2001).

Sharifiaghdas s sodelavci (2007) je preučeval, kako amnijska membrana kot nosilec vpliva na rast in diferenciacijo urotelijskih celic. V raziskavi so primerjali rast mišjih urotelijskih celic na brezceličnem kolagenskem matriksu z rastjo celic na goli amnijski membrani in trebušni mreni (peritoneju). Ugotovili so, da je proliferacija celic, gojenih na kolagenskem matriksu, intenzivna in da celice že v tretjem dnevu dosežejo uravnoteženo rast. V nasprotju s kolagenom je bila rast celic na peritoneju v prvih treh dneh precej manjša, na goli amnijski

membrani pa le malo slabša. Le na goli amnijski membrani so pri urotelijskih celicah opazili nekatere morfološke lastnosti normalnega urotelija. Epitelij je bil zgrajen iz treh skladov celic, ki so se tako kot pri uroteliju *in vivo* med seboj povezovale z dezmosomi. Poleg tega so se celice na bazalno lamino amnijske membrane pritrjale s hemidezmosomi.

2.7 PRIDOBIVANJE IN SHRANJEVANJE AMNIJSKE MEMBRANE

Amnijsko membrano odvezamemo v sterilnih razmerah pri načrtovanih porodih s carskim rezom. Posteljico takoj po carskem rezu izpiramo s sterilno pripravljeno fiziološko raztopino z dodanimi antibiotiki in antimikotiki ter nato amnion ločimo od horiona (Mikek s sod., 2004).

Čeprav je v uporabi tudi sveža amnijska membrana, je za zagotovitev primerne kvalitete in manjše imunogenosti membrane priporočljiva posebna obdelava in sterilizacija le-te. Za ohranjanje in shranjevanje amnijske membrane je v uporabi več različnih metod, kot so na primer hipotermično shranjevanje pri 4 °C ali pri - 80 °C, suho zamrzovanje in γ -sterilizacija (Niknejad s sod., 2008). Splošno mnenje je, da so AEC v amnijski membrani, shranjeni pri - 80 °C, v primerjavi z AEC v amnijski membrani takoj po porodu manj imunogene, zato se večina poslužuje uporabe tako shranjene amnijske membrane (Kubo s sod., 2001). Določenih postopkov shranjevanja, kot je na primer shranjevanje s pomočjo glicerola pri 4 °C, celice amnijske membrane ne preživijo (Hennerbichler s sod., 2007). Po drugi strani pa v primeru zamrznjenega shranjevanja z dimetilsulfoksidom (DMSO) pri - 80 °C ostane približno polovica celic viabilnih tudi več mesecev (Kubo s sod., 2001). Kruse s sodelavci (1999) je raziskoval, kako na amnijsko membrano vpliva shranjevanje v 50 % glicerolu pri - 80 °C. Ugotovili so, da se morfologija amnijske membrane in AEC med shranjevanjem ne spremeni, medtem ko so rezultati viabilnosti celic pokazali, da AEC ne preživijo shranjevanja v 50 % glicerolu. Viabilnost amnijske membrane je odvisna od sestave medija in tudi od temperature, pri kateri je membrana shranjena (Branski s sod., 2007). Raziskovalci so zaradi težav, ki nastanejo pri dolgotrajnem shranjevanju amnijske membrane po ustaljenih postopkih, razvili

nov način shranjevanja. S pomočjo dolgovalovnih infrardečih valov ter mikrovalov so pripravili suho amnijsko membrano, ki jo lahko neomejeno dolgo hranimo kar na sobni temperaturi (Toda s sod., 2007).

2.8 SEČNI MEHUR SESALCEV

Sečni mehur se je razvil kot prilagoditev na življenje na kopnem. Kopenskimi organizmom omogoča izločanje presnovnih produktov, ne da bi pri tem izgubljali prevelike količine vode. Primarna funkcija sečnega mehurja je zadrževanje urina, ki ga stalno proizvajajo ledvice, dokler ga žival ne izloči zavestno (Hicks, 1975).

Steno sečnega mehurja sestavljajo trije sloji. Od zunanosti proti notranosti si sledijo serozni sloj, sloj mišic ter mukozni sloj. Serozni sloj predstavlja vezivno tkivo, ki ga obdaja tanka plast mezotelijskih celic. Vmesna mišična plast, ki se med vrstami razlikuje po debelini, je praviloma sestavljena iz treh plasti gladkih mišic – zunanje in notranje plasti vzdolžnih mišic ter vmesne plasti krožnih mišic. Plasti mišic sledi mukozni sloj, ki ga sestavljajo lamina proprija z vezivnim tkivom, žilami in živčnimi vlakni ter bazalna lamina, na katero se prilega epitelij sečnega mehurja – urotelij (Slika 1). Ta omogoča s svojo edinstveno zgradbo značilno delovanje sečnega mehurja.

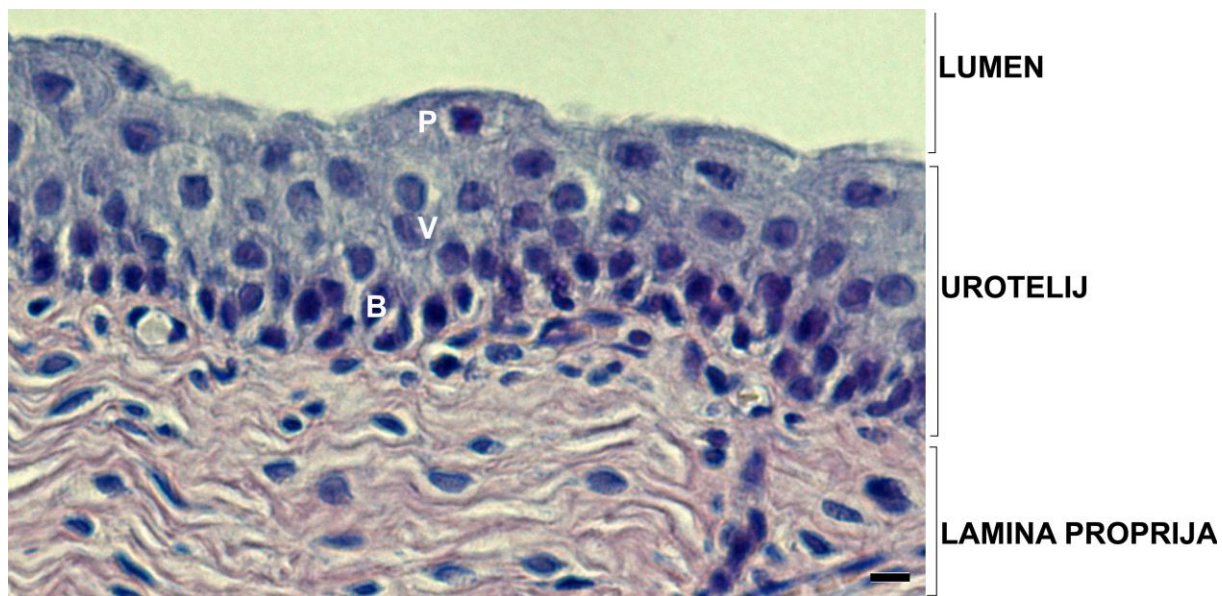
2.8.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI UROTELIJA SESALCEV

Epitelij urinarnega trakta, ki se razteza od ledvične kotanje do proksimalnega dela sečnice, imenujemo urotelij (Romih s sod., 2005). Ta je prehodni epitelij, zgrajen iz treh skladov celic, ki se med seboj razlikujejo po morfologiji in tudi po stopnji diferenciacije (Lewis, 2000) (Slika 1). Bazalni celični sklad sestavljajo nediferencirane bazalne celice. Sledijo jim delno diferencirane celice vmesnega sklada, nad njimi pa leži sklad visoko diferenciranih površinskih urotelijskih celic, ki meji na lumen sečnega mehurja (Hicks, 1975).

Celice bazalnega sklada so majhne (5-10 μm), kubične do visokoprizmatske oblike in predstavljajo zarodno plast celic. Citoplazma bazalnih urotelijskih celic vsebuje številne proste ribosome, zrnati in gladki endoplazemski retikulum pa sta redka. Na bazalno lamino se pritrjujejo s hemidezmosomi (Hicks, 1975; Lewis, 2000).

Vmesne urotelijske celice imajo značilnosti bazalnih in visoko diferenciranih površinskih celic. Citoplazma vmesnih celic je podobna citoplazmi bazalnih celic, le da imajo celice vmesnega sklada manj prostih ribosomov ter večje število lizosomov. Tako kot površinske urotelijske celice vsebujejo izrazit Golgijev aparat (GA) ter celo vezikle diskoidalne in fuziformne oblike (DFV). Celice so velikosti 20 μm , med seboj pa se povezujejo z dezmosomi (Hicks, 1975; Lewis, 2000).

Za citoplazmo celic površinskega sklada urotelija je značilno veliko število DFV ter številni lizosomi (Novikoff, 1961; Hicks, 1966). Celice so pogosto mnogojedrne ali poliploidne, kar nakazuje, da nastanejo s postopnim zlivanjem spodaj ležečih vmesnih celic, pri čemer ostanejo jedra ločena ali pa se zlijejo prav tako kot celice (Hicks, 1975). Površinske urotelijske celice lahko prekrivajo več celic vmesnega sklada, zato jih imenujemo tudi dežnikaste celice. Njihova velikost in oblika sta odvisni od stopnje raztegnjenosti sečnega mehurja. V primeru praznega (skrčenega) mehurja merijo 50 μm in so kubične oblike, ko pa se mehur napolni oziroma raztegne, postanejo celice večje (120 μm) in ploščate oblike. Med seboj se povezujejo z dezmosomi, blizu apikalne površine pa tudi z zelo dobro razvitimi tesnimi stiki (Hicks, 1975; Lewis, 2000; Kreft s sod., 2005, 2006; Jezernik in Kreft, 2010).



Slika 1: Prašičji urotelij je prehodni epitelij, zgrajen iz več skladov celic. Na bazalni lamini ležijo celice bazalnega sklada (B), ki jim sledi vmesni sklad celic (V). Nad njim je površinski celični sklad (P), ki meji na lumen sečnega mehurja. Površinske urotelijske celice lahko prekrivajo več celic vmesnega sklada, zato jih imenujemo tudi dežnikaste celice. Merilce: 10 μm .

Apikalna plazmalema visoko diferenciranih površinskih urotelijskih celic je sestavljena iz odebeljenih uroplakinskih plakov, ki jih obdajajo območja neodebeljene plazmaleme (Porter s sod., 1967). Uroplakinske plake, ki prekrivajo od 70 do 90 % apikalne plazmaleme (Lewis, 2000), sestavljajo transmembranski glikoproteini, uroplakini (UP) (Wu s sod, 1995; Kachar s sod, 1999; Hu s sod, 2005; Sun, 2006). Zunajcelična domena uroplakinov je večja od znotrajcelične, zato je zunanji del plazmaleme debelejši od citoplazemskega (Wu s sod, 1995). To daje plakom asimetričen videz, zaradi česar imenujemo predele uroplakinskih plakov tudi asimetrično odebeljene membrane (ang. asymmetric unit membrane – AUM) (Hicks, 1965; Porter, 1967). Uroplakinski plaki so mnogokotnih oblik, premera 0,2 - 0,8 μm in debeline 12 nm (Rhodin, 1974; Lewis, 2000). Vsak plak tvorijo številne uroplakinske podenote, premera 16 nm, ki so sestavljene iz štirih značilno urejenih transmembranskih proteinov, uroplakinov – UPIa, UPIb, UPII in UPIIIa. Uroplakini se združujejo v heterodimere (UPIa/UPIIIa, UPIb/UPII) in oblikujejo dva obroča: notranji obroč tvori šest

večjih (UPIa ali UPIb), zunanji obroč pa šest manjših proteinov (UPII ali UPIIIa) (Hicks, 1975; Kachar s sod., 1999; Lewis, 2000; Liang s sod., 2001).

Uroplakinski plaki so med seboj ločeni z območij neodebeljene plazmaleme, debeline 5-7 nm. Na teh mestih prihaja med krčenjem sečnega mehurja do gubanja apikalne plazmaleme urotelija (Koss, 1969; Staehelin s sod., 1972; Hicks, 1975).

Sinteza uroplakinskih plakov se začne v zrnatem endoplazemskem retikulumu, kjer poteka sinteza uroplakinov in oblikovanje specifičnih uroplakinskih heterodimerov (Wu s sod., 1995; Tu s sod., 2002; Hu s sod., 2005), in se zaključi v transgolgijevem mrežju. Iz tega se odcepljajo DFV (Khandelwal s sod., 2009), ki prenašajo uroplakinske plake. V 70. letih prejšnjega stoletja so menili, da se uroplakinski plaki postopoma tvorijo že znotraj Golgijevega aparata (GA) (Hicks, 1966; Koss, 1969), kasnejše raziskave pa so pokazale, da cisterne GA uroplakinskih plakov ne vsebujejo (Alroy s sod., 1982). Uroplakini se v 16 nm podenote povezujejo šele v transgolgijevem mrežju, od koder se odcepljajo vezikli z uroplakini, ki se združujejo v DFV, v katerih poteka koncentriranje uroplakinskih podenot in združevanje teh v uroplakinske plake. Zreli DFV so sestavljeni iz dveh nasproti si ležečih plakov, ki ju povezuje neodebeljena membrana (Hicks, 1965; Porter s sod., 1967). Ob vključitvi DFV v apikalno plazmalemo se neodebeljena membrana DFV zlije z neodebeljenimi predeli apikalne plazmaleme (Hicks, 1975). Transport DFV je strogo polariziran, kar pomeni, da najdemo uroplakine le v apikalni, ne pa tudi v bazolateralni plazmalemi površinskih urotelijskih celic (Kreft s sod., 2009a, 2010).

S svojo edinstveno zgradbo deluje apikalna plazmalema površinskih urotelijskih celic kot učinkovita bariera, ki preprečuje nekontrolirano prehajanje vode, ionov in strupenih, potencialno rakotvornih metabolitov iz urina v spodaj ležeče vezivno tkivo in krvožilje (Kreft s sod., 2009a). Poleg odebeljene apikalne plazmaleme pripomorejo k vzdrževanju krvno-urinske bariere še zelo dobro razviti tesni stiki med visoko diferenciranimi površinskimi

celicami (Acharya s sod., 2004) in nizka endocitotska aktivnost površinskih urotelijskih celic (Kreft s sod., 2009b).

2.8.2 DIFERENCIACIJA UROTELIJSKIH CELIC

Površinske urotelijske celice se diferencirajo postopoma iz spodaj ležečega bazalnega in vmesnega celičnega sklada. Normalno je potek diferenciacije počasen, saj imajo bazalne celice nizek mitotski indeks in so površinske celice urotelija dolgožive (Kreft s sod., 2009a), po drugi strani pa je ob morebitni mehanski ali kemični poškodbi hitrost regeneracije urotelija osupljiva (Hicks s sod., 1978; Kreft s sod., 2005, 2006; Veranič s sod., 2009). S poskusi *in vitro* so pokazali, da pride ob površinski ranitvi urotelija že v 24 urah do ponovne vzpostavitve tesnih stikov med originalnimi in na novo diferenciranimi površinskimi celicami, kar je ključnega pomena za vzdrževanje neprepustne bariere (Kreft s sod., 2005).

Za študij diferenciacije urotelijskih celic se, poleg raziskovanja urotelija *in vivo*, kjer se sposobnost diferenciacije celic spremlja predvsem ob poškodbah tega, uporabljajo tudi *in vitro* vzgojene celične kulture urotelijskih celic. V kulturi se celice, podobno kot pri uroteliju *in vivo*, organizirajo v večskladen epitelij z visoko diferenciranimi celicami na površini, za razliko, da med diferenciranimi površinskimi celicami najdemo tudi celice, ki ne kažejo znakov diferenciacije oziroma celice, ki so diferencirane le delno (Kreft s sod., 2002, 2005). Izražanje uroplakinov je pri delno diferenciranih celicah šibko, prav tako imajo v primerjavi z visoko diferenciranimi površinskimi celicami v apikalni citoplazmi manj številne in manjše DFV (Kreft s sod., 2002). Med diferenciacijo se uroplakini postopoma organizirajo v uroplakinske plake, kar daje diferenciranim urotelijskim celicam značilen videz (Romih s sod., 2001; Veranič s sod., 2004). Apikalna plazmalema nediferenciranih celic je oblikovana v mikrovile. Ti se pri delno diferenciranih celicah povezujejo v nesklenjene grebene, ki v naslednji fazi diferenciacije postopoma prehajajo v sklenjene grebene. Pri visoko diferenciranih urotelijskih celicah je apikalna plazmalema oblikovana v značilne školjkaste mikrogrebene (Romih s sod., 1998; Kreft s sod., 2002, 2005).

Za visoko diferencirane površinske celice urotelija so, poleg visoke koncentracije uroplakinov v apikalni plazmalemi, DFV v apikalni citoplazmi in zelo dobro razvitih tesnih stikov značilna še omrežje citokeratina 20 v supapikalni citoplazmi (Veranič in Jezernik, 2002), aktinski filamentni ob bazolateralni površini celic (Romih s sod., 1999) ter visoka transepitelijska upornost (Lewis, 2000).

2.8.3 TRANSEPITELIJSKA UPORNOST UROTELIJA

Primarna naloga urotelija je vzdrževanje krvno-urinske bariere (Hicks, 1975). Nizko prepustnost za vodo, ione ter različne toksične metabolite omogočata edinstveno zgrajena apikalna plazmalema površinskih urotelijskih celic ter dobro razviti tesni stiki (Lewis, 2000). Zanesljiva metoda za ugotavljanje prepustnosti epitelija je merjenje transepitelijske upornosti (TER), pri čemer pomeni visoka TER nizko prepustnost. Fromter in Diamond (1972) sta epitelije glede na prepustnost razdelila v dva razreda – na tesne ($TER > 500 \Omega\text{cm}^2$) ter na netesne ($TER < 500 \Omega\text{cm}^2$). Izmerjene vrednosti transepitelijske upornosti urotelija *in vivo* znašajo $20.000 \Omega\text{cm}^2$ ali več (Lewis, 2000), na podlagi česar ga uvrščamo med tesne epitelije. Do danes so izmerili najvišjo TER ($75.000 \Omega\text{cm}^2$) pri uroteliju zajca *in vivo* (Lewis in Diamond, 1976). Vrednosti TER urotelija *in vitro* so sicer nižje, vendar še vedno tako visoke, da lahko urotelija, tudi na podlagi teh meritev, označimo za neprepustnega. Perrone s sodelavci (1996) je na trajni celični liniji humanih urotelijskih celic izmeril TER od 500 do $1000 \Omega\text{cm}^2$, meritve TER sekundarnih kultur prašičjih urotelijskih celic pa so pokazale vrednosti tudi do $12.000 \Omega\text{cm}^2$ (Višnjar, 2009).

3 METODE DELA

3.1 PRIPRAVA IN ODMRZOVANJE AMNIJSKE MEMBRANE

Dovoljenje za uporabo humane amnijske membrane je odobrila Komisija za medicinsko etiko na seji 15. 12. 2009. Humane amnijske membrane, zamrznjene na -80°C , smo prevzeli na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino.

Amnijsko membrano odvzamejo v sterilnih razmerah pri načrtovanih porodih s carskim rezom. Posteljico takoj po carskem rezu izpirajo s sterilno pripravljeno fiziološko raztopino z dodanimi antibiotiki (50 $\mu\text{g/ml}$ penicilina, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomicina in 100 $\mu\text{g/ml}$ neomicina) ter antimikotiki (2.5 $\mu\text{g/ml}$ amfotericina B). Amnijsko membrano ločijo od horiona in jo z epitelno plastjo navzgor položijo na sterilen nitrocelulozni papir s porami, velikosti 0.45 μm . Amnijsko membrano razrežejo na kose skupaj z nitroceluloznim papirjem, velikosti 4x4 cm. Vsak košček posebej nato shranijo v stekleničko z medijem Eagle's in glicerolom, in sicer v razmerju 1:1. Tako pripravljene stekleničke nato shranijo pri -80°C (povzeto po Mikek s sod., 2004).

Amnijske membrane, ki smo jih v poskusih uporabljali, so bile 15. 7. 2008 zamrznjene na -80°C . Te smo najprej dve uri pustili na sobni temperaturi, da so se odtalile. Zatem smo jih skupaj z nitroceluloznim papirjem vzeli iz stekleničke, jih najprej sprali v sterilnem PBS ter nato spiranje ponovili še v hranilnem mediju. Membrane smo skupaj z nitroceluloznim papirjem razrezali na primerno velike koščke, jih zatem ločili od nitroceluloznega papirja ter vpeli v obročaste nosilce, premera 14 mm (*Scaffdex, Tempere, Finland*) (Slika 2). To smo storili na dva načina. V prvem primeru smo membrano vpeli v obročast nosilec tako, da je bil epitelni sloj amnijske membrane obrnjen navzgor, v drugem pa obratno, da je navzgor gledalo vezivno tkivo amnijske membrane. Poleg preučevanja vloge amnijske membrane kot nosilca urotelijskih celic smo ugotavljali tudi vlogo amnijske membrane kot induktorja rasti in diferenciacije urotelijskih celic. V ta namen smo približno 1,5 cm^2 velike koščke amnijske membrane položili v medij pod porozne membrane, na katere smo nasadili urotelijske celice.

3.2 DEEPITELIZACIJA AMNIJSKE MEMBRANE S TERMOLIZINOM

Za odstranitev AEC smo uporabili proteolitični encim, termolizin (*Thermolysin from Bacillus thermoproteolyticus rokko, Sigma*).

Amnijsko membrano smo odmrznili, sprali v mediju in sterilnem PBS, jo razrezali ter vpeli v nosilce z epitelno stranjo navzgor. Vpete membrane smo ponovno sprali v mediju ter jih nato prenesli v plastične petrijevke. Zatem smo na membrane dodali termolizin, razredčen s sterilnim PBS (1:50). Encim smo pustili delovati 11 in 22 minut. Po predvidenem času smo membrane sprali s sterilnim PBS. Nato smo jih preložili v nove petrijevke s sterilnim PBS ter jih za 15 minut pustili na stresalniku, da so se s površine bazalne lamine odstranili ostanki celic. Po 15 minutah smo vpete membrane prestavili v petrijevke s svežim sterilnim PBS ter jih ponovno za 15 minut pustili na stresalniku. Zatem smo deepitelizirane amnijske membrane sprali še v mediju, jih položili v plastične petrijevke, v katere je bil že predhodno dodan hranilni medij, ter nanje nasadili prašičje urotelijske celice četrte (IV.) oziroma pete (V.) pasaže.

3.3 ODMRZOVANJE IN NASAJANJE PRAŠIČJIH UROTELIJSKIH CELIC

Za poskuse smo uporabili prašičje urotelijske celice, ki so bile globoko zamrznjene v tekočem dušiku. Epruvete za zamrzovanje, v katerih so bile celice shranjene, smo vzeli iz tekočega dušika ter jih 1 minuto odmrzovali v topli kopeli na 37 °C. Nato smo jih centrifugirali (5 minut, 23 °C, 200g, *Ependorf*), odlili supernatant ter celice, ki so ostale na dnu epruvete, resuspendirali z ustreznim volumnom hranilnega medija. Za štetje celic smo 50 µl celične suspenzije zmešali z 10 µl tripanskega modrila. Slednje prehaja skozi poškodovano plazmalemo mrtvih celic in jih tako obarva modro, žive, nepoškodovane celice ostanejo svetle. Pomembno je, da celice preštejemo kmalu po dodatku tripanskega modrila, saj se sčasoma obarvajo tudi žive celice. Celično suspenzijo z dodanim tripanskim modrilom smo

kanili na hemocitometer, ki ima vgrajeni dve mrežici, od katerih vsaka vsebuje osem kvadratkov s standardno površino. Iz povprečja živih in mrtvih celic, ki smo jih prešteli v vsakem kvadratu, smo izračunali viabilnost in število živih celic v suspenziji. Celice smo nato z nasaditveno gostoto 1×10^5 nasadili v nove gojitvene stekleničke (*Tissue Culture Flasks, TPP*), različnih velikosti (12.5 cm^2 , 50 cm^2 , 75 cm^2), ter jim glede na velikost gojitvene stekleničke dodali ustrezen volumen hranilnega medija. Celice smo gojili pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 atmosferi ter pri 100 % relativni zračni vlažnosti. Naslednji dan smo celične kulture sprali s svežim medijem, s čimer smo odstranili odmrle, nepritrjene celice.

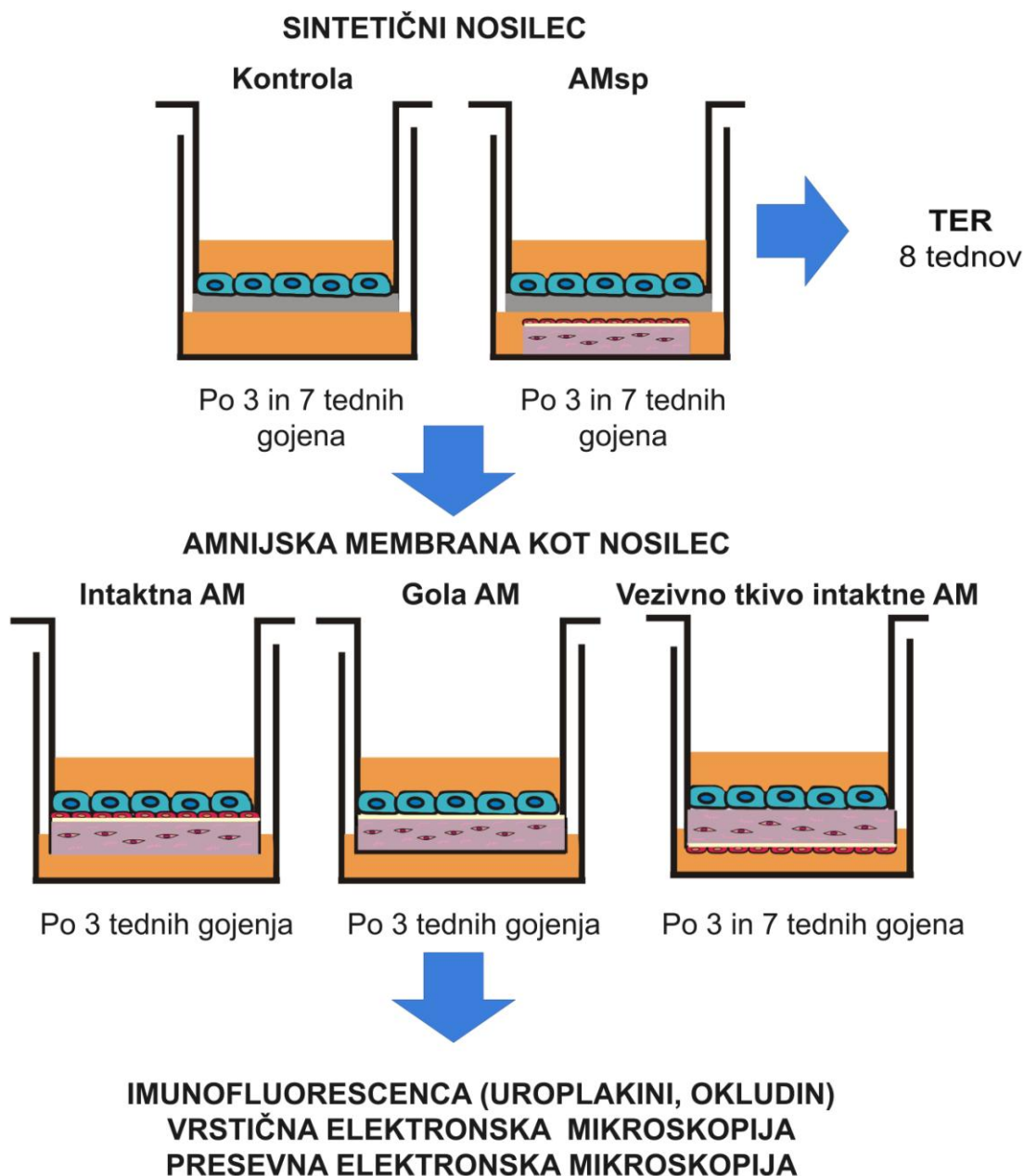
Celične kulture smo na nove podlage presajali, ko so pokrile 80-100 % dna gojitvene stekleničke. Presajanje je potekalo tako, da smo celicam najprej odstranili hranilni medij ter jim dodali proteolitični encim *Triple Select (Gibco)*. Volumen dodanega encima je bil odvisen od velikosti gojitvenih stekleničk, v katerih so bile celice, ki smo jih želeli presaditi. Celične kulture z dodanim *Triple Select* smo inkubirali pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 atmosferi ter pri 100 % relativni zračni vlažnosti. Po 10 minutah inkubacije so se celice zaokrožile in odlepile od podlage. Delovanje encima smo zaustavili tako, da smo celicam dodali hranilni medij. Te smo zatem previdno sprali s podlage, jih centrifugirali (5 minut, $23 \text{ }^\circ\text{C}$, 200g, *Ependorf*), z invertnim mikroskopom (*Leica DM IL*) prešteli celice v suspenziji ter izračunali njihovo viabilnost. Celice smo v gojitvenih stekleničkah (*Tissue Culture Flasks, TPP*) gojili do III. oziroma IV. pasaže, nato pa smo jih z nasaditveno gostoto 2×10^5 nasadili na sintetične porozne membrane, s površino 4.2 cm^2 in 0.9 cm^2 (*Falcon Cell Culture Insert, Becton Dickinson*) ter na vpete (intaktne, gole in z vezivnim tkivom navzgor obrnjene) amnijske membrane, s površino 1.5 cm^2 . Nosilce s poroznimi membranami ter v obročaste nosilce (*Scaffdex, Tempere, Finland*) vpete amnijske membrane smo nato položili v plastične večprekatne petrijevke ustreznih velikosti (*Falcon Tissue Culture Plate, Becton Dickinson*), kamor smo pred tem, glede na površino membrane, dodali ustrezen volumen hranilnega medija. Polovici kultur na poroznih membranah smo v medij dodali približno $1,5 \text{ cm}^2$ velike koščke intaktne amnijske membrane. Druga polovica kultur, ki je rasla brez vpliva amnijske membrane, pa nam je služila za kontrolo. Naslednji dan smo celične kulture sprali s svežim

medijem, s čimer smo odstranili odmrle, nepritrjene celice. Celične kulture smo gojili v inkubatorju (*Heracell*, *Heraeus*) pri konstantni temperaturi 37 °C, 5 % CO₂ atmosferi ter pri 100 % relativni zračni vlažnosti.

Dva do tri dni pred konfluentnim stanjem smo začeli meriti transepitelijsko upornost celic, ki so rasle na poroznih membranah, s površino 0.9 cm². Celice na poroznih membranah, površine 4.2 cm², ter vpetih amnijskih membranah smo po treh in sedmih tednih gojenja fiksirali in pripravili preparate za svetlobno ter elektronsko mikroskopijo.



Slika 2: A-C: Različne podlage za nasajanje celic. **A)** Gojivne stekleničke, različnih površin. **B)** Obročasti nosilci za vpenjanje membran. **C)** V plastične nosilce vpete porozne membrane (→) ter prilegajoče večprekatne petrijevke.



Shema 3: Shematski prikaz poskusov. Polovici celičnih kultur (urotelijske celice, obarvane modro) na sintetičnih nosilcih (obarvani sivo) smo v medij dodali intaktno amnijsko membrano (AMsp), polovica, ki je rasla brez vpliva amnijske membrane, pa nam je služila za kontrolo. Amnijsko membrano smo kot nosilec uporabili na tri načine – celice smo nasadili na intaktno (AEC, obarvane rdeče) in golo amnijsko membrano (bazalna lamina, obarvana belo) ter na vezivno tkivo intaktne amnijske membrane (obarvano vijolično). Površina vpetih amnijskih membran in površina v medij pod porozne membrane dodanih koščkov amnijske membrane je bila 1.5 cm².

3.4 HRANILNI MEDIJ

Uporabljali smo hranilni medij, prilagojen za gojenje urotelijskih celic. Osnova hranilnega medija sta medija MCDB153 (*Sigma*) in A-DMEM (*Advanced-Dulbecco's modification of Eagle's medium*), natančnejša sestava pa je prikazana v preglednici (Preglednica 1). Hranilni medij smo celičnim kulturam na poroznih in vpetih amnijskih membranah menjavali dnevno, le ob vikendih ne.

Preglednica 1: Sestava hranilnega medija, prilagojenega za gojenje urotelijskih celic

SESTAVINE MEDIJA	KONCENTRACIJE V MEDIJU
MCDB153 (<i>Sigma</i>)	50 %
A-DMEM (<i>Gibco</i>)	50 %
Adenine (<i>Sigma</i>)	15 µg/ml
Insulin (<i>Sigma</i>)	5 µg/ml
Hidrokortizon (<i>Sigma</i>)	0,5 µg/ml
Fosfoetanolamin (<i>Sigma</i>)	0,1 mM
Glutamax (<i>Gibco</i>)	4 mM
Streptomicin (<i>KC</i>)	100 µg/ml
Penicilin (<i>KC</i>)	100 µg/ml
FBS (<i>Gibco</i>)	2,5 %

3.5 PRIPRAVA PREPARATOV ZA ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO

Po treh oziroma sedmih tednih gojenja smo urotelijske celice, nasajene na porozne membrane, s površino 4.2 cm², in celice, nasajene na vpete (intaktne, gole in z vezivnim tkivom navzgor obrnjene) amnijske membrane, pripravili za elektronsko mikroskopijo. Membrane smo odpeli

iz plastičnih nosilcev ter jih razrezali na manjše koščke, ki smo jih pripravili za elektronsko mikroskopijo. Za to smo pripravili tudi intaktno amnijsko membrano.

3.5.1 PRIPRAVA VZORCEV ZA PRESEVNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP

Celične kulture na poroznih oziroma amnijskih membranah ter intaktno amnijsko membrano smo fiksirali v 2.5 % glutaraldehidu ter 4,5 % paraformaldehidu v kakodilatnem puftru 2 uri in 45 minut, v temi, na 4 °C. Čez noč smo vzorce pri 4 °C pustili v 0.33 M saharozi v 0.1 M kakodilatnem puftru. Naslednji dan smo jih 1 uro, v temi in pri 4 °C, tretirali z 1 % OsO₄ v kakodilatnem puftru ter jih 2-krat po 5 minut spirali s kakodilatnim pufrom. Temu je sledila dehidracija v vrsti alkoholov z naraščajočimi koncentracijami: 15 minut v 30 % etanolu, 15 minut v 50 % etanolu, 30 minut v 70 % etanolu, 30 minut v 90 % etanolu ter 2-krat 30 minut v 100 % etanolu. Dehidrirane vzorce smo nato preložili v plastične modele za polimerizacijo ter jih postopoma vključili v umetno smolo Epon. Najprej za 90 minut v mešanico 100 % etanol: Epon (1:1) ter nato za 90 minut še v čisti Epon, vsakih 30 minut pa smo jih prenesli v svežega. Nazadnje smo plastične modele, zalite s smolo, dali v sušilnik. Polimerizacija je potekala 5 dni. Temperatura v sušilniku se je na vsakih 24 ur stopnjevala – prvi dan 35 °C, drugi 45 °C, tretji 60 °C, četrti 70 °C in peti dan 80 °C. Bloke vklopljenih membran z urotelijskimi celicami smo po tem času vzeli iz sušilnika, počakali, da so se na sobni temperaturi ohladili, ter jih vzeli iz modelov. Z ultramikrotomom (*Leica EM UC6*) smo narezali ultratanke rezine, debeline 50 nm, jih prenesli na predhodno pripravljene bakrene mrežice ter pustili, da so se posušile.

Preparate smo zatem kontrastirali. Najprej smo bakrene mrežice za 15 minut položili na površino kapljic nasičene raztopine uranil acetata, in sicer tako, da je bila rezina v stiku s tekočino. Mrežice smo nato 3-krat zaporedoma spirali v bi-distilirani vodi ter jih posušili na zraku. Sledilo je 10-minutno kontrastiranje z raztopino svinčevega citrata, ponovno 3-kratno spiranje z bi-distilirano vodo ter sušenje mrežic. Preparate smo pregledali s presevnim elektronskim mikroskopom (*Philips CM100*) pri pospeševalni napetosti 80 kV.

3.5.2 PRIPRAVA VZORCEV ZA VRSTIČNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP

Celične kulture na poroznih in amnijskih membranah ter intaktno amnijsko membrano smo fiksirali v 2 % paraformaldehidu in 2 % glutaraldehidu v kakodilatnem pufru 3 ure, v temi, na 4 °C. Vzorce smo čez noč pustili, in sicer pri 4 °C, v 0.2 M kakodilatnem pufru. Naslednji dan smo membrane v temi in pri 4 °C tretirali z 1 % OsO₄ v kakodilatnem pufru ter jih nato prenesli v kakodilatni pufer. Sledila je dehidracija v vrsti acetonov z naraščajočimi koncentracijami: 10 minut v 20 % acetonu, 10 minut v 50 % acetonu, 10 minut v 70 % acetonu, 10 minut v 90 % acetonu ter 2-krat 10 minut v 100 % acetonu. Nadaljevali smo s sušenjem pri kritični točki. Osušene vzorce smo prilepili na valjaste kovinske nosilce in jih z aparaturo za napraševanje kovin prekrili s tanko plastjo zlata. Preparate smo pregledali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (*Jeol 840A*).

3.6 PRIPRAVA PARAFINSKIH VZORCEV

Za pripravo parafinskih vzorcev smo fiksirali intaktno amnijsko membrano ter amnijsko membrano, ki smo jo 11 in 22 minut tretirali s termolizinom. Amnijske membrane smo čez noč, in sicer v temi, fiksirali v 4 % paraformaldehidu v PBS, na 4 °C. Po fiksaciji smo vzorce trikrat spirali v PBS, tako da smo ga vsake pol ure zamenjali s svežim. Stekleničke so bile med spiranjem na stresalniku, da je bilo spiranje učinkovitejše. Zatem smo vzorce dehidrirali v vrsti alkoholov, z naraščajočimi koncentracijami: 15 minut v 50 % etanolu, 15 minut v 70 %, 15 minut v 90 % ter 15 minut v 100 % etanolu. Sledilo je bistrenje s ksilolom. Najprej smo vzorce za 15 minut prestavili v mešanico 100 % etanol-ksilol (2:1), nato za 15 minut v 100 % etanol-ksilol (1:1), nazadnje za 30 minut še v čisti ksilol. Tudi med bistrenjem smo imeli stekleničke z vzorci ves čas na stresalniku. Nato smo jih vklopili v parafin. Prvič smo jih v parafinu pustili 2 uri, nato smo jih prenesli v svež parafin in pustili čez noč. Po pripravi parafinskih blokov smo z mikrotomom (*Leica RM 2135*) narezali parafinske rezine, debeline 5 µm, ki smo jih pritrdili na objektno steklo. Nazadnje smo parafinske rezine obarvali s

hematoksilinom in eozinom ter jih pregledali s svetlobnim mikroskopom (*Nikon Eclipse E200*).

3.7 IMUNOFLUORESCENTNO OZNAČEVANJE PROTEINOV

Po treh in sedmih tednih gojenja smo urotelijske celice, nasajene na porozne membrane, s površino 4.2 cm², ter celice, nasajene na vpete (gole, intaktne in z vezivnim tkivom navzgor obrnjene) amnijske membrane, imunofluorescentno označili. Membrane smo izrezali oziroma odpeli iz plastičnih nosilcev ter jih razrezali na manjše koščke, s katerimi smo nato postopek imunofluorescentnega označevanja nadaljevali. Poleg celičnih kultur smo imunofluorescentno označili tudi intaktno amnijsko membrano.

Po končanem postopku smo pripravljene preparate pregledali ter poslikali s kamero na fluorescenčnem mikroskopu *Axiomager.Z1* z dodatkom *ApoTome* (*Zeiss*), s katerim lahko posnamemo več optičnih rezin.

3.7.1 OZNAČEVANJE KROMATINA S FLUORESCENTNIM BARVILOM DAPI

Fluorescentno barvilo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) se specifično veže na kromatin. Ob vezavi barvila na DNA jedra fluorescirajo modro. Barvilo je vključeno v medij proti bledenju (*Vectashield*), ki ohranja fluorescenco vseh uporabljenih barvil. Membranam, ki smo jih pripravljali za imunofluorescenco, smo, preden smo jih pokrili s krovnikom, vedno dodali kapljico *Vectashield* s fluorescentnim barvilom DAPI.

3.7.2 IMUNOFLUPRESCENTNO OZNAČEVANJE AMNIJSKIH EPITELIJSKIH CELIC

3.7.2.1 Imunofluorescenca proteina tesnih stikov – okludina

Da bi dokazali prisotnost okludina, smo intaktno amnijsko membrano fiksirali v 100 % etanolu, predhodno ohlajenem na - 30 °C. Po 25 minutah fiksacije na sobni temperaturi smo nadaljevali s 15 minutnim spiranjem s PBS. Intaktno amnijsko membrano smo nato 30 minut inkubirali v blokirnem pufru (1 % BSA v PBS). Sledila je inkubacija (čez noč, 4 °C) s primarnimi zajčjimi poliklonskimi protitelesi proti okludinu (*Invitrogen*), razredčenimi 1:20. Naslednji dan smo membrano 20 minut spirali s PBS ter jo nato za 90 minut inkubirali v temi s kozjimi sekundarnimi protitelesi, narejenimi proti zajčjim antigenom IgG, konjugiranimi z Alexa Fluor 488 (*Invitrogen*) in razredčenimi 1:400. Sledilo je ponovno spiranje s PBS. Nazadnje smo amnijsko membrano prenesli na objektna stekelca, jo raztegnili, nanjo kanili kapljico *Vectashield* s fluorescentnim barvilom DAPI ter jo pokrili s krovnikom.

3.7.2.2 Imunofluorescenca proteina dezmosomov – dezmozoplakina

Intaktno amnijsko membrano smo za lokalizacijo dezmozoplakina po 5-minutni fiksaciji v metanolu, predhodno ohlajenem na - 20 °C, 30 sekund fiksirali še v acetonu, ohlajenem na - 20 °C. Nadaljevali smo s 15-minutnim spiranjem s PBS in 30-minutno inkubacijo v blokirnem pufru (2 % BSA v PBS). Sledila je inkubacija (čez noč, 4 °C) s primarnimi mišjimi poliklonskimi protitelesi proti dezmozoplakinu (*Harlan Sera-Lab*), razredčenimi 1:50. Naslednji dan smo amnijsko membrano 20 minut spirali s PBS ter jo nato za 90 minut v temi inkubirali s kozjimi sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi z Alexa Fluor 488 (*Invitrogen*) ter razredčenimi 1:400. Sledilo je ponovno spiranje s PBS. Nazadnje smo amnijsko membrano prenesli na objektna stekelca, jo raztegnili, nanjo dodali kapljico *Vectashield* s fluorescentnim barvilom DAPI in jo pokrili s krovnikom.

3.7.3 IMUNOFLUORESCENTNO OZNAČEVANJE UROTELIJSKIH CELIC

3.7.3.1 Imunofluorescenca proteina tesnih stikov – okludina

Celične kulture na poroznih in amnijskih membranah smo za dokazovanje okludina fiksirali v 100 % etanolu, predhodno ohlajenem na - 30 °C. Po 25 minutah fiksacije na sobni temperaturi smo nadaljevali s 15-minutnim spiranjem s PBS. Nato smo kulture 30 minut inkubirali v blokirnem pufru (1 % BSA v PBS). Sledila je inkubacija (čez noč, 4 °C) s primarnimi zajčjimi poliklonskimi protitelesi proti okludinu (*Invitrogen*), razredčenimi 1:20. Naslednji dan smo celične kulture 20 minut spirali s PBS ter jih nato za 90 minut inkubirali v temi s kozjimi sekundarnimi protitelesi, narejenimi proti zajčjim antigenom IgG, konjugiranimi z Alexa Fluor 488 (*Invitrogen*) ter razredčenimi 1:400. Sledilo je ponovno spiranje s PBS. Nazadnje smo membrane s celičnimi kulturami prenesli na objektna stekelca, nanje dodali kapljico *Vectashield* s fluorescentnim barvilom DAPI ter jih pokrili s krovnikom.

3.7.3.2 Imunofluorescenca uroplakinov

Celične kulture na poroznih in amnijskih membranah smo za dokazovanje uroplakinov fiksirali v 100 % etanolu, predhodno ohlajenem na - 30 °C. Po 25 minutah fiksacije na sobni temperaturi smo nadaljevali s 15-minutnim spiranjem z PBS. Nato smo kulture 30 minut inkubirali v blokirnem pufru (1 % BSA v PBS). Sledila je inkubacija (čez noč, 4 °C) s primarnimi zajčjimi poliklonskimi protitelesi proti vsem štirim uroplakinom (*darilo prof. dr. T.-T. Sun*), razredčenim 1:1000. Naslednji dan smo celične kulture 20 minut spirali s PBS ter jih nato za 90 minut v temi inkubirali s kozjimi sekundarnimi protitelesi, narejenimi proti zajčjim antigenom IgG, konjugiranimi z Alexa Fluor 488 (*Invitrogen*), razredčenimi 1:400. Sledilo je ponovno spiranje s PBS. Nazadnje smo membrane s celičnimi kulturami prenesli na objektna stekelca, nanje dodali kapljico *Vectashield* s fluorescentnim barvilom DAPI ter jih pokrili s krovnikom.

3.8 ANALIZA FLUORESCENCE SLIK PRAŠIČJIH UROTELIJSKIH CELIC

3.8.1 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI UROPLAKINOV NA POVRŠINI PRAŠIČJIH UROTELIJSKIH CELIC

Primerjali smo urotelijske celice, nasajene na intaktno ter golo amnijsko membrano, celice, ki so rasle na vezivnem tkivu amnijske membrane ter urotelijske celice, nasajene na porozno membrano, pod katero smo položili 1,5 cm² koščke amnijske membrane. Kot kontrolo smo uporabili porozne membrane, ne da bi v medij dodali amnijske membrane. Po opisanem postopku smo uroplakine imunofluorescentno označili, pripravili preparate ter jih poslikali s fluorescenčnim mikroskopom *Axiomager.Z1* z dodatkom *ApoTome* (*Zeiss*). Za vsak preparat smo pri objektivu z 20-kratno lastno povečavo posneli dvajset naključnih posnetkov. S pomočjo programa *AxiomVision 4.8* smo v okvirju, površine 15336 μm², izmerili površine celic z uroplakini. Podatke smo zbrali v preglednici, izračunali povprečno vrednost, standardno napako ter s Studentovim t-testom ugotavljali, ali so med celicami, ki so rasle na različnih podlagah, statistično značilne razlike.

3.8.2 UGOTAVLJANJE INTENZITETE FLUORESCENCE UROPLAKINOV

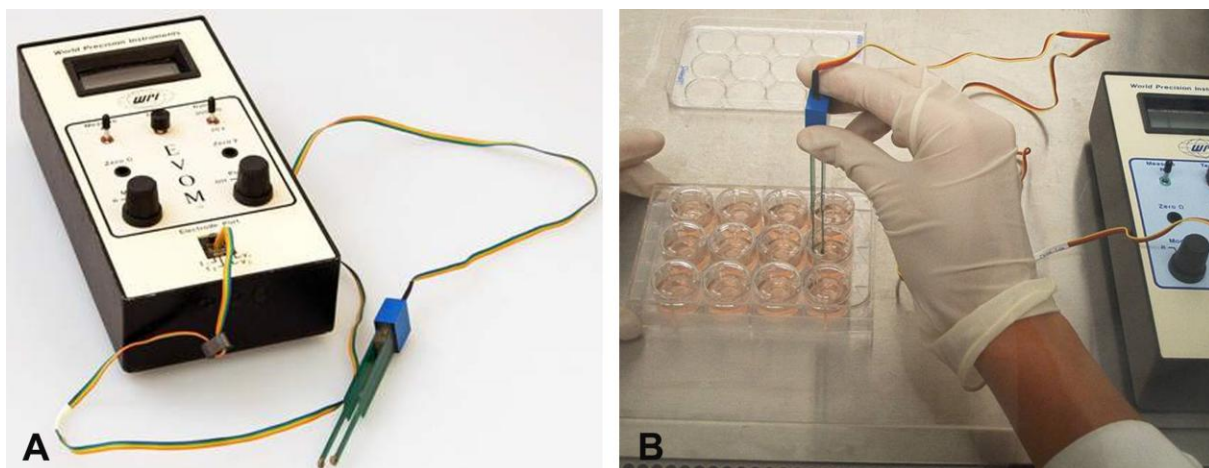
Prašičje urotelijske celice, ki smo jih nasadili na intaktno ter golo amnijsko membrano, na vezivno tkivo amnijske membrane ter na porozno membrano, pod katero smo v medij položili 1,5 cm² koščke amnijske membrane, in tudi tiste, nasajene na kontrolno porozno membrano, smo označili s protitelesi proti uroplakinom. Po opisanem postopku smo pripravljene preparate poslikali s fluorescenčnim mikroskopom *Axiomager.Z1* z dodatkom *ApoTome* (*Zeiss*). Za vsak preparat smo pri objektivu z 20-kratno lastno povečavo naredili dvajset naključnih posnetkov. S pomočjo programa *AxiomVision 4.8* smo na površini 15336 μm² izmerili intenziteto fluorescence, pri čemer smo vse izmerjene vrednosti preračunali na enak čas osvetlitve (200 ms). Podatke smo zbrali v preglednici, izračunali povprečno vrednost, standardno napako ter s Studentovim t-testom preverili, ali so med celicami, ki so rasle na različnih nosilcih, statistično značilne razlike.

3.8.3 UGOTAVLJANJE RAZPOREDITVE UROPLAKINOV PO Z-OSI

Prašičje urotelijske celice, nasajene na sintetične nosilce, in celice, ki so rasle na intaktni in goli amnijski membrani ter na vezivnem tkivu amnijske membrane, smo po treh in sedmih tednih gojenja označili s protitelesi proti uroplakinom. Po opisanem postopku pripravljene preparate smo poslikali s fluorescenčnim mikroskopom *Axiomager.Z1* z dodatkom *ApoTome* (*Zeiss*). Vsak preparat smo pri objektivu s 63-kratno lastno povečavo poslikali v več optičnih rezinah. S pomočjo programa *AxiVision 4.8* smo v vsaki optični rezini izmerili intenziteto fluorescence uroplakinov in za vsako izmerjeno celico določili profil razporeditve uroplakinov po z-osi. Podatke smo zbrali v preglednici, izračunali povprečno vrednost in standardno napako ter s Studentovim t-testom ugotavljali, ali se urotelijske celice, nasajene na različne nosilce, in celice, ki smo jih gojili različno dolgo časa, v razporeditvi uroplakinov statistično značilno razlikujejo.

3.9 MERJENJE TRANSEPITELIJSKE UPORNOSTI

Transepitelijska upornost urotelija, ki so ga tvorile prašičje urotelijske celice v kulturi, smo merili z epitelijskim voltmetrom (*EVOM & EVOMX*, *WPI*, *Sarasota*) in s pripadajočim parom elektrod (*STX2*, *WPI*, *Sarasota*). Epitelijski voltmeter s parom kombiniranih elektrod se uporablja za merjenje toka in upornosti pri epitelijskih kulturah, nasajenih na porozne membrane, s površino 0.9 cm^2 . Transepitelijsko upornost merimo tako, da elektrodi potopimo v medij ob porozni membrani in nad njo. Postopek izvedemo tako, da se daljša elektroda dotika dna petrijevke, krajšo elektrodo pa potopimo v medij tik nad porozno membrano z urotelijskimi celičnimi kulturami. Pomembno je, da sta elektrodi ob merjenju postavljeni pravokotno na porozno membrano (Slika 3).



Slika 3: **A)** Epitelijski voltmetr (EVOM & EVOMX) s pripadajočim parom elektrod (STX2). **B)** Merjenje TER na poroznih membranah, površine 0.9 cm^2 . Med merjenjem elektrodi postavimo pravokotno na porozno membrano.

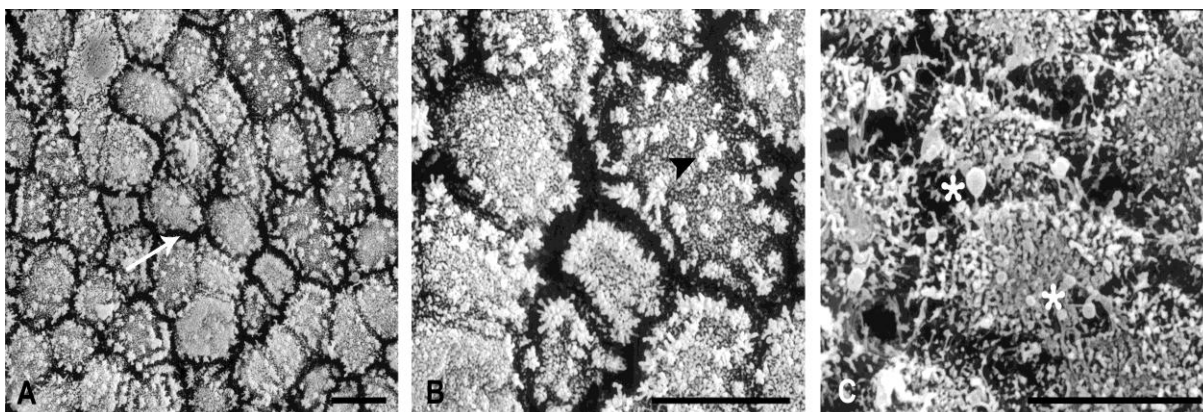
K izmerjeni transepitelijski upornosti prispevata, poleg dejanske TER celic, tudi upornost porozne membrane in upornost medija. Da smo dobili dejansko TER urotelijskih celičnih kultur, smo izmerili TER prazne porozne membrane v mediju ter jo odšteli od izmerjenih vrednosti TER. Upornost praznih poroznih membran je znašala $150 \pm 0.01 \Omega\text{cm}^2$.

Z merjenjem TER prašičjih urotelijskih kultur smo začeli dva do tri dni, preden so te dosegle konfluentnost. Merili smo TER urotelijskih celičnih kultur, nasajenih na porozne membrane, pod katere smo položili v medij približno $1,5 \text{ cm}^2$ koščke intaktne amnijske membrane (N=6), in TER urotelijskih kultur na poroznih membranah brez dodane amnijske membrane - te so nam služile za kontrolo (N=14). Meritve smo, z izjemo vikendov, opravljali vsak dan. Na vsaki porozni membrani smo dnevno opravili po eno meritev. Izmerjene vrednosti smo nato zbrali v preglednici, izračunali povprečno vrednost, standardno napako ter s Studentovim t-testom ugotavljali, ali so med kulturami, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane, in kulturami brez amnijske membrane v mediju statistično značilne razlike.

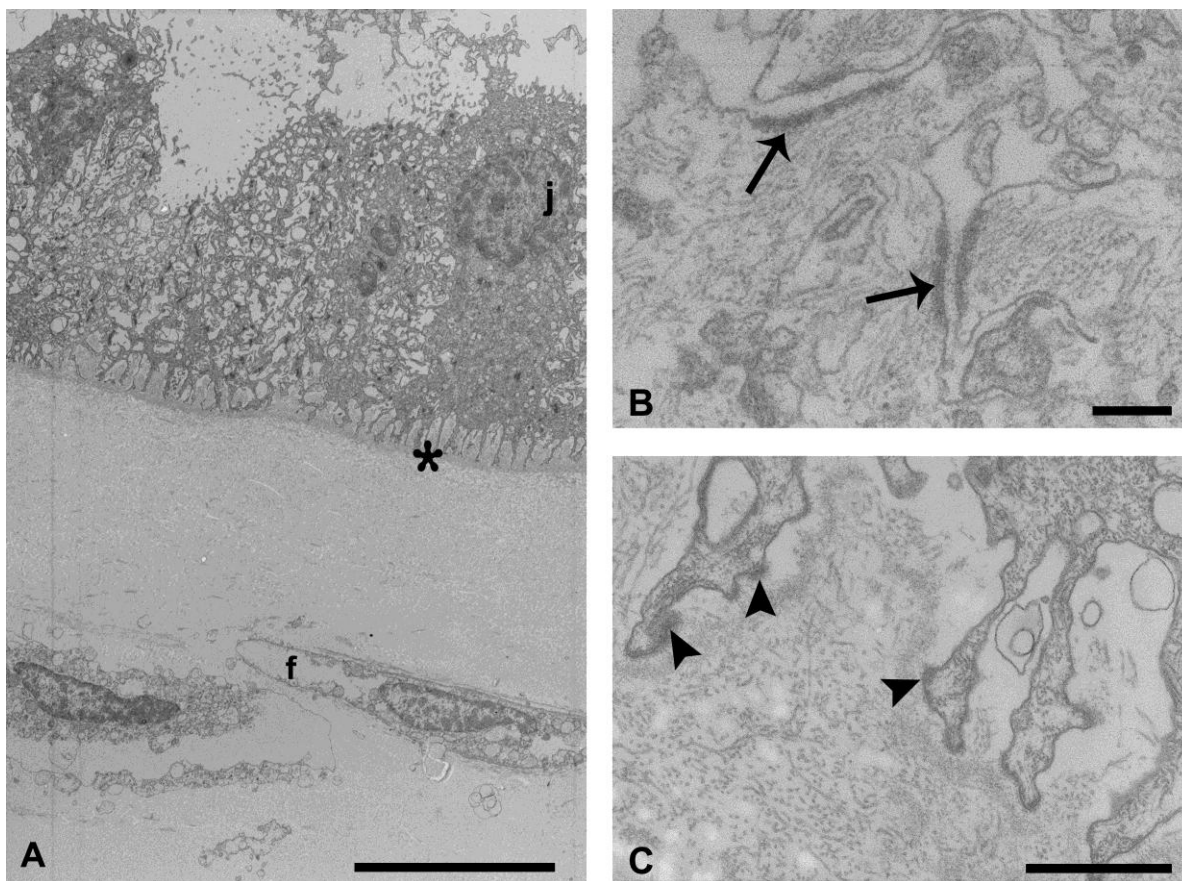
4 REZULTATI

4.1 ULTRASTRUKTURNE ZNAČILNOSTI AMNIJSKE MEMBRANE

Pri poskusih smo uporabljali amnijske membrane, ki so bile leto in pol zamrznjene na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ugotovili smo, da se morfologija amnijske membrane med shranjevanjem ni bistveno spremenila. Amnijska membrana je bila zgrajena iz enoskladnega epitelijskega tkiva, iz kompaktne plasti, plasti fibroblastov ter gobaste plasti. Epitelij amnijske membrane so tvorile enojedrne celice, kubične do visokoprizmatске oblike, ki so jih povezovali številni dezmosomi. Na bazalni strani so AEC tvorile značilne stebričasto urejene izrastke – pedicelne - na bazalno lamino, debeline približno 100 nm, pa so se pritrdile s hemidezmosomi (Slika 5). Apikalna plazmalema epitelijskih celic je bila oblikovana v številne mikrovile, ki so bili pogosto razvejani ali celo zraščeni skupaj. Poleg teh smo na površini celic opazili še posebne strukture, tako imenovane mehurčke. Dobro so bili vidni tudi prekinjeni tesni stiki (Slika 4).



Slika 4: A-B: Površina poligonalno oblikovanih AEC. **A)** V pozni nosečnosti pride zaradi različnih dejavnikov do prekinitve tesnih stikov med sosednjimi AEC (\rightarrow). **B)** Apikalna plazmalema AEC je oblikovana v številne mikrovile, ki so pogosto zraščeni (\blacktriangleright), ter kroglaste strukture - mehurčke (*). Merilce: 10 μm .

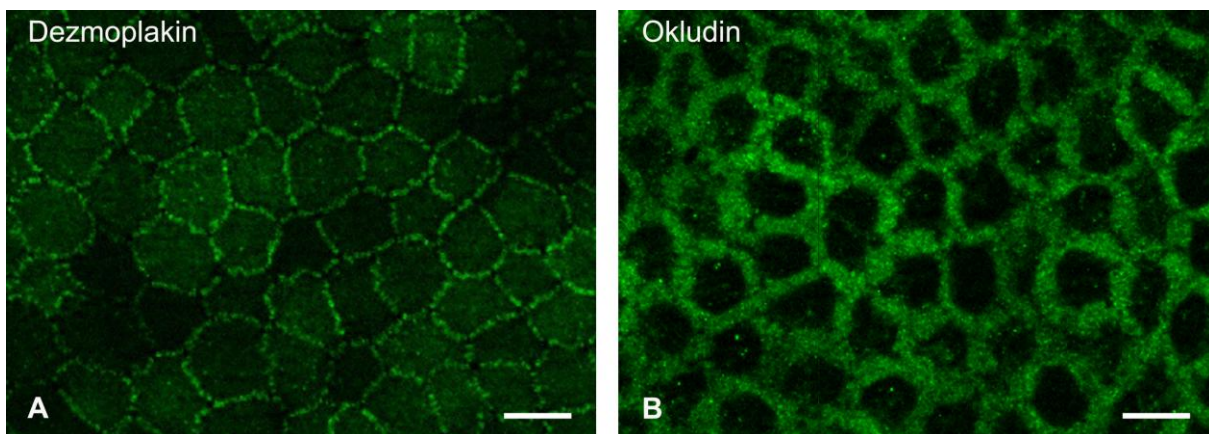


Slika 5: A-C: Ultrastruktura AEC. **A)** AEC so kubične do visokoprizmatske oblike. So enojedrne celice, z apikalno nameščenimi jedri (**j**), nepravilnih oblik, in s specialno razporeditvijo heterokromatina. Apikalna površina AEC je oblikovana v številne mikrovile. Pod kompaktno plastjo je plast fibroblastov – fibroblast (**f**). **B)** Sosednje celice se med seboj povezujejo s številnimi dezmosomi (→). **C)** Na bazalni strani AEC tvorijo stebričasto urejene izrastke, pedicela (* na **A**), s pomočjo katerih se sidrajo v spodnje tkivo. Na bazalno lamino se pritrjajo s hemidezmosomi (▶). Merilce: **A)** 10 μ m, **B)** 200 nm, **C)** 500 nm.

Čeprav morfologija amnijske membrane tudi po daljšem shranjevanju ostane nespremenjena, je viabilnost AEC vprašljiva. Celice so bile poškodovane in so v citoplazmi vsebovale številne vakuole.

4.2 IMUNOFLUORESCENTNO OZNAČEVANJE STIČNIH PROTEINOV AMNIJSKE MEMBRANE

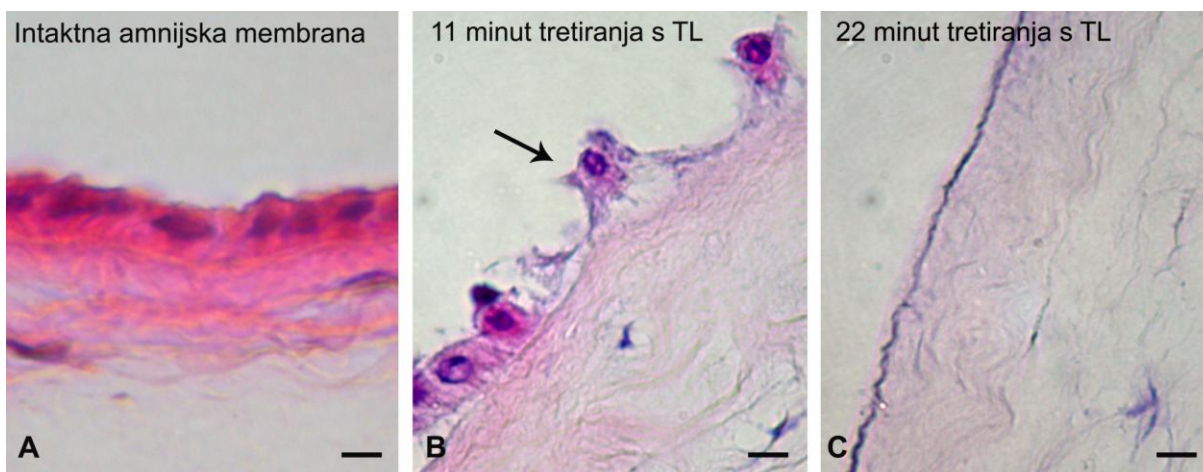
S protitelesi proti dezmozplakinu in okludinu smo med sosednjimi AEC preučevali prisotnost dezmosomov in tesnih stikov. Dokazali smo prisotnost obeh proteinov (Slika 6), s tem da imunofluorescenca okludina ni bila tipična. Ponavadi se okludin pojavlja v tankih sklenjenih črtah na mestih lateralne plazmaleme celic, v našem primeru pa so bile linije, ki dokazujejo prisotnost okludina, širše ter precej razpršene, kar verjetno nakazuje na prekinitev tesnih stikov med sosednjimi AEC.



Slika 6: A-B) Imunofluorescentno označena dezmozplakin in okludin. **A)** Imunofluorescentno označen dezmozplakin med sosednjimi AEC. **B)** Imunofluorescenca okludina. Razpršene črte najverjetneje kažejo na prekinitev tesnih stikov v pozni nosečnosti. Merilce 10 μ m.

4.3 DEEPISELIZACIJA AMNIJSKE MEMBRANE

Za odstranitev AEC smo uporabili proteolitični encim termolizin. Amnijsko membrano smo najprej 11 minut tretirali s termolizinom, zatem pa smo čas inkubacije z encimom podvojili. V primeru 11-minutnega delovanja encima je bilo na bazalni lamini še vedno opaziti delno pritrjene amnijske epitelijske celice, po 22-minutnem delovanju termolizina pa celic na bazalni lamini nismo opazili (Slika 7).



Slika 7: A-C) Odstranjevanje AEC s termolizinom. Parafinske rezine. **A)** Intaktna amnijska membrana. Na bazalni lamini leži enoskladen epitelij amnijske membrane. **B)** Po 11 minutah delovanja termolizina (TL) na bazalni lamini še vedno lahko opazimo posamezne, delno pritrjene AEC (→). **C)** TL po 22-minutnem delovanju AEC popolnoma odstrani. Merilce: 10 μ m.

4.4 CELIČNE KULTURE

Rast sekundarnih kultur prašičjih urotelijskih celic IV. in V. pasaže smo redno spremljali z invertnim svetlobnim mikroskopom. Hitrost rasti se je razlikovala v odvisnosti od podlage, na katero so bile celične kulture nasajene.

4.4.1 UROTELIJSKE CELICE, NASAJENE NA SINTETIČNI NOSILEC

Da bi ugotovili, ali amnijska membrana vpliva na rast in diferenciacijo urotelijskih celic, smo približno 1,5 cm² velike koščke amnijske membrane položili v medij pod sintetične nosilce (porozne membrane), velikosti 4.2 cm², na katere smo z gostoto 2×10^5 nasadili prašičje urotelijske celice IV. ali V. pasaže. Za kontrolo smo urotelijske celice nasadili na porozne membrane brez amnijske membrane v mediju pod njimi.

Med celicami, nasajenimi na porozne membrane, pod katere smo v medij položili amnijsko membrano, ter celicami na kontrolnih membranah nismo opazili razlike v hitrosti rasti. Že prvi dan po nasaditvi smo v obeh primerih opazili manjše otočke celic (Slika 8), konfluentno stanje pa so celice dosegle po približno enem tednu gojenja. Med četrtem in petim tednom gojenja so začele celice tvoriti večskladne skupke celic na kontrolni in tudi na membrani z amnijsko membrano v mediju pod njimi.

4.4.2 UROTELIJSKE CELICE, NASAJENE NA INTAKTNO IN GOLO AMNIJSKO MEMBRANO

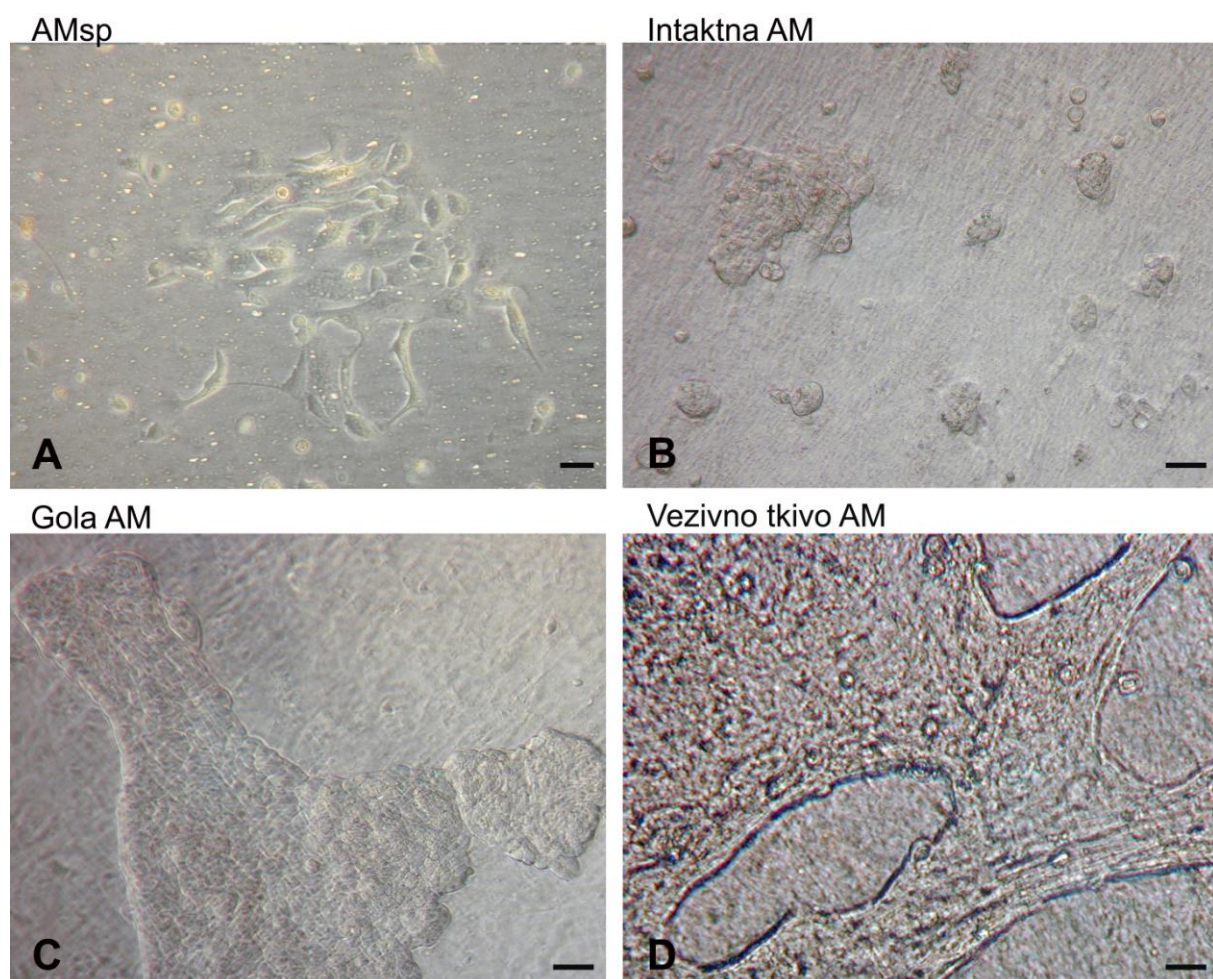
Urotelijske celice IV. in V. pasaže smo z gostoto 2×10^5 nasadili na intaktno in golo amnijsko membrano.

Celice, nasajene na intaktno amnijsko membrano, so, v primerjavi s tistimi, nasajenimi na golo amnijsko membrano, rasle počasneje. Takoj po nasaditvi so celice, nasajene na intaktno amnijsko membrano, tvorile okrogle otočke (Slika 8). Sprva do bili otočki majhni, okrog njih pa so bile jasno vidne AEC. Celice so v otočkih ostale približno deset dni, nato pa so se začele hitreje razraščati. Skupaj z rastjo urotelijskih celic smo opazili postopno zmanjševanje števila AEC.

Tudi celice, nasajene na golo amnijsko membrano, so prvi dan po nasaditvi tvorile majhne okrogle otočke, vendar so se, za razliko od celic, nasajenih na intaktno AM, že po dveh do treh dneh razrasle čez večjo površino (Slika 8). Na nobeni od membran niso celice po treh tednih gojenja dosegle konfluentnosti.

4.4.3 UROTELIJSKE CELICE, NASAJENE NA VEZIVNO TKIVO AMNIJSKE MEMBRANE

Urotelijske celice IV. Pasaže, nasajene na vezivno tkivo amnijske membrane, so v primerjavi s celicami, nasajenimi na ostale podlage, rasle najhitreje. Že v manj kot 24 urah po nasaditvi so tvorile večje otočke ter povezave med njimi (Slika 8). Rast celic se je v nadaljnjih dneh sicer nekoliko ustalila, kljub temu pa so v tednu dni dosegle konfluentno stanje.



Slika 8: A-D: Celične kulture, nasajene na različne podlage. **A)** Urotelijske celice, nasajene na porozno membrano, z amnijsko membrano v mediju pod njimi (AMsp), 24 ur po nasaditvi. **B)** Urotelijske celice, nasajene na intaktno amnijsko membrano (Intaktna AM), tvorijo prve dni po nasaditvi otočke celic. **C)** Urotelijske celice, nasajene na golo amnijsko membrano (Gola AM), teden dni po nasaditvi. V primerjavi s celicami, nasajenimi na intaktni amnijsko membrano, se urotelijske celice, nasajene na golo amnijsko membrano

razraščajo hitreje. **D)** Urotelijske celice, nasajene na vezivno tkivo amnijske membrane (Vezivno tkivo AM), 24 ur po nasaditvi. Merilce: 10 μm .

4.5 ULTRASTRUKTURNE ZNAČILNOSTI PRAŠIČJIH UROTELIJSKIH CELIC, NASAJENIH NA RAZLIČNE NOSILCE

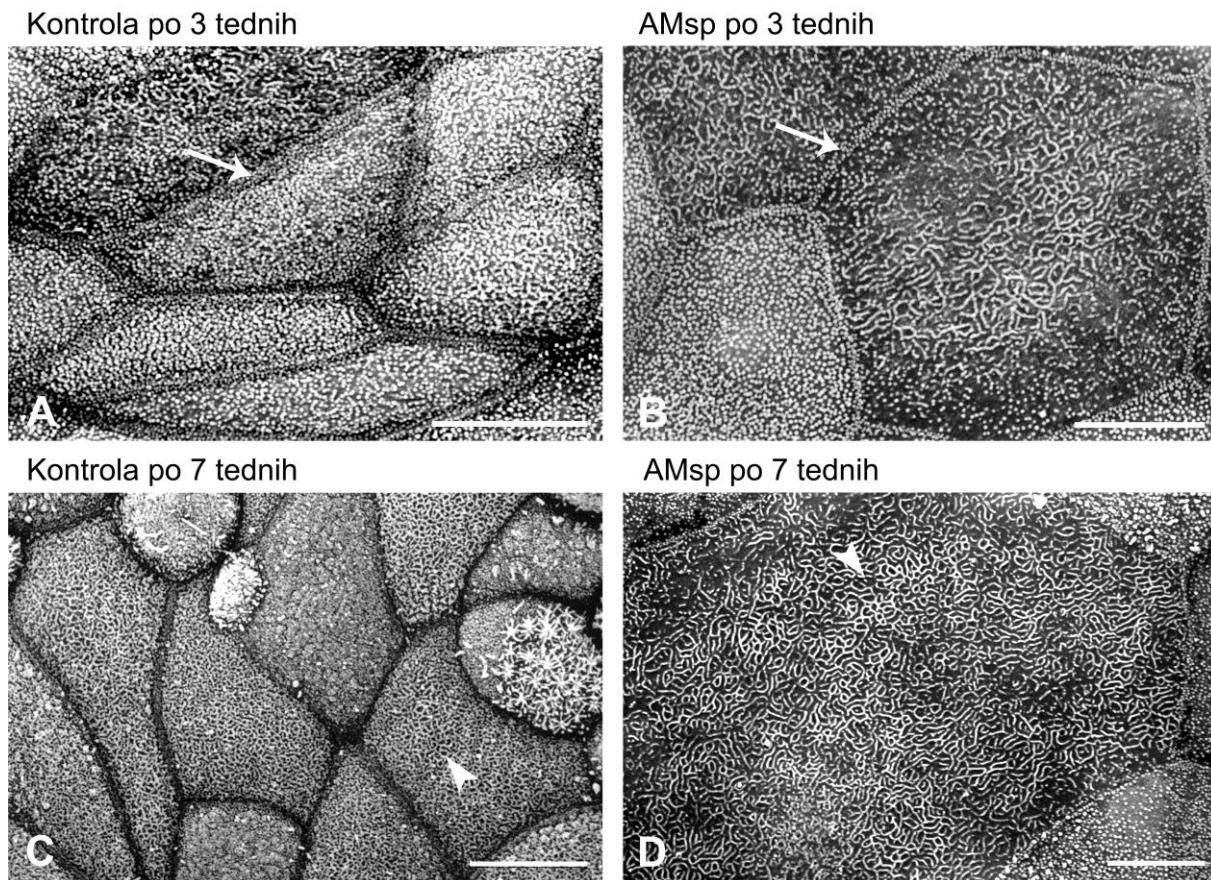
Po treh in sedmih tednih gojenja urotelijskih celičnih kultur na različnih nosilcih smo preparate urotelijskih celic pregledali s presevnim in vrstičnim elektronskim mikroskopom. Pri pregledovanju preparatov smo bili pozorni na značilne ultrastrukturne lastnosti, ki služijo kot pokazatelji diferenciranosti urotelijskih celic. Ugotovili smo, da urotelijske celice, nasajene na različne podlage, dosegajo različne stopnje diferenciranosti.

4.5.1 UROTELIJSKE CELICE, NASAJENE NA SINTETIČNI NOSILEC

Ultrastrukturo urotelijskih celic, ki so rasle na poroznih membranah pod vplivom amnijske membrane, smo primerjali z ultrastrukturo urotelijskih celic, nasajenih na kontrolne membrane. Po pregledovanju celic, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane, smo po treh tednih gojenja našli med nediferenciranimi celicami številne delno in dobro diferencirane celice. Nediferencirane celice so imele apikalno plazmalemo, oblikovano v mikrovile, medtem ko so se ti pri delno diferenciranih celicah povezovali v nesklenjene ter sklenjene grebene. Med sosednjimi celicami smo v večini primerov opazili dobro razvite tesne stike, poleg tega so bile dobro diferencirane celice večje od nediferenciranih. Nasprotno je bila apikalna površina večine celic, nasajenih na kontrolne membrane, oblikovana v mikrovile in smo delno ter dobro diferencirane celice našli le posamezno. Tudi tu smo na določenih predelih opazili dobro razvite tesne stike (Slika 9).

Po sedmih tednih gojenja celic je bila razlika med celicami kontrolnih membran ter celicami z amnijsko membrano v mediju pod njimi manjša. V obeh primerih smo dobro diferencirane

celice opazili predvsem na območjih z več skladi celic, medtem ko so v predelih z manj celičnih skladov prevladovala celice z mikrovili. Med celicami z velikim številom gosto posejanih mikrovilov smo našli številne temnejše celice z redkimi mikrovili, ki so bile večje v primerjavi z ostalimi celicami.

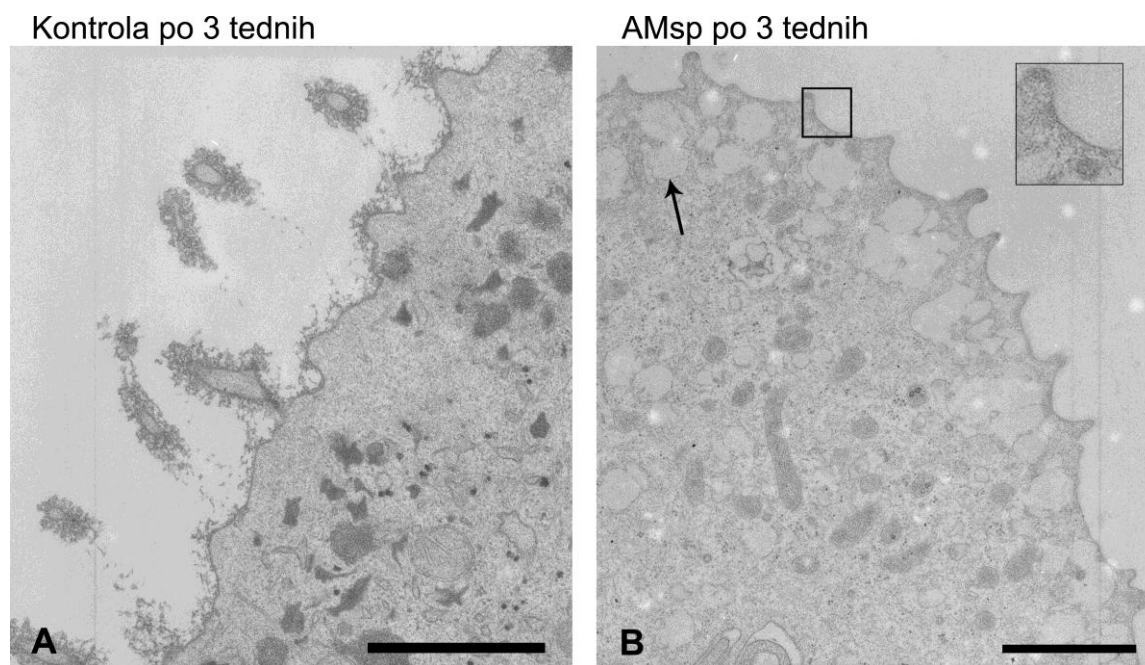


Slika 9: A-D: Površinske urotelijske celice, nasajene na sintetične nosilce, po treh in sedmih tednih gojenja. **A)** Apikalna plazmalema urotelijskih celic kontrolnih membran je bila po treh tednih v večini primerov oblikovana v mikrovile. **B)** Po treh tednih gojenja smo pri celičnih kulturah, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane (AMsp), opazili številne celice z nesklenjenimi oziroma sklenjenimi grebeni. V obeh primerih smo opazili dobro razvite medcelične povezave (\rightarrow). **C-D)** Po sedmih tednih je bila razlika med celicami, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane, ter celicami, nasajenimi na kontrolne membrane, manjša. V obeh primerih smo našli številne celice s sklenjenimi grebeni (\blacktriangleright). Celice, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane (**B, D**), so bile večje v primerjavi s celicami kontrolnih membran (**A, C**). Merilce: 10 μ m.

Rezultate, dobljene z vrstičnim elektronskim mikroskopom, smo potrdili z uporabo presevnega elektronskega mikroskopa. Celice, ki so rasle na porozni membrani, pod katero smo v medij položili amnijsko membrano, so bile v primerjavi s kontrolo bolj diferencirane. Apikalna površina dobro diferenciranih površinskih celic je bila na določenih mestih oblikovana v urotelijske plake, delno diferencirane celice pa smo prepoznali po združevanju mikrovilov. V apikalni citoplazmi dobro diferenciranih celic smo opazili vezikle, ki verjetno predstavljajo DFV. Apikalna površina večine celic kontrolnih membran je bila oblikovana v mikrovile. Bolj diferencirane celice, z značilno oblikovano apikalno plazmalemo ter DFV, so bile manj pogoste (Slika 10).

V obeh primerih so celice na stičnih površinah tvorile medcelične povezave, ki so bile vidne kot preplet oziroma zajede ene celice v drugo. Med sosednjimi površinskimi urotelijskimi celicami smo opazili tesne stike in pod njimi ležeče dezmosome. Celice so oblikovale tri do štiri celične sklade, vsebovale so številne mitohondrije ter dobro vidne skladovnice GA.

Kot pri vrstičnem elektronskem mikroskopu smo po daljšem času gojenja bolj diferencirane površinske celice našli na predelih z več celičnimi skladi.



Slika 10: A-B: Ultrastruktura površinskih urotelijskih celic, nasajenih na sintetične nosilce, po treh tednih gojenja. **A)** Apikalna plazmalema površinski celic, ki so rasle na kontrolnih membranah, je bila v večini primerov oblikovana v mikrovile, ob tem so bili DFV v apikalni citoplazmi manj številni. Pri celicah kontrolnih membran je bil glikokaliks na površini celic, če jih primerjamo s celicami, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane, izrazitejši. **B)** V apikalni plazmali številnih površinskih celic, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane (AMsp), so bili prisotni urotelijski plaki z odebeljeno apikalno plazmalemo (povečan okvirček). V apikalni citoplazmi površinskih celic smo opazili številne vezikle, ki najverjetneje predstavljajo DFV (→). Merilce: 1 µm.

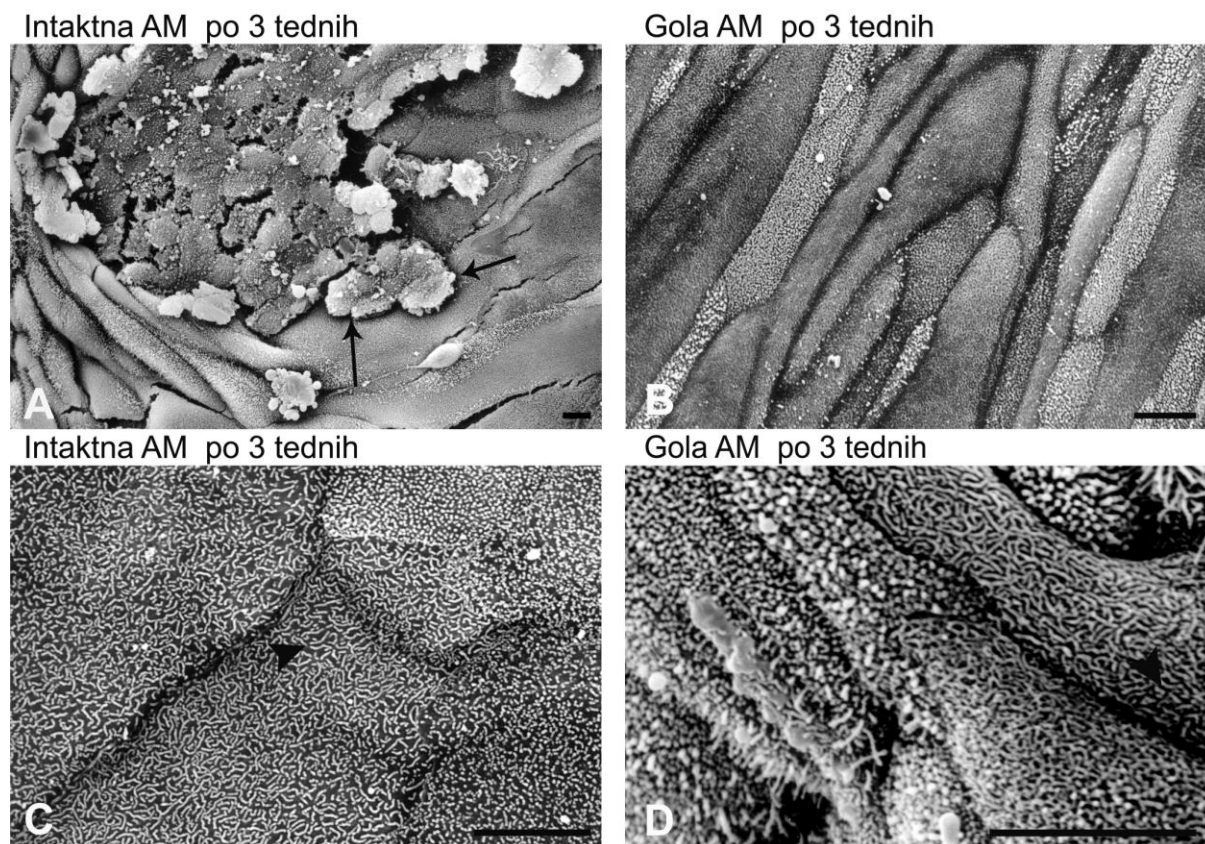
4.5.2 UROTELIJSKE CELICE, NASAJENE NA INTAKTNO IN GOLO AMNIJSKO MEMBRANO

V primerjavi s celicami, nasajenimi na sintetični nosilec, so bile celice, ki so rasle na amnijski membrani manj diferencirane. Med celicami, nasajenimi na intaktno ter golo amnijsko membrano, po treh tednih gojenja nismo opazili očitnih ultrastrukturnih razlik. V obeh primerih so prevladovale nediferencirane celice z mikrovili, med katerimi smo opazili večje, temnejše celice z redkimi mikrovili, in posamezne celice z nesklenjenimi ter sklenjenimi grebeni.

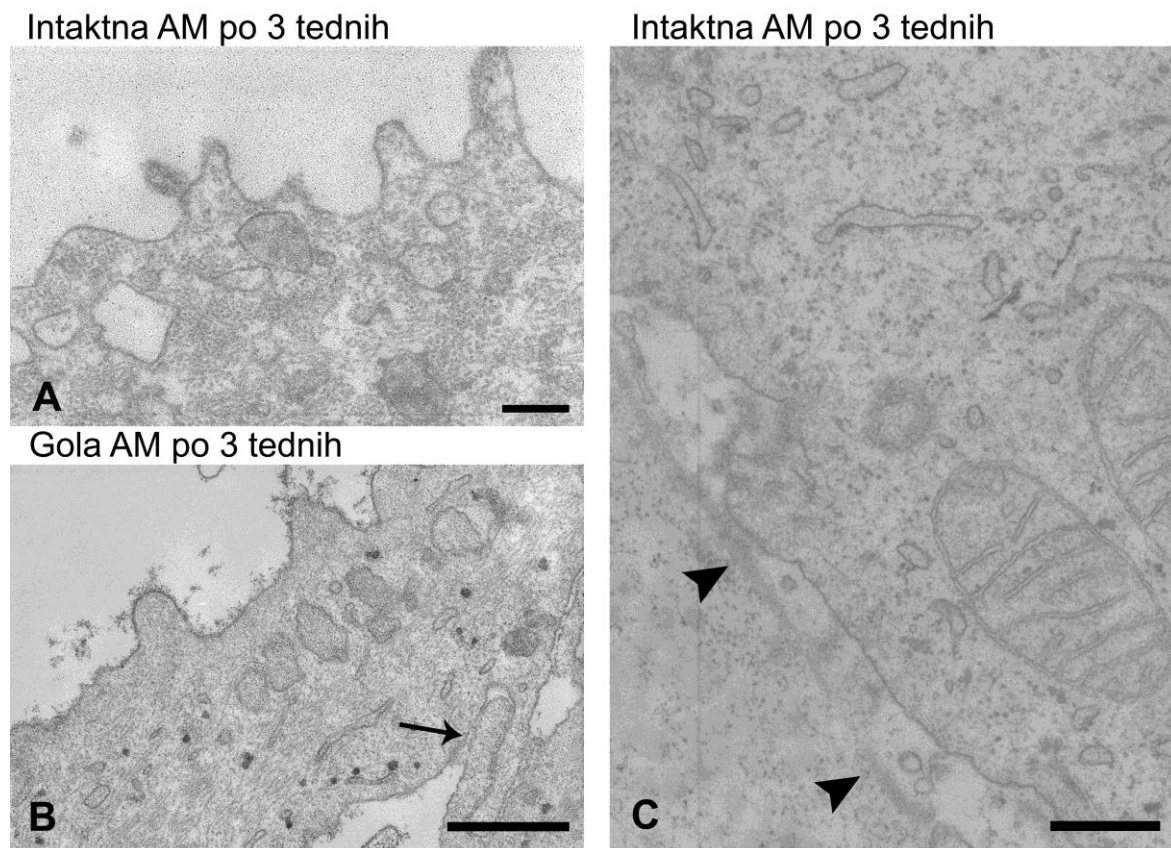
Celične kulture ob fiksaciji niso bile konfluentne, zato smo ob pregledovanju celic, nasajenih na intaktno amnijsko membrano, poleg urotelijskih celic, našli na določenih mestih tudi AEC, ki so bile poškodovane. Urotelijske celice so rasle ob AEC. Z njimi niso tvorile povezav, prav tako ni bilo videti, da bi jih preraščale (Slika 11).

Tudi rezultati, dobljeni s pomočjo presevnega elektronskega mikroskopa, kažejo na nizko diferenciranost urotelijskih celic, nasajenih na amnijsko membrano. Pri celicah, ki so rasle na intaktni, in pri celicah na goli amnijski membrani je bila apikalna površina večine celic po treh tednih gojenja oblikovana v mikrovile. Občasno smo med nediferenciranimi celicami našli posamezne delno diferencirane celice z združenimi mikrovili ter DFV v apikalni citoplazmi. Kot celice na sintetičnih nosilcih so tudi celice, nasajene na amnijsko membrano, tvorile prepletene medcelične povezave (Slika 12), poleg tega so se s sosednjimi celicami povezovali s tesnimi stiki in dezmosomi. V citoplazmi površinskih celic smo opazili številne mitohondrije ter dobro vidne skladovnice GA. Celice so bile urejene v tri celične sklade.

Pod urotelijskimi celicami, nasajenimi na intaktno amnijsko membrano, nismo opazili AEC, kar nakazuje, da jih urotelijske celice najverjetneje izpodrinejo. Bazalne urotelijske celice so se na intaktni in na goli amnijski membrani pritrjevale na bazalno lamino amnijske membrane (Slika 12).



Slika 11: A-D: Površinske urotelijske celice, nasajene na intaktno (Intaktna AM) in golo amnijsko membrano (Gola AM), po treh tednih gojenja. **A)** Poleg urotelijskih celic so bile na intaktni amnijski membrani prisotne tudi AEC (→). **B-D)** Med površinskimi celicami, nasajenimi na golo in intaktno amnijsko membrano, so prevladovale celice z mikrovili, med katerimi smo našli tudi celice z nesklenjenimi (▶) in redkeje s sklenjenimi grebeni. Merilce: 10 μm .



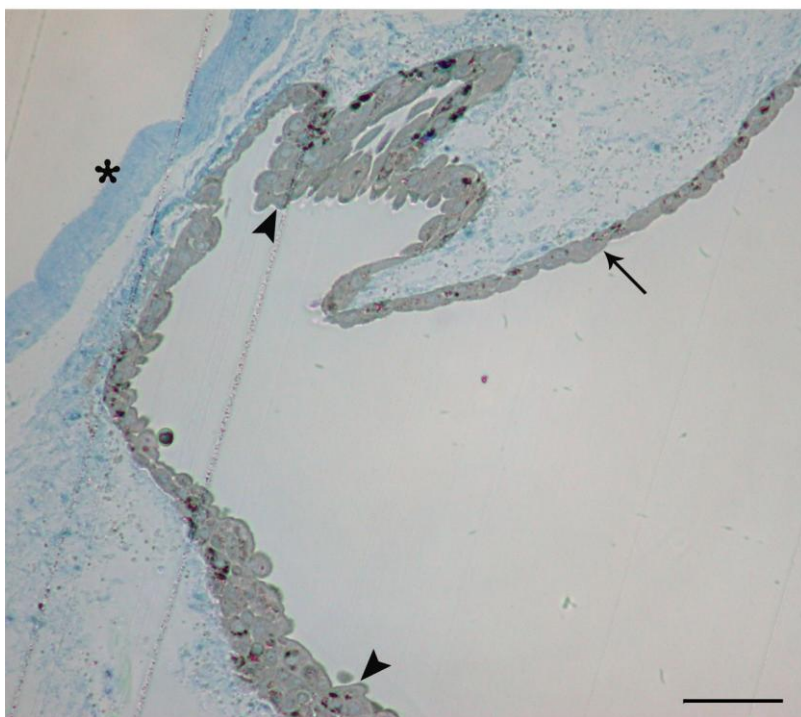
Slika 12: A-C: Ultrastruktura površinskih urotelijskih celic, nasajene na intaktno (Intaktna AM) in golo amnijsko membrano (Gola AM), po treh tednih gojenja. **A-B)** Tako pri celicah, ki so rasle na intaktni, kot pri celicah na goli amnijski membrani je bila apikalna površina večine celic oblikovana v mikrovile. Med nediferenciranimi celicami smo opazili tudi posamezne delno diferencirane celice z združenimi mikrovili (**A**). Sosednje celice so v obeh primerih tvorile prepletene medcelične povezave (\rightarrow). **C)** Bazalne urotelijske celice so se v obeh primerih pritrjevati na bazalno lamino amnijske membrane (\blacktriangleright). Merilce: **A)** 200 nm, **B-C)** 500 nm.

4.5.3 UROTELIJSKE CELICE, NASAJENE NA VEZIVNO TKIVO AMNIJSKE MEMBRANE

Urotelijske celice, ki so uspevale na vezivnem tkivu amnijske membrane, so, v primerjavi s celicami, nasajenimi na ostale podlage, dosegle najvišjo stopnjo diferenciranosti. Po treh tednih gojenja so oblikovale predele s štirimi oziroma petimi celičnimi skladi ter med njimi predele, kjer je bilo celičnih skladov manj (Slika 13). Tam, kjer je bilo celičnih skladov več,

je bila apikalna plazmalema večine površinskih celic oblikovana v sklenjene grebene (Slika 14). Kljub dobri diferenciaciji teh celic pa so bile celice na področjih z manj (dva do tri) celičnimi skladi slabo diferencirane. Apikalna površina večine celic na mestih z manjšim številom celičnih skladov je bila oblikovana v mikrovile, delno ter dobro diferencirane celice pa so bile redke.

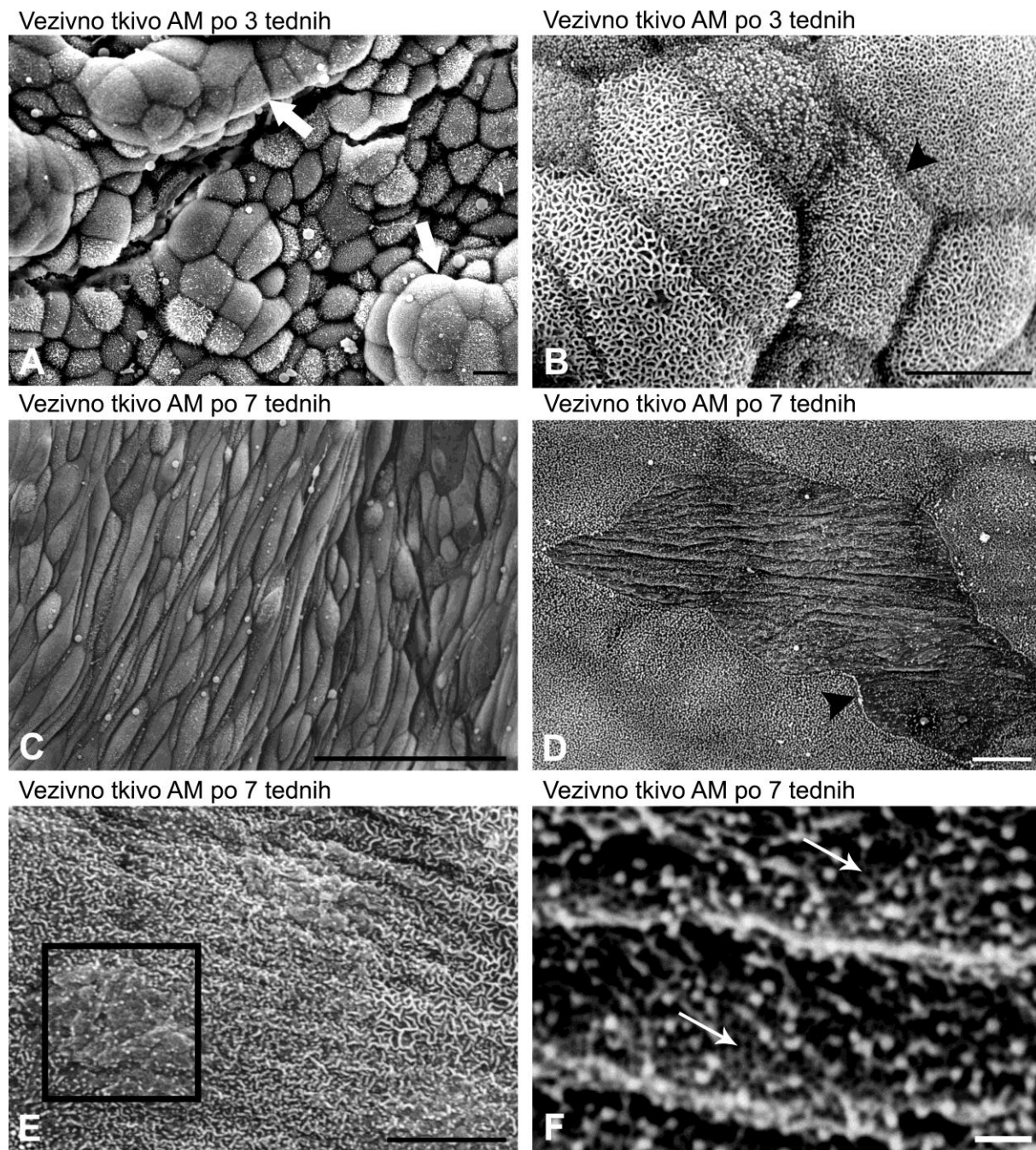
Vezivno tkivo AM



Slika 13: Urotelijske celice, nasajene na vezivno tkivo amnijske membrane, po treh tednih gojenja. Poltanka rezina. Celice, nasajene na vezivno tkivo amnijske membrane, so po treh tednih gojenja tvorile predele z več celičnimi skladi (▶) ter med njimi predele, kjer je bilo celičnih skladov manj (→). Celice so se pritrjevale na vezivo amnijske membrane, na nasproti ležeči strani so bile AEC (*). Merilce: 50 μ m.

Po sedmih tednih gojenja so celice, nasajene na vezivno tkivo amnijske membrane, dosegle višjo stopnjo diferenciranosti. V primerjavi s tri tedne starimi celičnimi kulturami celice po sedmih tednih niso tvorile izrazitih večskladnih skupkov, kljub temu pa smo opazili številne visoko diferencirane površinske celice. Te so bile praviloma večje od ostalih, njihova apikalna

plazmalema pa je iz sklenjenih grebenov prehajala v značilne školjkaste mikrogrebene (Slika 14). Med njimi smo opazili dobro razvite tesne stike.



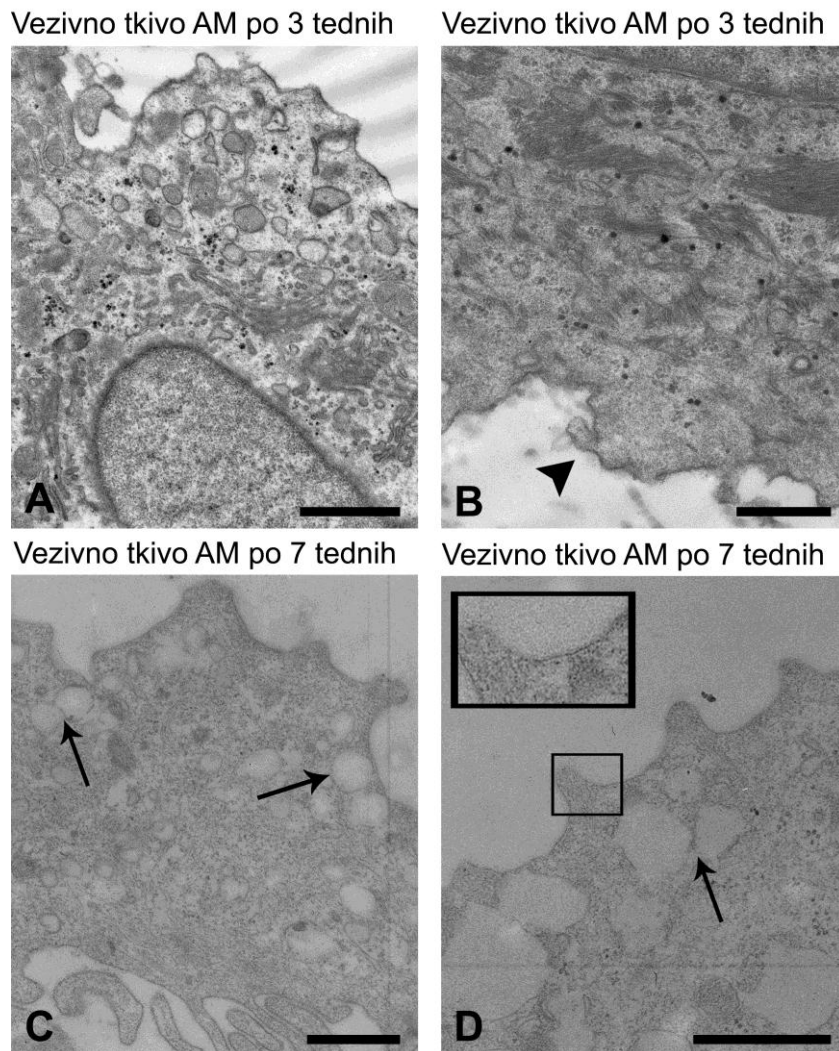
Slika 14: A-E: Površinske urotelijske celice, nasajene na vezivno tkivo amnijske membrane (Vezivno tkivo AM), po treh in sedmih tednih gojenja, pri različnih povečavah. **A)** Po treh tednih gojenja so urotelijske celice,

nasajene na vezivno tkivo amnijske membrane, tvorile majhne večskladne celične skupke (→). **B)** V predelih teh skupkov je imela večina površinskih urotelijskih celic apikalno plazmalemo, oblikovano v sklenjene grebene. **C)** Po sedmih tednih gojenja celice niso več tvorile izrazitih predelov z večjim številom celičnih skladov. **D)** Našli smo številne visoko diferencirane površinske celice, ki so se s sosednjimi celicami povezovala z dobro razvitimi tesnimi stiki (▶). **E-F)** Apikalna plazmalema visoko diferenciranih celic je iz sklenjenih grebenov prehajala v školjkaste mikrogrebene (→). Slika **F** predstavlja povečan okvirček slike **E**. Merilce: **A-E)** 10 µm, **F)** 1 µm.

Tudi z rezultati, dobljenimi s pomočjo presevnega elektronskega mikroskopa, smo pokazali, da dosežejo urotelijske celice, ki so rasle na vezivnem tkivu amnijske membrane, višjo stopnjo diferenciacije v predelih z večjim številom celičnih skladov. Površinske celice večskladnih predelov so imele po treh tednih gojenja apikalno plazmalemo, oblikovano v večini primerov v uroplakinske plake. Poleg tega smo v apikalni citoplazmi teh celic opazili številne okrogle vezikle, ki so verjetno DFV. Večina celic na mestih z manj celičnimi skladi je bila nizko diferencirana. Med njimi smo našli tudi posamezne delno diferencirane celice z združenimi mikrovili.

Kot celice, nasajene na ostale podlage, so tudi celice, nasajene na vezivno tkivo amnijske membrane, tvorile prepletene medcelične povezave. Površinske celice so se povezovala s tesnimi stiki ter dezmosomi, v citoplazmi pa so vsebovale številne mitohondrije in dobro razvit GA. Bazalne celice so se pritrjevale direktno na vezivno tkivo amnijske membrane in niso tvorile bazalne lamine. V povprečju so celice oblikovale dva do tri sklade, na nekaterih območjih pa štiri ali več celičnih skladov.

Po sedmih tednih gojenja smo opazili večje število dobro diferenciranih celic s številnimi DFV v apikalni citoplazmi (Slika 15). Bolje diferencirane celice so bile prisotne na območjih z več celičnimi skladi.



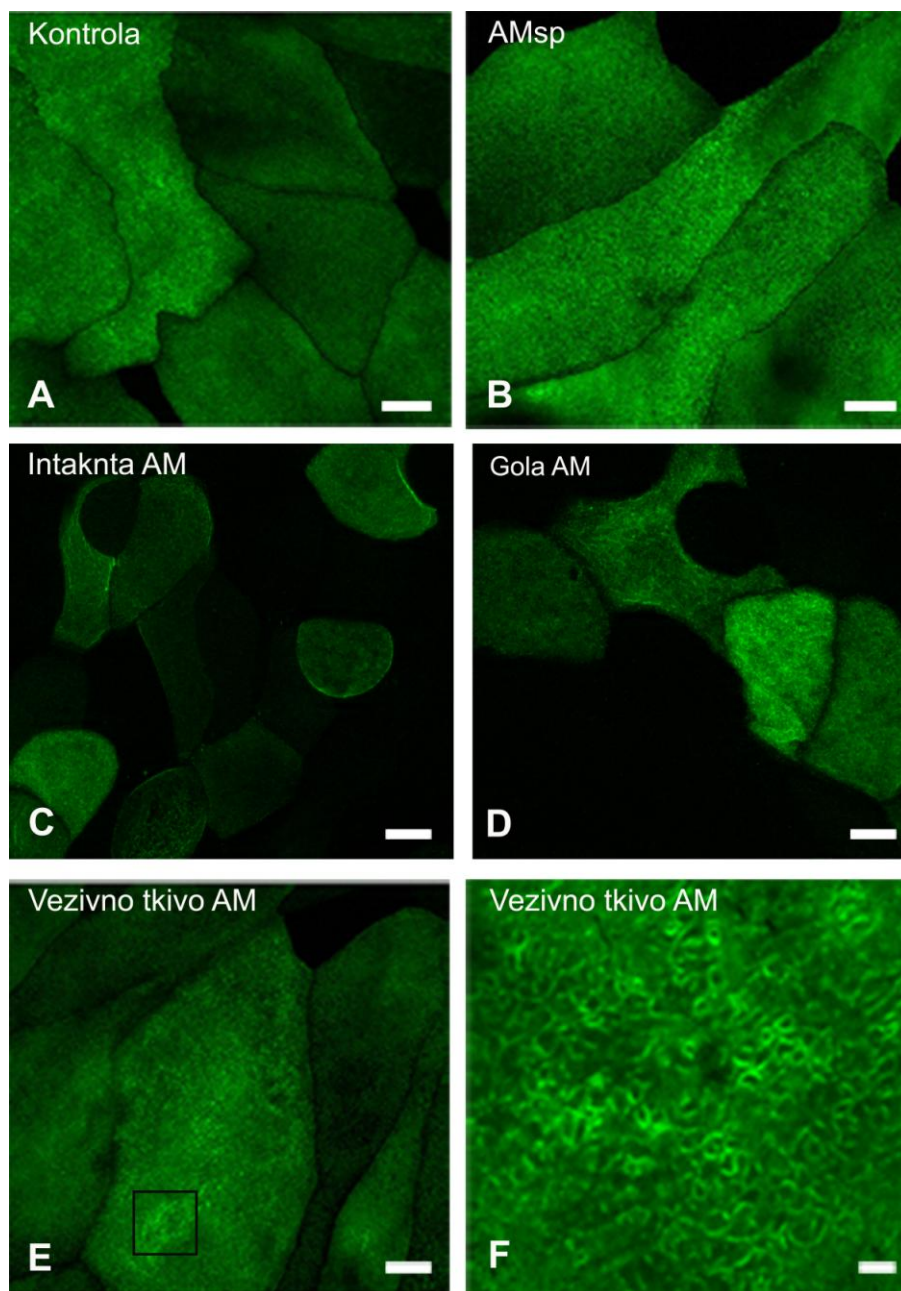
Slika 15: A-D: Ultrastruktura površinskih urotelijskih celic, nasajenih na vezivno tkivo amnijske membrane, po treh in sedmih tednih gojenja. **A)** Površinske urotelijske celice večskladnih predelov so bile po treh tednih gojenja dobro diferencirane. **B)** Bazalne celice so se pritrjale direktno na vezivno tkivo amnijske membrane in niso tvorile bazalne lamine (►). **C-D)** Po sedmih tednih gojenja smo opazili večje število dobro diferenciranih celic z apikalno plazmalemo, oblikovano v urotelijske plake, ter s številnimi DFV v apikalni citoplazmi (→). V predelu urotelijskih plakov je bila apikalna plazmalema odebeljena (povečan okvirček). Merilce: **A)** 1 μ m, **B-D)** 500 nm.

4.6 IMUNOFLUORESCENTNO OZNAČEVANJE UROPLAKINOV IN OKLUDINA

Tri in sedem tednov stare celične kulture urotelijskih celic, ki so uspevale na različnih nosilcih, smo imunofluorescentno označili s protitelesi proti uroplakinom in okludinu. Ugotovili smo, da se intenziteta izražanja uroplakinov ter površina celic z izraženimi uroplakini razlikujeta, in sicer odvisno od nosilca, na katerega so bile celične kulture nasajene.

4.6.1 IMUNOFLUORESCENCA UROPLAKINOV

S protitelesi proti uroplakinom smo označili uroplakine v površinskih urotelijskih celicah tri in sedem tednov starih celičnih kultur. Prisotnost uroplakinov smo dokazali pri vseh celičnih kulturah. Med obarvanim celicami, ki so izražale uroplakine, smo našli neobarvana področja, kjer celice uroplakinov niso izražale (Slika 16).



Slika 16: A-F: Imunofluorescenca uroplakinov. Prisotnost uroplakinov (obarvani zeleno) smo dokazali pri vseh celičnih kulturah. **F)** Pri nekaterih celicah smo opazili povezovanje mikrovilov v neskljenjene in sklenjene grebene. Slika **F** predstavlja povečan okvirček slike **E**. Merilce: **A-E)** 10 μm , **F)** 5 μm .

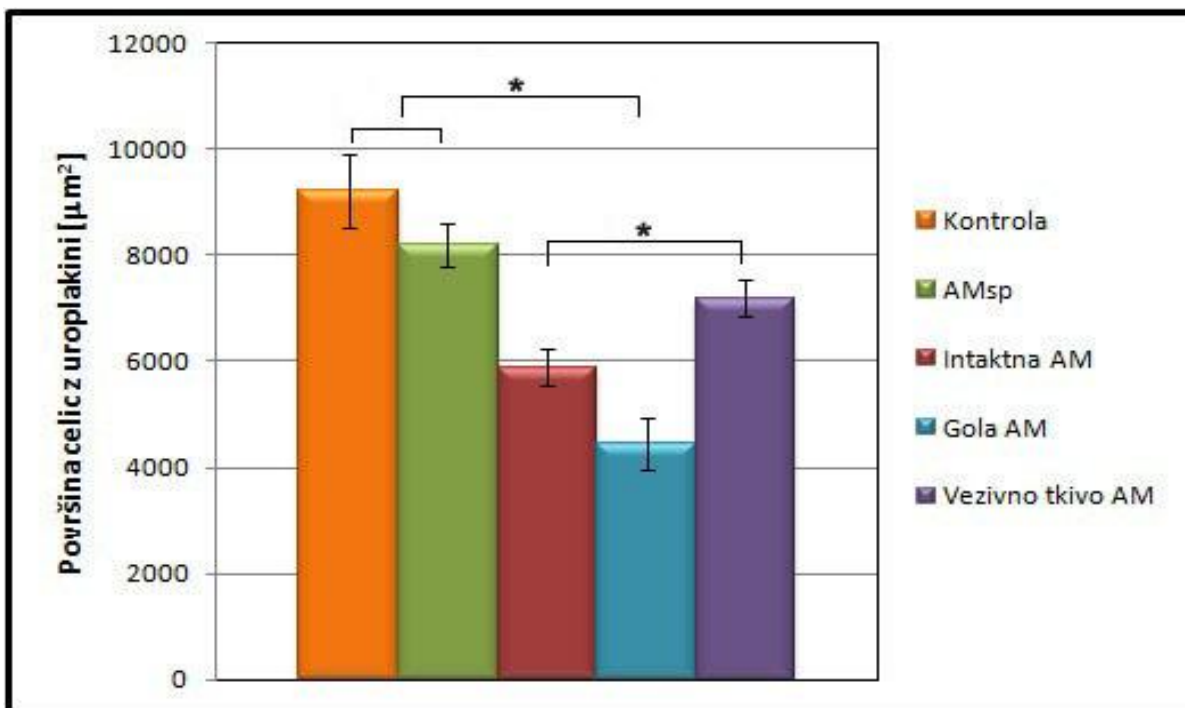
4.6.2 POVRŠINA CELIC Z IZRAŽENIMI UROPLAKINI JE ODVISNA OD NOSILCA

Opazili smo, da se velikost površine celic z uroplakini razlikuje, in sicer odvisno od nosilca, na katerega so bile urotelijske celice nasajene. Opažanja smo potrdili z analizami slik naključno izbranih vidnih polj, pri čemer je vsako vidno polje merilo $15336 \mu\text{m}^2$. Površino celic z izraženimi uroplakini smo izmerili, kot je opisano v poglavju 3.6.1.

Najvišjo povprečno površino celic z uroplakini smo izmerili pri celičnih kulturah, nasajenih na porozne membrane ($9226.4 \pm 701.9 \mu\text{m}^2$, N=60). Med povprečno površino celic z uroplakini kontrolnih membran ter povprečno površino celic z uroplakini, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane, ni bilo statistično značilne razlike (Studentov t-test, $p > 0.05$).

Nekoliko manjšo povprečno površino celic z uroplakini smo izmerili pri celičnih kulturah, ki so rasle na vezivnem tkivu amnijske membrane ($7197.8 \pm 360.3 \mu\text{m}^2$, N=70), najmanj celic z izraženimi uroplakini smo našli v primeru nasaditve na intaktno ali golo amnijsko membrano. Povprečna površina celic z uroplakini je bila pri celicah, nasajenih na intaktno amnijsko membrano, večja ($5888.0 \pm 340.9 \mu\text{m}^2$, N=20) od povprečne površine celic z izraženimi uroplakini, ki so bile nasajene na golo amnijsko membrano ($4463.3 \pm 482.5 \mu\text{m}^2$, N=40). Povprečne površine celic z uroplakini, ki so uspevale na vezivnem tkivu amnijske membrane ter na intaktni in goli amnijski membrani, so se med seboj statistično značilno razlikovale (Studentov t-test, $p < 0.05$) (Graf 1).

Ob nasaditvi celic na sintetični nosilec kontrolne porozne membrane ($60.2 \pm 4.6 \%$, N=60) ter porozne membrane z amnijsko membrano v mediju pod njimi ($53.5 \pm 2.7 \%$, N=70) je bila povprečna pokrovnost s celicami, ki so izražale uroplakine, večja od 50 %, po drugi strani pa ob nasaditvi celic na vezivno tkivo amnijske membrane ($46.9 \pm 2.3 \%$, N=40) ter na intaktno ($38.4 \pm 2.2 \%$, N=20) in golo amnijsko membrano ($29.1 \pm 3.1\%$, N= 40) povprečna površina celic z uroplakini ni preseгла 50 % pokritosti vidnega polja.



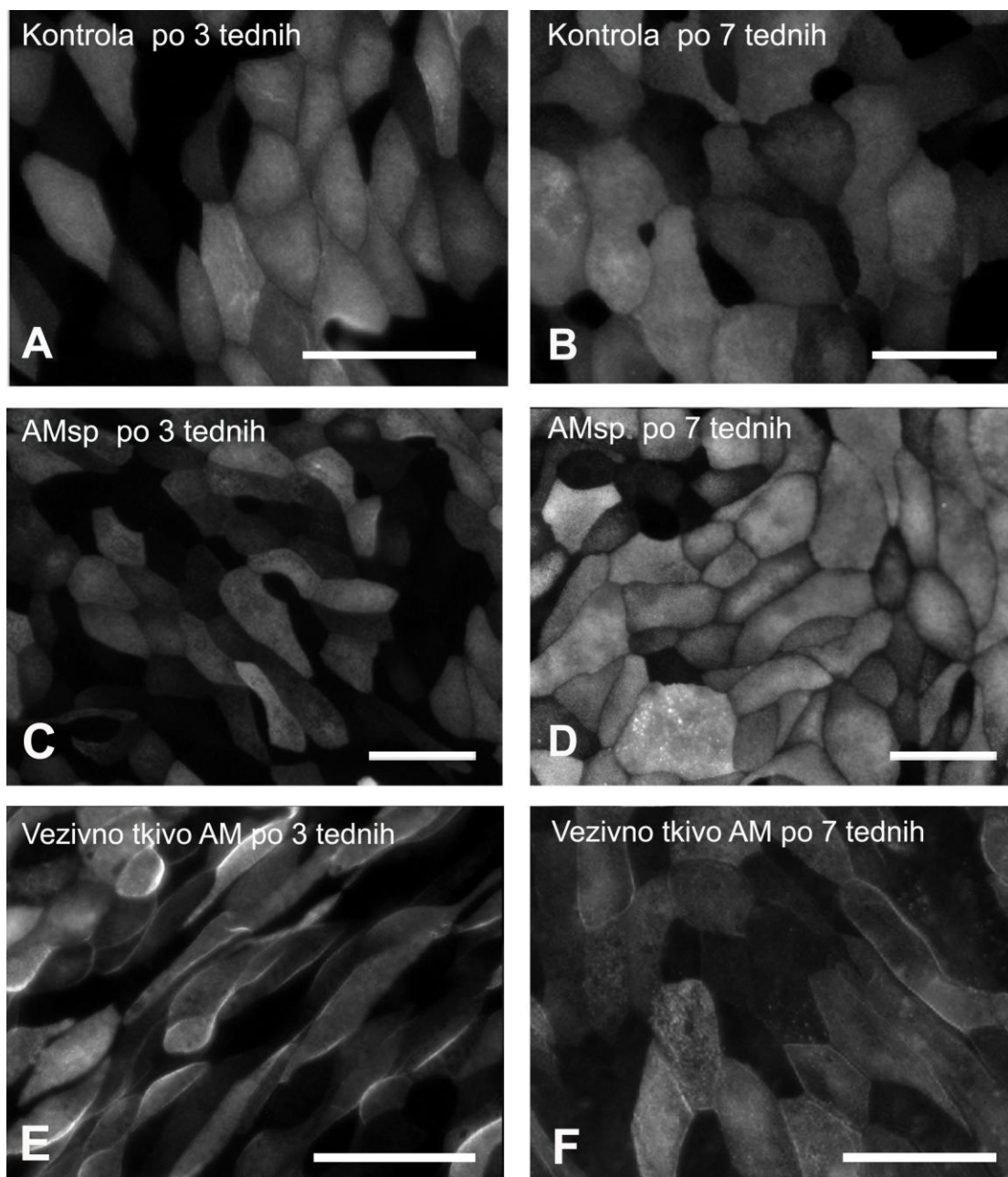
Graf 1: Povprečna površina celic z uroplakini glede na nosilec, in sicer po treh tednih gojenja. Med povprečno površino celic z uroplakini kontrolnih membran ter povprečno površino celic z uroplakini, ki so uspevale na poroznih membranah pod vplivom amnijske membrane (AMsp), ni bilo statistično značilne razlike ($p > 0.05$). Povprečne površine celic z uroplakini, ki so uspevale na vezivnem tkivu amnijske membrane ter na intaktne in goli amnijski membrani, so se med seboj statistično značilno razlikovale ($p < 0.05$). Legenda: * $p < 0.05$ (Studentov t-test).

Da bi ugotovili, ali daljši čas gojenja vpliva na velikost povprečne površine celic z uroplakini, smo pokritost vidnega polja s celicami, ki so izražale uroplakine, izmerili še pri sedem tednov starih celičnih kulturah. Med seboj smo primerjali celične kulture, ki so rasle na sintetičnih nosilcih, in tiste, nasajene na vezivno tkivo amnijske membrane. Celične kulture, nasajene na intaktne in gole amnijske membrane, smo gojili le tri tedne, zato jih v primerjavo nismo vključili. Ugotovili smo, da se je povprečna površina celic z uroplakini v apikalni plazmalemi po sedmih tednih gojenja celičnih kultur v vseh treh primerih povečala. Največjo razliko smo opazili pri celicah, nasajenih na porozne membrane z amnijsko membrano v mediju pod njimi, kjer je bila povprečna površina celic z uroplakini po sedmih tednih za približno 30 % večja od povprečne površine po treh tednih gojenja. Za nekoliko manj (približno 28 %) se je

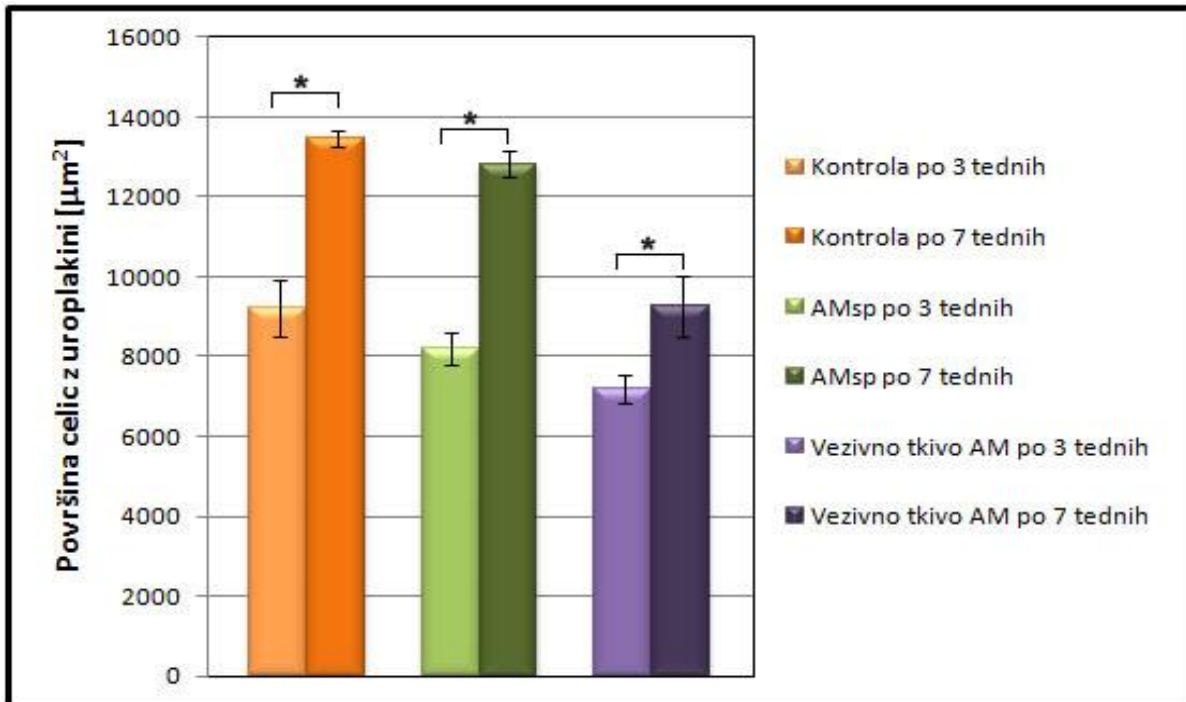
povečala povprečna površina celic, ki so izražale uroplakine, pri celičnih kulturah, nasajenih na kontrolne porozne membrane, medtem ko smo najmanjšo razliko v površini (približno 14 %), po dodatnih štirih tednih gojenja celičnih kultur, opazili pri celicah, ki so uspevale na vezivnem tkivu amnijske membrane (Slika 17).

Po sedmih tednih gojenja celic smo najvišjo povprečno celično površino z uroplakini izmerili pri kontrolnih poroznih membranah ($13477.4 \pm 210.3 \mu\text{m}^2$, N=40). Nekoliko manjšo povprečno površino celic z uroplakini ($12835.9 \pm 330.7 \mu\text{m}^2$, N=40) so po sedmih tednih dosegle celice, nasajene na porozne membrane z amnijsko membrano v mediju pod njimi, najmanjšo povprečno površino ($9277.1 \pm 758.9 \mu\text{m}^2$, N=40) pa smo izmerili pri celicah, nasajenih na vezivno tkivo amnijske membrane. Povprečne površine celic z izraženimi uroplakini po sedmih tednih gojenja so se statistično značilno razlikovale od povprečnih površin celic z uroplakini po treh tednih gojenja. (Studentov t-test, $p < 0.05$) (Graf 2).

Povprečna površina celic z uroplakini je po sedmih tednih gojenja celičnih kultur tako v primeru nasaditve na sintetični nosilec - kontrolne porozne membrane ($87.9 \pm 1.9 \%$, N=40) in porozne membrane z amnijsko membrano v mediju pod njimi ($83.7 \pm 3.1 \%$, N=40) kot pri nasaditvi na vezivno tkivo amnijske membrane ($60.5 \pm 7 \%$, N=40) presegla 50 % pokritost vidnega polja.



Slika 17: A-F) Primerjava površine celic z izraženimi uroplakini, nasajenimi na različne podlage, po treh in sedmih tednih. Povprečna površina celic z uroplakini se je po sedmih tednih gojenja celičnih kultur, ne glede na nasaditveno podlago, povečala. Največjo razliko smo opazili pri celicah, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane (AMsp). Nekoliko manjšo pri celicah, ki so rasle na kontrolnih membranah, najmanj pa se je povečala površina celic z uroplakini pri celicah, nasajenih na vezivno tkivo amnijske membrane (Vezivno tkivo AM). Merilce: 50 μm .



Graf 2: Povprečna površina celic z uroplakini po treh in sedmih tednih gojenja celičnih kultur. Po sedmih tednih gojenja celičnih kultur je prišlo do povečanja površine celic z uroplakini. Največjo razliko smo med povprečno površino celic z izraženimi uroplakini po treh in sedmih tednih opazili pri celicah, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane (AMsp). Povprečne površine celic z izraženimi uroplakini po sedmih tednih so se statistično značilno razlikovale od povprečnih površin celic z uroplakini po treh tednih gojenja ($p < 0.05$). Legenda: * $p < 0.05$ (Studentov t-test).

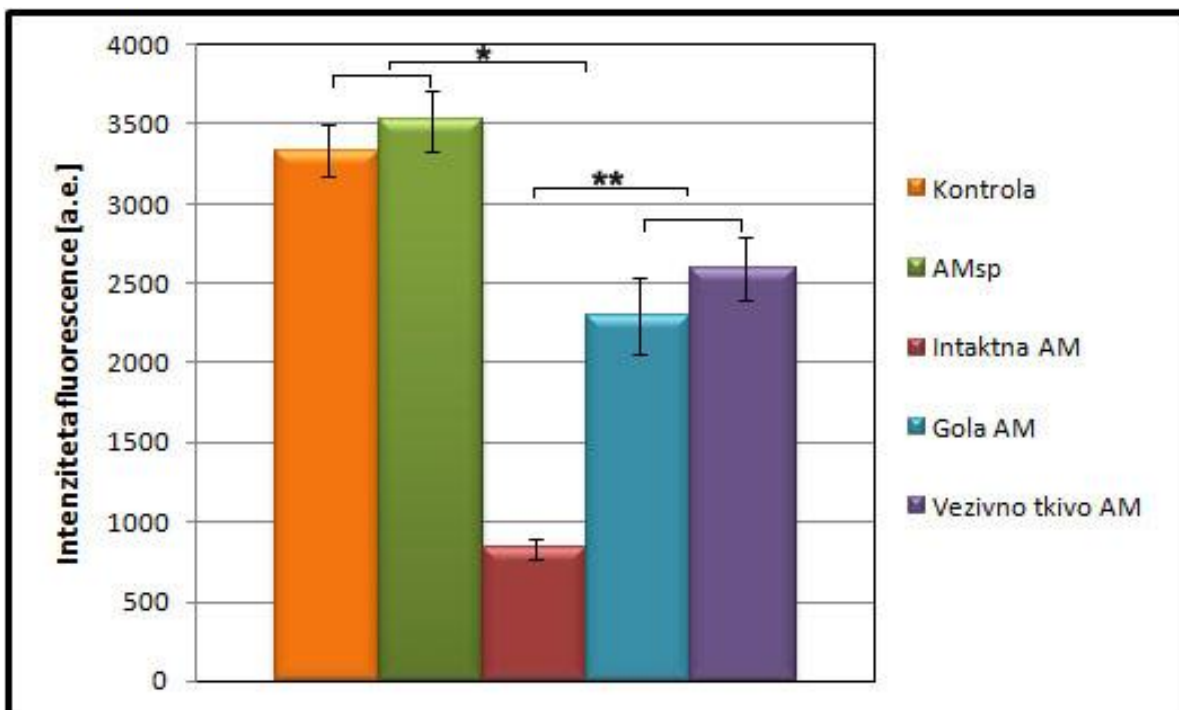
4.6.3 INTENZITETA FLUORESCENCE UROPLAKINOV

Poleg razlik v velikosti površine celic z uroplakini smo pri celičnih kulturah, nasajenih na različne nosilce, opazili tudi razlike v intenziteti fluorescence uroplakinov. Ugotovitve smo potrdili z natančnejšimi analizami slik naključno izbranih vidnih polj, pri čemer smo intenziteto fluorescence uroplakinov izmerili, kot je opisano v poglavju 3.6.2.

Najvišjo povprečno intenziteto fluorescence uroplakinov smo izmerili pri celičnih kulturah, nasajenih na porozne membrane (3524.3 ± 196.2 a.e., $N=70$). Med povprečno intenziteto fluorescence uroplakinov celičnih kultur kontrolnih poroznih membran ter intenziteto

fluorescence uroplakinov celic, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane, ni bilo statistično značilne razlike (Studentov t-test, $p > 0.05$). Obenem se je intenziteta fluorescence uroplakinov celičnih kultur, nasajenih na sintetične nosilce, statistično značilno razlikovala od intenzitete fluorescence uroplakinov celic, nasajenih na vezivno tkivo amnijske membrane, ter na intaktno in golo amnijsko membrano (Studentov t-test, $p < 0.05$).

Nekoliko nižjo intenziteto fluorescence uroplakinov smo, v primerjavi s celicami, nasajenimi na porozne membrane, izmerili pri celicah, ki so rasle na vezivnem tkivu amnijske membrane (2592.8 ± 200.2 a.e., $N=40$), še nižjo pa pri celičnih kulturah, nasajenih na intaktno in golo amnijsko membrano. Povprečna intenziteta fluorescence uroplakinov je bila pri celicah, nasajenih na intaktno amnijsko membrano, signifikantno nižja (836.5 ± 63.1 a.e., $N=20$) od povprečne intenzitete fluorescence uroplakinov celic, nasajenih na golo amnijsko membrano (2303.1 ± 241.9 a.e., $N=40$) (Studentov t-test, $p < 0.01$). Poleg tega ni bilo statistično značilne razlike med povprečno intenziteto fluorescence uroplakinov, nasajenih na vezivno tkivo amnijske membrane, in povprečno intenziteto fluorescence celic, nasajenih na golo amnijsko membrano (Studentov t-test, $p > 0.05$) (Graf 3).

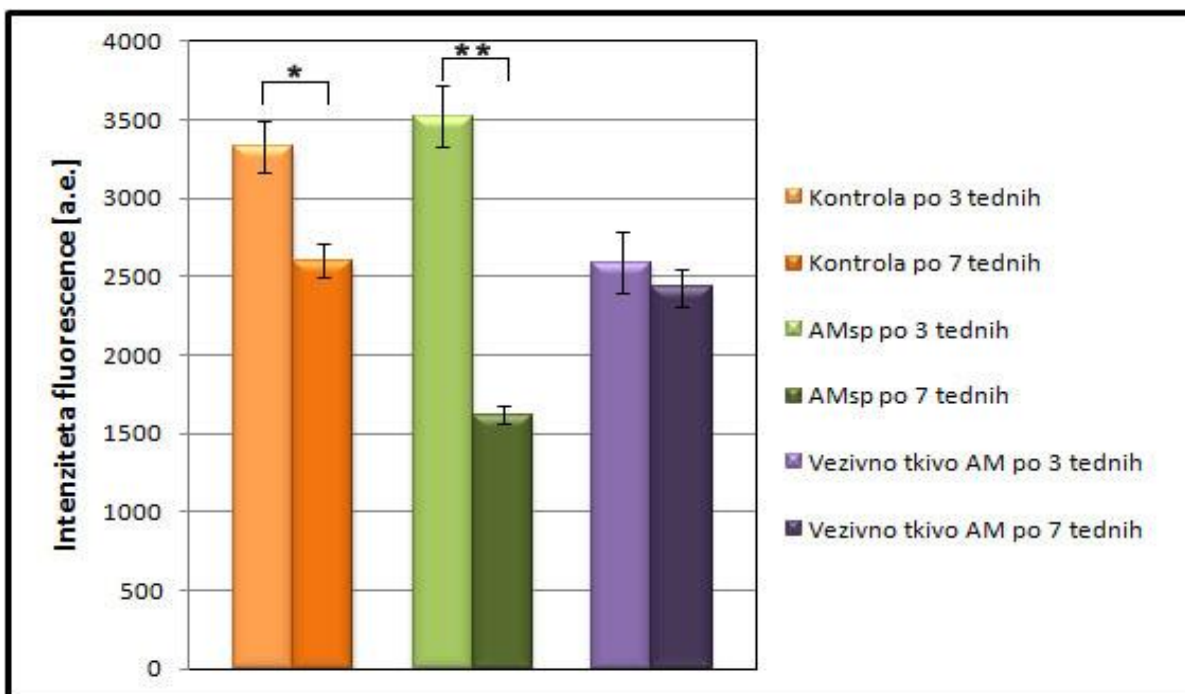


Graf 3: Povprečna intenziteta fluorescence uroplakinov po treh tednih gojenja. Med celičnimi kulturami kontrolnih poroznih membran in tistimi, ki so rastle pod vplivom amnijske membrane (AMsp), v intenziteti fluorescence ni bilo statistično značilnih razlik. Prav tako se v intenziteti fluorescence niso razlikovale celične kulture, nasajene na vezivno tkivo amnijske membrane (Vezivno tkivo AM) in na golo amnijsko membrano (Gola AM), ni bilo statistično značilne razlike ($p > 0.05$). Povprečna intenziteta fluorescence uroplakinov celic, nasajenih na intaktno amnijsko membrano (Intaktna AM), pa je bila signifikantno nižja od povprečne intenzitete fluorescence uroplakinov celic, nasajenih na ostale nosilce ($p < 0.01$). Legenda: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Studentov t-test).

Po sedmih tednih gojenja celičnih kultur smo, v primerjavi z intenziteto fluorescence uroplakinov tri tedne starih celic, pri celicah, nasajenih na sintetične nosilce, in pri celičnih kulturah, nasajenih na vezivno tkivo amnijske membrane, opazili padec intenzitete fluorescence uroplakinov. Intenziteta fluorescence uroplakinov celičnih kultur, nasajenih na porozno membrano z amnijsko membrano v mediju pod njimi, je bila po sedmih tednih signifikantno nižja (1620.8 ± 60.9 a.e., $N=40$) od intenzitete fluorescence uroplakinov tri tedne starih celic (3524.3 ± 196.2 a.e., $N=70$) (Studentov t-test, $p < 0.01$). Tudi intenziteta fluorescence uroplakinov kontrolnih membran se je po treh in sedmih tednih gojenja celičnih

kultur statistično značilno razlikovala (Studentov t-test, $p < 0.05$), medtem ko med tri in sedem tednov starimi celičnimi kulturami, nasajenimi na vezivno tkivo amnijske membrane, statistično značilnih razlik ni bilo (Studentov t-test, $p > 0.05$).

Po daljšem času gojenja celic med celičnimi kulturami, nasajenimi na kontrolne membrane, ter celicami, ki so rasle na vezivnem tkivu amnijske membrane, nismo opazili statistično značilnih razlik, po drugi strani pa je v primerjavi z njima intenziteta fluorescence uroplakinov celic, nasajenih na porozne membrane z amnijsko membrano v mediju pod njimi, statistično značilno nižja (Studentov t-test, $p < 0.05$) (Graf 4).

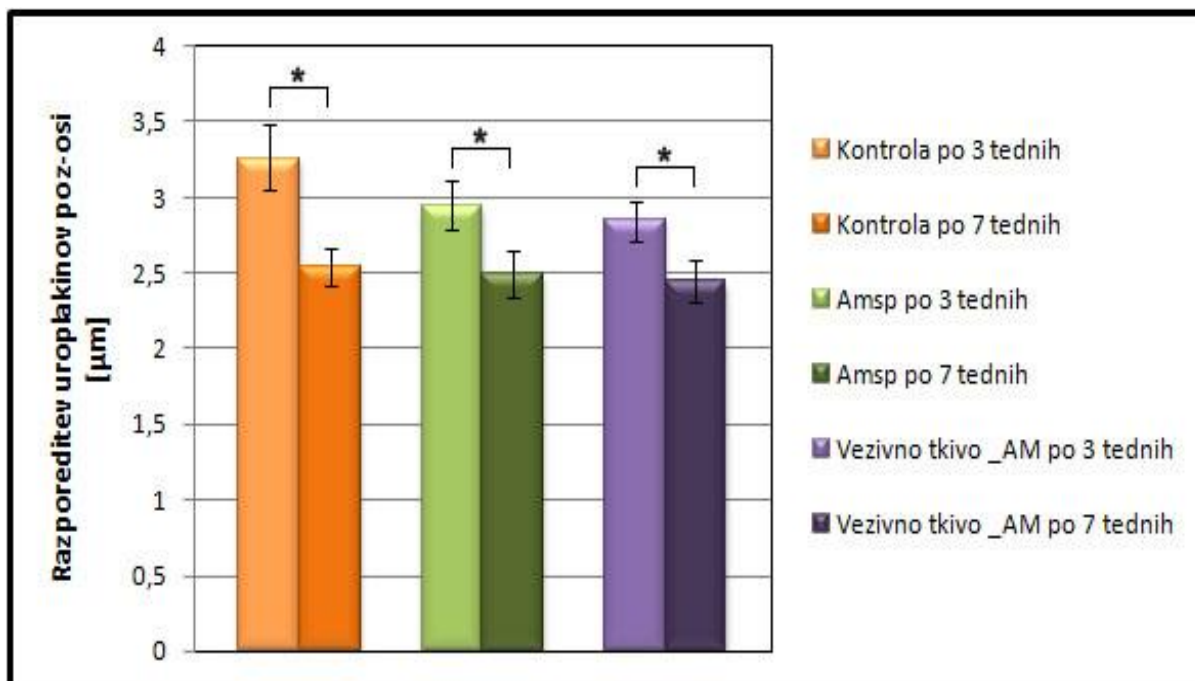


Graf 4: Povprečna intenziteta fluorescence uroplakinov po treh in sedmih tednih gojenja celičnih kultur. Intenziteta fluorescence uroplakinov celičnih kultur, nasajenih na porozno membrano z amnijsko membrano v mediju pod njimi (AMsp), je bila, v primerjavi z intenziteto fluorescence uroplakinov tri tedne starih celic, po sedmih tednih signifikantno nižja ($p < 0.01$). Prav tako se je po treh in sedmih tednih gojenja statistično značilno razlikovala intenziteta fluorescence uroplakinov kontrolnih membran ($p < 0.05$), medtem ko med tri in sedem tednov starimi celičnimi kulturami, nasajenimi na vezivno tkivo amnijske membrane (Vezivno tkivo AM), statistično značilnih razlik ni bilo ($p > 0.05$). Legenda: * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ (Studentov t-test).

4.6.4 RAZPOREDITEV UROPLAKINOV PO Z-OSI

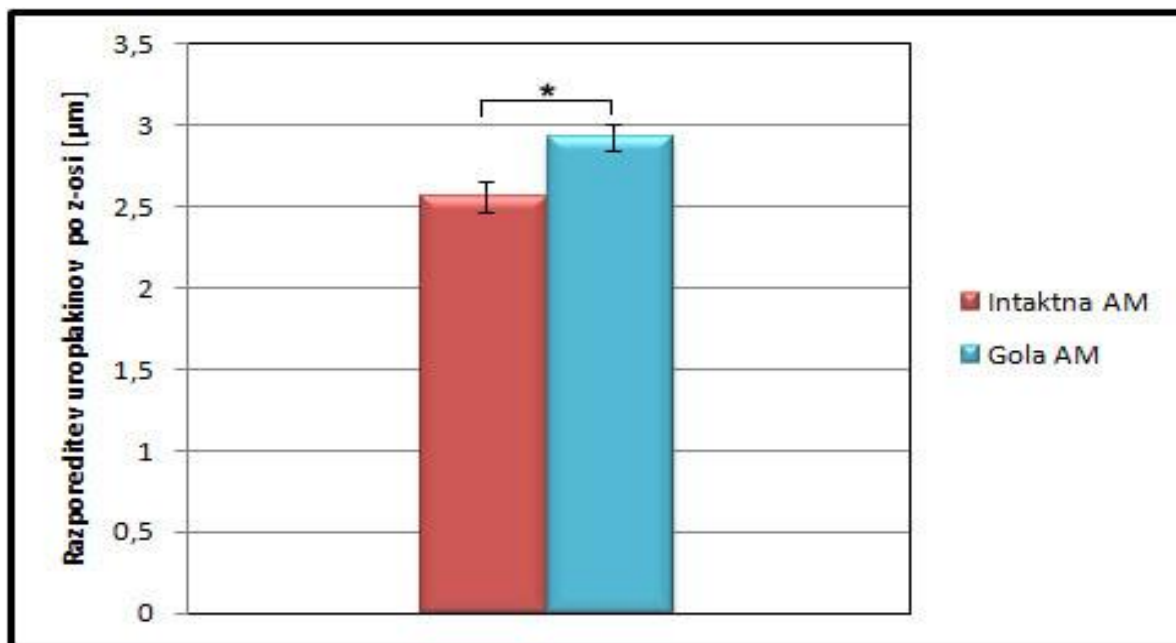
Da bi ugotovili, ali na povečanje površine celic z izraženimi uroplakini in obenem zmanjšanje intenzitete fluorescence uroplakinov po sedmih tednih gojenja celic vpliva razporeditev uroplakinov znotraj celic, smo v več zaporednih optičnih rezinah izbranih celic izmerili intenziteto fluorescence uroplakinov. Profil razporeditve uroplakinov po z-osi smo določili v celicah, ki so na različnih nosilcih rasle tri in sedem tednov. Razporeditev uroplakinov smo določili, kot je opisano v poglavju 3.6.3.

Po treh tednih gojenja urotelijskih celic smo imunofluorescentno označene uroplakine zaznali do povprečno $3 \pm 0.01 \mu\text{m}$ ($N=30$) pod apikalno plazmalemo, medtem ko so ti pri sedem tednov starih celicah segali v globino le do v povprečju $2.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ($N=30$). Razporeditev uroplakinov po z-osi se je med tremi in sedmimi tedni tako pri celicah, nasajenih na sintetične nosilce, kot tudi tistih, ki so rasle na vezivnem tkivu amnijske membrane, statistično značilno razlikovala (Studentov t-test, $p < 0.05$). Med razporeditvijo uroplakinov tri tedne starih celic, nasajenih na različne nosilce, pa ni bilo statistično značilnih razlik. Prav tako ni bilo statistično značilnih razlik v profilu uroplakinov po z-osi med sedem tednov starimi, na različne nosilce nasajenimi celicami (Studentov t-test, $p > 0.05$).



Graf 5: Razporeditev uroplakinov po z-osi v urotelijskih celicah, nasajenih na različne nosilce, po treh in sedmih tednih gojenja. Razporeditev uroplakinov po z-osi se je med tremi in sedmimi tedni, v vseh treh primerih, statistično značilno razlikovala ($p < 0.05$). Med razporeditvijo uroplakinov v celicah, ki so rastle na različnih nosilcih, ni bilo statističnih razlik ($p > 0.05$). Legenda: * $p < 0.05$ (Studentov t-test).

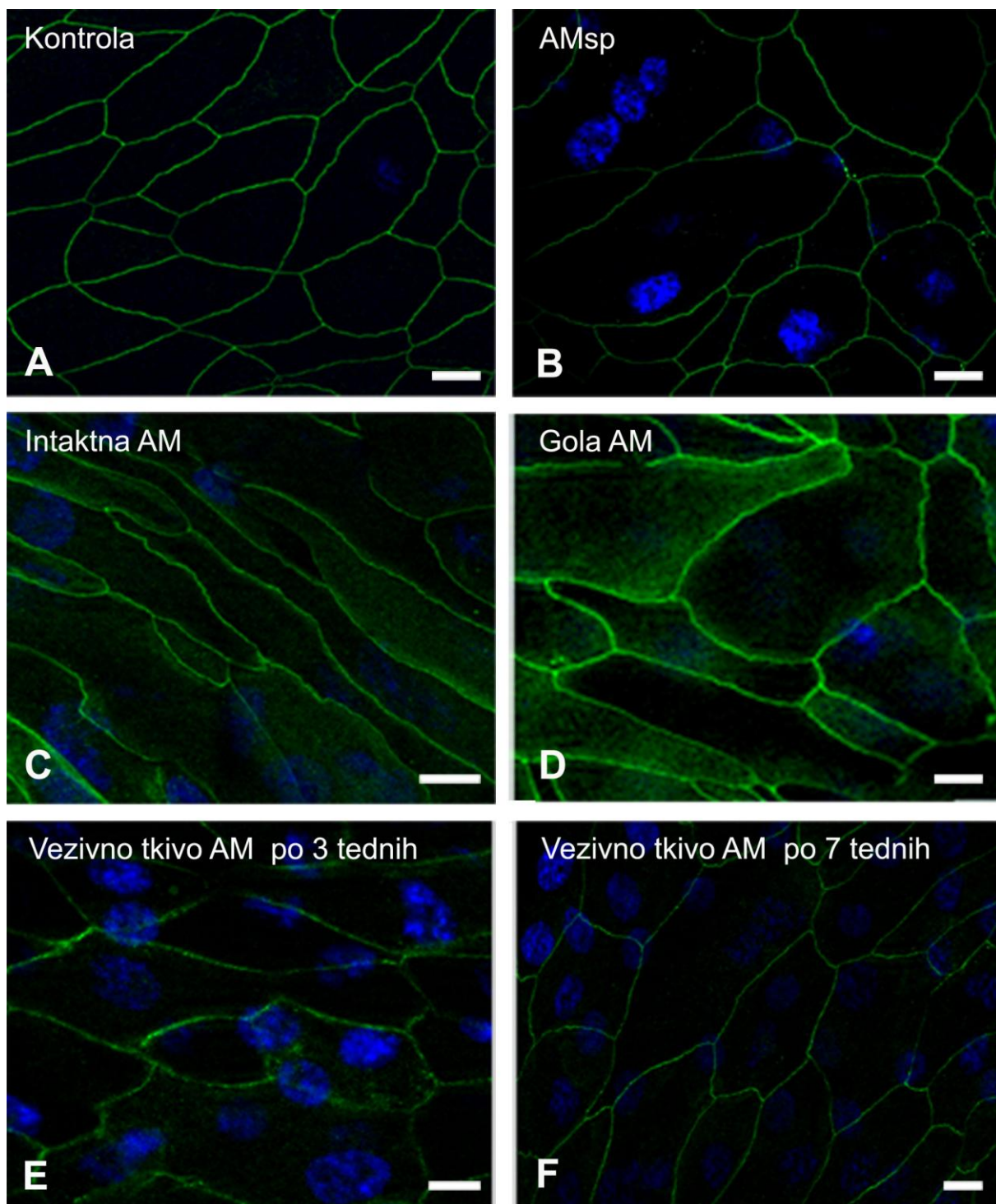
Poleg tega smo, da bi razložili razliko v površini celic z uroplakini ter intenziteti fluorescence uroplakinov po treh tednih gojenja, profil razporeditve uroplakinov po z-osi določili tudi v urotelijskih celicah, ki so rastle na intaktni in goli amnijski membrani. Razporeditev uroplakinov po z-osi se je med celicami, nasajenimi na intaktno in golo amnijsko membrano, po treh tednih gojenja statistično značilno razlikovala (Studentov t-test, $p < 0.05$). Pri celicah, ki so rastle na intaktni amnijski membrani, smo imunofluorescentno označene uroplakine zaznali do povprečno $2.57 \pm 0.09 \mu\text{m}$ ($N=10$), medtem ko so ti pri celicah, nasajenih na golo amnijsko membrano, segali do povprečno $2.93 \pm 0.08 \mu\text{m}$ ($N=10$) (Graf 6).



Graf 6: Razporeditev uroplakinov po z-osi v urotelijskih celicah, nasajenih na intaktno (Intaktna AM) in golo amnijsko membrano (Gola AM), po treh tednih gojenja. Urotelijske celice, nasajene na intaktno in golo amnijsko membrano, so se po treh tednih gojenja v razporeditvi uroplakinov po z-osi statistično značilno razlikovale ($p < 0.05$). Legenda: * $p < 0.05$ (Studentov t-test).

4.6.5 IMUNOFLUORESCENCA OKLUDINA, PROTEINA TESNIH STIKOV

S protitelesi proti okludinu smo označili tri in sedem tednov stare kulture urotelijskih celic. Prisotnost okludina, ki se je v tankih sklenjenih črtah pojavljal apikalno na lateralni plazmalemi celic, smo dokazali pri vseh celičnih kulturah ne glede na nosilce, na katere so bile nasajene. Med tri in sedem tednov starimi celicami v pojavljanju okludina nismo opazili razlik (Slika 18).

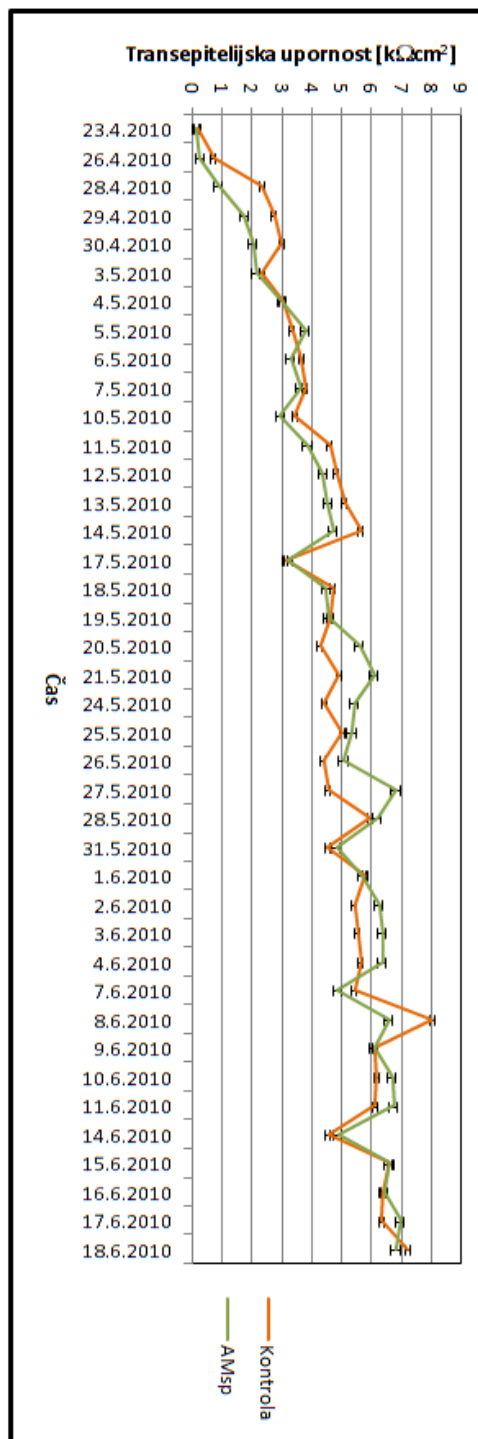


Slika 18: A-F: Imunofluorescenca okludina (obarvan zeleno). Okludin je viden v obliki sklenjenih črt med sosednjimi površinskimi urotelijskimi celicami v vseh celičnih kulturah. Med tri in sedem tednov starimi kulturami nismo opazili razlik. Kromatin je označen modro, z barvilom DAPI. Merilce: 10 μ m.

4.7 TRANSEPITELIJSKA UPORNOST

TER smo merili na celičnih kulturah prašičjih urotelijskih celic, nasajenih na porozne membrane, s površino 0.9 cm^2 . TER urotelijskih celičnih kultur, ki so uspevale na poroznih membranah, pod katere smo v medij položili $1,5 \text{ cm}^2$ koščke amnijske membrane, smo primerjali s TER urotelijskih celičnih kultur, ki so rasle na kontrolnih membranah - na poroznih membranah - brez amnijske membrane, dodane v medij.

Z merjenjem transepitelijske upornosti prašičjih urotelijskih celice smo začeli dva do tri dni, preden so dosegle konfluentnost. Med vrednostmi TER celičnih kultur, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane, ter tistih, nasajenih na kontrolne membrane, ni bilo statistično značilnih razlik (Studentov t-test, $p > 0.05$). V obeh primerih so vrednosti TER med meritvami nihale, s tem da smo izrazite padce vrednosti praviloma opazili le pri meritvah, opravljenih po vikendih. TER celičnih kultur z amnijsko membrano v mediju pod njimi je v primerjavi s kontrolo naraščala počasneje, po tretjem tednu merjenja pa so njene vrednosti nekoliko presegle vrednosti, izmerjene na kontrolnih membranah. V osmem tednu merjenja so se vrednosti celičnih kultur, nasajenih na kontrolne membrane, približale vrednostim, izmerjenim na celičnih kulturah, ki so rasle z amnijsko membrano v mediju pod njimi (Graf 7). Vrednosti TER so v obeh primerih postopoma naraščale. Medtem ko so izmerjene vrednosti TER v celičnih kulturah, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane, v povprečju znašale $4686.2 \pm 1396.6 \Omega\text{cm}^2$ (N=240) pri kulturah, nasajenih na kontrolne membrane, pa $4644.9 \pm 812.9 \Omega\text{cm}^2$ (N=560) smo na posameznih membranah v obeh primerih izmerili tudi TER, ki so znašale čez $11000 \Omega\text{cm}^2$.



Graf 7: Primerjava transepitelijske upornosti prašičjih urotelijskih celic, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane (AMsp), s celicami, ki so rasle na kontrolnih poroznih membranah. Izmerjene vrednosti TER se med membranami niso statistično značilno razlikovale ($p > 0.05$).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Izbira ustreznega tkivnega nosilca je ključnega pomena za razvoj tkivnih nadomestkov (Mano s sod., 2007). Dober tkivni nosilec omogoča, poleg pritrjevanja, neovirane rasti in diferenciacije celic, tudi oblikovanje kompleksnih tridimenzionalnih tkivnih struktur, ki jih lahko uporabimo za zdravljenje ali obnovo poškodovanih in okvarjenih tkiv (Toda s sod., 2007). Zaradi posebne zgradbe ter edinstvenih lastnosti predstavlja amnijska membrana obetaven tkivni nosilec. Poleg nizke imunogenosti ter zaviranja vnetnih reakcij preprečuje brazgotinjenje tkiva, pospešuje epitelizacijo ter ima primerne mehanske lastnosti, ki so za dober tkivni nosilec nujne (Niknejad s sod., 2008). Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, ali je amnijska membrana primeren nosilec za urotelij ter preučiti vpliv amnijske membrane na diferenciacijo urotelijskih celic.

Amnijsko membrano smo kot nosilec uporabili na tri načine. Urotelijske celice smo nasadili na intaktno amnijsko membrano, na golo amnijsko membrano, ki smo ji odstranili epitelij, ter na vezivno tkivo amnijske membrane. Primernost vsakega nosilca smo ocenjevali na podlagi pritrjevanja urotelijskih celic, hitrosti rasti celične kulture ter stopnje diferenciacije, ki so jo urotelijske celice dosegle na posameznem nosilcu.

Amnijske epiteljske celice sproščajo rastne faktorje, ki pospešujejo celjenje ran, epitelizacijo in diferenciacijo celic (Koizumi s sod., 2000a). Da bi preverili, ali amnijska membrana vpliva na razraščanje in diferenciacijo urotelijskih celic, smo intaktno amnijsko membrano položili v medij pod urotelijske celice, nasajene na porozne membrane (sintetični nosilec). Primerjali smo diferenciacijo celic, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane, z diferenciacijo celic, ki so rasle na poroznih membranah brez amnijske membrane, dodane v medij. Stopnjo diferenciacije urotelijskih celic smo ugotavljali s primerjavo ultrastrukture celic in imunooznačevanjem specifičnih označevalcev diferenciacije. Poleg tega smo z merjenjem TER ugotavljali tesnost urotelija *in vitro*.

V poskusih smo uporabljali amnijske membrane, ki so bile shranjene na - 80 °C, v 50 % glicerolu. Po podatkih iz literature (Kruse s sod., 1999; Niknejad s sod., 2008) AEC ne preživijo zamrzovanja v 50 % glicerolu, pri - 80 °C. Da bi preverili, ali je ob zamrzovanju prišlo do poškodb AEC, smo pred začetkom poskusov intaktno amnijsko membrano pregledali z elektronskim mikroskopom.

5.1.1 AMNIJSKA MEMBRANA OHRANI ZNAČILNO STRUKTURO PO SHRANJEVANJU PRI - 80 °C

Epitelijske celice amnijske membrane, shranjene pri - 80 °C, so, v primerjavi z AEC amnijske membrane takoj po porodu, manj imunogene, zato se raziskovalci poslužujejo uporabe tako shranjene amnijske membrane (Kubo s sod., 2001; Koizumi s sod., 2000a, 2000b, 2007; Mikek s sod., 2004).

V namen rekonstrukcije očesne površine se najpogosteje uporablja amnijska membrana, ki je bila predhodno shranjena na - 80 °C (Lee in Tseng, 1997). Takšna amnijska membrana ohrani biološke značilnosti, vendar ob prenosu na očesno površino ne povzroči imunskega odziva. Amnijske membrane, ki smo jih za poskuse uporabljali v diplomskem delu, so bile prvotno pripravljene za potrebe Očesne klinike v Ljubljani, zato so shranjene po uveljavljenem postopku.

Kruse je s sodelavci (1999) ugotovil, da se struktura AEC in vezivnega tkiva amnijske membrane po opisanem postopku shranjevanja zelo dobro ohranja, po drugi strani pa so rezultati viabilnosti celic pokazali, da AEC ne preživijo shranjevanja v 50 % glicerolu. Ob pregledovanju intaktne amnijske membrane z elektronskim mikroskopom in po primerjavi rezultatov z navedbami o zgradbi amnijske membrane v literaturi (Bourne, 1962; Pollard s sod., 1976; van Herendael s sod., 1978) smo ugotovili, da se struktura amnijske membrane med shranjevanjem ni spremenila. AEC so tvorile enoskladen epitelij in med seboj so se

povezovala s številnimi dezmosomi. Prisotnost dezmosomov med sosednjimi AEC smo potrdili tudi z imunooznačevanjem dezmosoplakina, ki je ključen za nastanek funkcionalnih dezmosomov (Gallicano s sod., 1998). Pod bazalno lamino amnijske membrane je bilo vidno troplastno vezivno tkivo iz kompaktne plasti, plasti fibroblastov in gobaste plasti.

V skladu z mnogimi znanimi raziskavami zgradbe amnijske membrane (King, 1982), ki so na podlagi elektronske mikroskopije zaključevale, da tesnih stikov med sosednjimi AEC ni, tudi mi ob pregledovanju amnijske membrane s presevnim elektronskim mikroskopom med AEC nismo opazili tesnih stikov. Ker pa so ti značilnost vseh epitelijskih tkiv, smo prisotnost teh preverili še s pomočjo imunoflorescentnega označevanja. Dokazali smo prisotnost okludina, proteina tesnih stikov. Ta se je sicer kot običajno pojavljal apikalno na lateralni plazmalemi celic, vendar imunofluorescenca okludina ni bila kot običajno v obliki tanke sklenjene črte, ampak v obliki široke obrobe okrog celic. Menimo, da tak vzorec pojavljanja okludina najverjetneje kaže na že znano prekinitev tesnih stikov v pozni nosečnosti (Kobayashi s sod., 2009) in ni posledica shranjevanja v 50 % glicerolu, na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Čeprav so bistvene morfološke značilnosti amnijske membrane tudi po shranjevanju na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ostale nespremenjene, so bile AEC amnijskih membran, ki smo jih uporabili v diplomskem delu, poškodovane in so v citoplazmi vsebovale številne vakuole.

5.1.2 AMNIJSKA MEMBRANA JE PRIMEREN NOSILEC ZA UROTELIJ

V dosedanjih raziskavah je o uporabi amnijske membrane kot nosilca urotelija zelo malo podatkov. Na amnijsko membrano so nasadili le mišje urotelijske celice (Sharifiaghdas s sod., 2007). Sharifiaghdas in sodelavci (2007) so za tkivni nosilec uporabili golo amnijsko membrano. Ugotovili so, da mišje urotelijske celice tvorijo na goli amnijski membrani tri do štiri sklade celic, se med seboj povezujejo z dezmosomi ter se na bazalno lamino amnijske

membrane pritrjujejo s hemidezmosomi. V raziskavi so se osredotočili predvsem na rast urotelijskih celic, diferenciacije urotelijskih celic pa niso preučevali.

V diplomskem delu smo, poleg ustreznosti gole amnijske membrane, preverjali, ali sta kot nosilec urotelija primerna tudi intaktna amnijska membrana in vezivno tkivo amnijske membrane. V vseh treh primerih uporabe amnijske membrane kot nosilca nam je na amnijski membrani uspelo vzpostaviti normalno kulturo urotelijskih celic. Celice, nasajene na amnijsko membrano, so tvorile večskladen prehodni epitelij z bazalnimi, vmesnimi in površinskimi celicami, ki je bil podoben normalnemu uroteliju *in vivo*.

Čeprav smo na humano amnijsko membrano nasadili prašičje urotelijske celice, kar pomeni, da sta si bila nosilec in celice heterologna, do zavrnitvene reakcije ni prišlo. V nobenem od primerov nismo opazili nekrotičnih urotelijskih celic, prav tako ni prišlo do okužbe celičnih kultur. Za amnijsko membrano je namreč značilna nizka imunogenost, zaviranje vnetne reakcije in antimikrobno delovanje.

Sklepamo, da je amnijska membrana primeren nosilec za urotelij, saj poleg uspešnega pritrjanja urotelijskih celic omogoča neovirano razrast in ob nasaditvi na vezivno tkivo amnijske membrane tudi visoko diferenciacijo urotelijskih celic.

5.1.2.1 Urotelijske celice se najhitreje razraščajo na vezivnem tkivu amnijske membrane

Ključni pogoj za razrast celic *in vitro* je uspešno pritrjanje celic na tkivni nosilec (Niknejad s sod., 2008). V primerjavi s celicami, nasajenimi na ostale nosilce, so se urotelijske celice najbolje razraščale na vezivnem tkivu amnijske membrane, kjer so že po 24 urah tvorile večje otočke celic z medsebojnimi povezavami.

Pričakovali smo, da bodo celice najhitreje rasle na goli amnijski membrani, saj jih v tem primeru nasadimo na bazalno lamino amnijske membrane. Ta je bogata z glikoproteini (lamininom, fibronektinom, entaktinom), ki s povezovanjem s celičnimi molekulskimi receptorji – integrini - omogočajo pritrjevanje celic na podlago (Niknejad s sod., 2008). Celice so se na bazalno lamino amnijske membrane sicer pritrile, vendar so se v primerjavi s celicami, nasajenimi na vezivno tkivo amnijske membrane, razraščale počasneje.

Najpočasneje so urotelijske celice rasle na intaktni amnijski membrani. Celice so sprva tvorile le manjše okrogle otočke in so se šele po desetih dneh začele razraščati čez večjo površino. Skupaj z rastjo urotelijskih celic smo opazili postopno manjšanje števila AEC. Podobne rezultate je dobil tudi Kruse s sod. (2000), ko je epiteljske celice roženice nasadil na intaktno amnijsko membrano, ki je bila pred uporabo shranjena na enak način kot amnijska membrana, ki smo jo uporabili v diplomskem delu. Predvidevajo, da poškodovane AEC delujejo kot hranilni sloj celic in tako omogočajo rast epiteljskim celicam roženice. Epiteljske celice roženice in tudi urotelijske celice so postopoma nadomestile AEC ter vzpostavile stik z bazalno lamino amnijske membrane. Menimo, da urotelijske celice na amnijski membrani niso rasle, dokler se AEC niso odluščile in so se urotelijske celice lahko pritrile na bazalno lamino.

Urotelijske celice, nasajene na vezivno tkivo amnijske membrane, so se tudi v primerjavi s celicami, ki so rasle na sintetičnih nosilcih, hitreje razraščale. Medtem ko so celice na poroznih membranah dan po nasaditvi tvorile majhne otočke celic, so bili otočki en dan starih celic, nasajenih na vezivno tkivo amnijske membrane, večji in so med seboj že tvorili povezave.

Sklepamo, da je vezivno tkivo amnijske membrane primernejša podlaga za razraščanje urotelijskih celic kot sintetični nosilci ali bazalna lamina amnijske membrane. Gobasta plast vezivnega tkiva amnijske membrane namreč, poleg kolagena tipa IV, preko katerega s

povezovanjem z integrini pride do pritrjanja celic, vsebuje tudi številne rastne faktorje, vezane na proteoglikane.

5.1.2.2 Površinske urotelijske celice se najbolj diferencirajo na vezivnem tkivu amnijske membrane

Vezično tkivo amnijske membrane, ki ga sestavljajo kompaktna plast, plast fibroblastov in gobasta plast, poleg kolagenskih ter elastičnih vlaken, vsebuje tudi fibroblaste, različne glikoproteine ter proteoglikane (Niknejad s sod., 2008). Glikoproteini in proteoglikani vezičnega tkiva lahko vežejo vrsto rastnih faktorjev, med njimi tudi FGF, HGF, TGF- β , ki vplivajo na proliferacijo in diferenciacijo celic. Veziava rastnih faktorjev na proteoglikane v vezičnem tkivu ima številne pozitivne lastnosti. Rastni faktorji so v vezičnem tkivu shranjeni v že razpoložljivi obliki, kar pomeni, da pride zelo hitro po sprostitvi do delovanja rastnega faktorja. Prenos signala je torej neprimerno hitrejši, kot je hitrost sproščanja rastnih faktorjev iz celic, kar je potrebno, da se pred sprostitvijo gen za določen rastni faktor še prepíše v mRNA in nato prevede v protein. Poleg tega omogočajo v vezičnem tkivu shranjeni rastni faktorji prenos signalov med celicami, ki rastejo na istem matriksu (Taipale s sod., 1997).

Ob nasaditvi urotelijskih celic na vezično tkivo amnijske membrane so, v primerjavi z ostalimi nosilci, površinske urotelijske celice dosegle najvišjo stopnjo diferenciacije. Sklepamo, da je do tega prišlo zaradi rastnih faktorjev, ki so v vezičnem tkivu amnijske membrane vezani na proteoglikane. Ker so bile celice nasajene neposredno na vezično tkivo amnijske membrane, je bil vpliv rastnih faktorjev toliko večji in posledično je bila stopnja diferenciacije urotelijskih celic višja.

Urotelijske celice so po treh in po sedmih tednih rasti na vezičnem tkivu amnijske membrane dosegle višjo stopnjo diferenciacije v predelih z večceličnimi skladi. Glede na to, da je prašičji urotelj *in vivo* zgrajen iz štirih oziroma petih skladov celic (Desgrandchamps s sod.,

2007), sklepamo, da je določeno število celičnih skladov predpogoj tudi za diferenciacijo urotelijskih celic *in vitro*.

Stopnjo diferenciacije površinskih urotelijskih celic smo določali na podlagi njihovih ultrastrukturnih značilnosti. Visoko diferencirane urotelijske celice imajo apikalno plazmalemo, oblikovano v značilne urotelijske plake (Romih s sod., 1998; Kreft s sod., 2005), na območjih, na katerih je s presevnim elektronskim mikroskopom vidna odebeljena apikalna plazmalema. Med sosednjimi površinskimi celicami se oblikujejo dobro razviti tesni stiki, v apikalni citoplazmi visoko diferenciranih celic pa lahko opazimo številne DFV (Kreft s sod., 2002; Romih s sod., 2005). Poleg tega so visoko diferencirane površinske urotelijske celice sploščene ter večje od manj diferenciranih celic (Kong s sod., 2004). Ugotovili smo, da površinske celice, nasajene na vezivno tkivo amnijske membrane, ustrezajo vsem opisanim značilnostim in smo jih na podlagi tega označili za visoko diferencirane urotelijske celice.

Z rezultati dobljenimi z elektronsko mikroskopijo smo pokazali, da so celice na vezivnem tkivu amnijske membrane dosegle najvišjo stopnjo ultrastrukturne diferenciacije. Nasprotno je bila površina celic z uroplakini ter intenziteta fluorescence uroplakinov višja pri celicah, nasajenih na porozne membrane. Razlog za to razliko bi lahko bil v homogeni zgradbi sintetičnega nosilca. Enakomerna razporeditev por po sintetičnem nosilcu je omogočala enakomeren dostop medija po celotni površini celične kulture. Amnijska membrana pa ni na vseh predelih enako zgrajena. Ponekod je bilo lahko več kolagenskih vlaken in je bila tako difuzija medija otežena, poleg tega se je lahko na nekaterih predelih amnijske membrane sproščalo več rastnih faktorjev. Sklepamo, da sta bili rast in diferenciacija urotelijskih celic na sintetičnih nosilcih bolj homogena od rasti in diferenciacije urotelijskih celic na vezivnem tkivu amnijske membrane. Na vezivnem tkivu amnijske membrane smo našli tudi predele, kjer celice niso bile visoko diferencirane. Predvidevamo, da smo z naključnim izbiranjem vidnih polj za merjenje površine celic z uroplakini in intenzitete fluorescence uroplakinov lahko izbrali tudi tiste dele amnijske membrane, kjer je bilo manj visoko diferenciranih celic.

Zato sta bili površina celic z uroplakini in intenziteta fluorescence uroplakinov v primerjavi s celicami, nasajenimi na sintetične nosilce, manjši.

5.1.2.3 Površinske urotelijske celice na intaktni amnijski membrani po treh tednih gojenja dosežejo višjo stopnjo diferenciacije kot celice na goli amnijski membrani

Iz raziskav (Koizumi s sod., 2000b, 2007), ki so primerjale rast in diferenciacijo epitelijskih celic roženice na intaktni in goli amnijski membrani, smo predvidevali, da bodo celice dosegle višjo stopnjo diferenciacije na goli amnijski membrani. Kljub temu pa med urotelijskimi celicami, nasajenimi na golo in intaktno amnijsko membrano, z elektronskim mikroskopom nismo opazili v stopnji diferenciacije bistvenih razlik. Prevladovale so nediferencirane celice, med katerimi smo našli posamezne bolj diferencirane površinske celice. Celice smo v primeru nasaditve na intaktno in golo amnijsko membrano gojili le tri tedne. Predvidevamo, da bi urotelijske celice po daljšem času gojenja dosegle višjo stopnjo diferenciacije.

Vpliv intaktne in gole amnijske membrane na diferenciacijo urotelijskih celic smo dodatno ovrednotili še z imunooznačevanjem. V nasprotju z rezultati, dobljenimi z elektronsko mikroskopijo, smo med intaktno in golo amnijsko membrano opazili razliko v površini celic z izraženimi uroplakini in tudi v intenziteti fluorescence uroplakinov. Pri urotelijskih celicah, nasajenih na intaktno amnijsko membrano, smo izmerili večjo površino celic z uroplakini, medtem ko je bila intenziteta fluorescence uroplakinov višja pri celicah, ki so rastle na goli amnijski membrani. Da bi ugotovili, ali na razliko v površini celic z uroplakini ter intenziteti fluorescence uroplakinov vpliva razporeditev uroplakinov znotraj površinskih urotelijskih celic, smo v več zaporednih optičnih rezinah izmerili intenziteto fluorescence uroplakinov. Med postopkom imunofluorescence se protitelesa proti uroplakinom ne vežejo le na uroplakine, ki so že vključeni v apikalno plazmalemo, ampak tudi na tiste, ki z DFV do apikalne plazmaleme še potujejo. DFV z uroplakini potujejo med diferenciacijo površinskih

urotelijskih celic proti površju celic ter se postopoma vključujejo v apikalno plazmalemo (Hicks, 1975; Hu s sod., 2005). Tako se površina celic z uroplakini v apikalni plazmalemi poveča. Vzporedno se intenziteta manjša zaradi manjšega števila DFV v apikalni citoplazmi in s tem manjšega števila imunofluorescentno označenih uroplakinov na enoto površine fluorescence uroplakinov. V urotelijskih celicah, nasajenih na intaktno amnijsko membrano, smo imunofluorescentno označene uroplakine zaznali do povprečno 2.57 μm pod apikalno plazmalemo, medtem ko so ti v celicah, nasajenih na golo amnijsko membrano, segali v globino do povprečno 2.93 μm . Iz razporeditve uroplakinov po z-osi sklepamo, da so urotelijske celice na intaktni amnijski membrani v primerjavi s celicami, nasajenimi na golo amnijsko membrano, verjetno prej dosegle višjo stopnjo diferenciacije. Koizumi in sodelavci (2000a) so ugotovili, da je nivo rastnih faktorjev v intaktni amnijski membrani višji kot v goli, kar nakazuje na njihov epiteljski izvor. Predvidevamo, da so urotelijske celice na intaktni amnijski membrani zaradi rasti ob še neodlučenih AEC hitreje dosegle višjo stopnjo diferenciacije kot celice, nasajene na golo amnijsko membrano.

5.1.3 AMNIJSKA MEMBRANA Z EKSOKRINIM DELOVANJEM VPLIVA NA DIFERENCIACIJO UROTELIJSKIH CELIC

Amnijske epiteljske celice izražajo in izločajo rastne faktorje, ki stimulirajo celično rast in diferenciacijo celic ter pospešujejo epitelizacijo in celjenje ran (Koizumi s sod., 2000). Da bi preverili, ali amnijska membrana vpliva na diferenciacijo urotelijskih celic, smo dali v medij pod porozno membrano z urotelijskimi celicami intaktno amnijsko membrano. Po treh tednih gojenja celičnih kultur smo s presevnim in vrstičnim elektronskim mikroskopom ugotovili, da so urotelijske celice pod vplivom amnijske membrane v primerjavi s kontrolo dosegle višjo stopnjo diferenciacije. Menimo, da do višje diferenciacije urotelijskih celic, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane, pride zaradi eksokrinega delovanja amnijske membrane, predvsem AEC, ki v medij sproščajo rastne faktorje.

AEC, ki so bile zamrznjene na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, v 50 % glicerolu, niso več viabilne (Kruse s sod., 2000), kar pomeni, da rastnih faktorjev ne sintetizirajo in jih aktivno ne izločajo več. Kruse in sodelavci (2000) predvidevajo, da se rastni faktorji v okolico sproščajo iz poškodovanih AEC oziroma s proteoglikanov iz vezivnega tkiva amnijske membrane. Po sedmih tednih gojenja med urotelijskimi celicami, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane, in tistimi, nasajenimi na kontrolne porozne membrane, v stopnji diferenciacije nismo več opazili izrazite razlike. Predvidevamo, da smo z vsakodnevnim menjavanjem medija, rastne faktorje, ki so se sproščali iz poškodovanih AEC, čez čas postopoma sprali. Ker poškodovane AEC rastnih faktorjev niso več sintetizirale in aktivno izločale, se po daljšem času gojenja stopnja diferenciacije celic, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane, in stopnja diferenciacije urotelijskih celic kontrolnih membran nista več bistveno razlikovali.

Čeprav smo s pomočjo elektronske mikroskopije v stopnji diferenciacije tri tedne starih urotelijskih celic brez vpliva in z vplivom amnijske membrane opazili razliko, se celične kulture v površini celic z uroplakini ter intenziteti fluorescence uroplakinov po treh tednih niso statistično značilno razlikovale. Glede na meritve intenzitete fluorescence uroplakinov ter površine celic z uroplakini predvidevamo, da je bilo pri celicah, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane, ter pri celicah, nasajenih na kontrolne membrane, količinsko približno enako uroplakinov. Ker pa je plazmalema dinamična struktura, znotraj katere se proteinski kompleksi lahko premikajo (Singer in Nicolson, 1972), menimo, da so se uroplakinski partikli pri površinskih celicah urejali pod vplivom amnijske membrane v večje urotelijske plake, medtem ko so bili v apikalni plazmalemi celic kontrolnih membran verjetno bolj razpršeni in niso oblikovali urotelijskih plakov. Tvorba urotelijskih plakov, ki dajo apikalni plazmalemi značilen školjkast videz, je naprednejša stopnja diferenciacije urotelijskih celic, saj v plake urejeni uroplakinski partikli verjetno omogočajo boljšo bariero kot več posameznih, to je po apikalni plazmalemi razpršenih, uroplakinskih partiklov.

Poleg tega lahko razliko med rezultati, dobljenimi s pomočjo elektronske mikroskopije, in rezultati, ki smo jih dobili na podlagi imunofluorescentenga označevanja uroplakinov,

razložimo tudi tako, da smo vidna polja za merjenje celičnih površin z uroplakini in intenzitete fluorescence uroplakinov izbirali naključno, medtem ko smo pri pregledovanju preparatov z elektronskim mikroskopom namenoma iskali predele z najbolj diferenciranimi celicami.

5.1.4 POVRŠINA CELIC Z IZRAŽENIMI UROPLAKINI SE PO DALJŠEM ČASU GOJENJA UROTELIJSKIH CELIC POVEČA, INTENZITETA FLUORESCENCE UROPLAKINOV PA ZMANJŠA

Po sedmih tednih gojenja celičnih kultur smo tako pri celicah, nasajenih na sintetične nosilce, in pri celičnih kulturah, nasajenih na vezivno tkivo amnijske membrane, opazili zmanjšanje intenzitete fluorescence uroplakinov. Nasprotno se je površina celic z uroplakini po daljšem času gojenja celic povečala. Da bi ugotovili, ali je zmanjšanje intenzitete fluorescence uroplakinov in obenem povečanje površine celic z uroplakini odvisno od prerazporejanja uroplakinov v površinskih celicah, smo v več optičnih rezinah izmerili intenziteto fluorescence v celicah, ki so izražale uroplakine, ter določili profil razporeditve uroplakinov po z-osi. Po treh tednih gojenja celic smo imunofluorescentno označene uroplakine zaznali do povprečno 3 μm pod apikalno plazmalemo, pri sedem tednov starih celicah pa so ti segali v globino le do povprečno 2.5 μm .

Med diferenciacijo površinskih urotelijskih celic so se DFV z imunofluorescentno označenimi uroplakini premikali proti površju celic in se postopoma vključevali v apikalno plazmalemo, zaradi česar se je povečala površina celic z uroplakini. Obenem se je intenziteta fluorescence uroplakinov zaradi manjšega števila DFV v apikalni citoplazmi in s tem manjšega števila imunofluorescentno označenih uroplakinov na enoto površine zmanjšala. Iz razporeditve uroplakinov po z-osi torej lahko sklepamo, da so bile površinske urotelijske celice po sedmih tednih gojenja bolj diferencirane kot celice, ki smo jih gojili tri tedne.

5.1.5 MED POVRŠINSKIMI CELICAMI SO RAZVITI FUNKCIONALNI TESNI STIKI

Glavna naloga urotelija je vzdrževanje krvno-urinske pregrade (Hicks, 1975). Poleg odebeljene apikalne plazmaleme pripomorejo k vzdrževanju krvno-urinske pregrade tudi zelo dobro razviti tesni stiki med površinskimi urotelijskimi celicami (Acharya s sod., 2004).

Specifičen transmembranski protein funkcionalnih tesnih stikov je okcludin, ki se nahaja apikalno na lateralni plazmalemi (Veranič in Jezernik, 2000). Prisotnost imunofluorescentno označenega okcludina smo dokazali v vseh celičnih kulturah ne glede na nosilce, na katere so bile nasajene. Tanke sklenjene črte okcludina apikalno na lateralni plazmalemi površinskih celic kažejo na dobro razvite tesne stike med sosednjimi površinskimi celicami.

Dobro razvitost tesnih stikov smo dokazali tudi z merjenjem TER. Da bi preverili, ali v medij dodana amnijska membrana vpliva na funkcionalnost tesnih stikov med urotelijskimi celicami, smo TER urotelijskih celičnih kultur pod vplivom amnijske membrane primerjali s TER celičnih kultur, ki so rasle v mediju brez amnijske membrane. TER smo vsakodnevno merili osem tednov. V obeh primerih so izmerjene vrednosti med meritvami nihale, a kljub temu so postopoma naraščale. TER je pri celičnih kulturah, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane, v povprečju znašala $4686.2 \pm 1396.6 \Omega\text{cm}^2$, pri kulturah kontrolnih membran pa $4644.9 \pm 812.9 \Omega\text{cm}^2$. Glede na Fromterja in Diamonda (1972), ki sta kot neprepustne epitelije določila tiste, katerih TER presega $500 \Omega\text{cm}^2$, lahko kulturo urotelijskih celic v obeh primerih uvrstimo med tesne epitelije.

Eden izmed pokazateljev visoke diferenciranosti urotelijskih celic je tudi visoka TER (Lewis, 2000). Pričakovali smo, da bo TER urotelijskih celičnih kultur, ki smo jih izpostavili eksokrinemu delovanju amnijske membrane, v povprečju višja od vrednosti TER, izmerjenih v celičnih kulturah kontrolnih membran, a med njima ni bilo statistično značilnih razlik. Celične kulture, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane, so dosegle konfluentnost teden dni za celicami, nasajenimi na kontrolne membrane, kar razloži nižje vrednosti TER teh kultur

v začetnih dneh merjenja. Po dosegu konfluentnosti smo pri kulturah, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane, sicer izmerili višje vrednosti TER, ki pa se čez čas niso več bistveno razlikovale od TER, izmerjene na celičnih kulturah kontrolnih membran. Predvidevamo, da smo rastne faktorje, ki so se na začetku sproščali iz poškodovanih AEC in vezivnega tkiva amnijske membrane, sprali z vsakodnevnim menjavanjem medija. AEC niso več sintetizirale zaradi poškodb, nastalih pri shranjevanju amnijske membrane, rastnih faktorjev in niso aktivno izločale, zato po daljšem času merjenja TER med celičnimi kulturami z amnijsko membrano v mediju pod njimi in brez nje ni bilo več razlik.

5.1.6 UPORABA AMNIJSKE MEMBRANE V REGENERATIVNI MEDICINI SEČNEGA MEHURJA

V zadnjem času postaja tkivno inženirstvo vedno pomembnejša oblika regenerativne medicine, saj terapevtski izdelki tkivnega inženirstva ponujajo možnosti za učinkovito zdravljenje ali obnovo poškodovanih in okvarjenih tkiv. Tkivno inženirstvo je bilo v začetku osredotočeno na rekonstrukcijo enostavno zgrajenih organov, na primer kože, danes pa raziskovalci že razvijajo tridimenzionalne modele kompleksnih organov, med katere spada tudi sečni mehur (Atala s sod., 2006).

V primeru različnih bolezni sečnega mehurja potrebujemo za njegovo rekonstrukcijo dodatno tkivo. Navadno uporabijo raziskovalci za pripravo urotelijskih tkivnih nadomestkov segment črevesne stene (Shokeir, 2001) ali različne sintetične materiale, kot je poliglikolna kislina (Atala, 1998). V zadnjih letih se je kot primeren nosilec za rast urotelijskih celic začel uporabljati tudi kolagen (Falke s sod., 2000).

Atala in sodelavci (2006) so s pomočjo tkivnega inženirstva razvili avtologen sečni mehur. V laboratoriju so na tridimenzionalno oblikovanih, biološko razgradljivih nosilcih iz poliglikolne kisline vzgojili urotelijske celice in mišične celice stene sečnega mehurja. Po

sedmih tednih gojenja celic so nosilce s celicami obdali s peritonejem, ki zaradi bogate preskrbe s krvjo poveča ožiljenost presadka, in jih vsadili v telo bolnikov z boleznimi sečnega mehurja v končnem stadiju. V vseh sedmih primerih so po transplantaciji opazili normalno delovanje na novo razvitega sečnega mehurja. Normalno strukturo tkiv, razvitih s pomočjo tkivnega inženirstva, so pokazale tudi histološke in imunohistokemijske raziskave. Glede na to, da ima amnijska membrana mnoge pozitivne lastnosti, ki so pri transplantaciji tkiva izrednega pomena, predvidevamo, da bi lahko tudi visoko diferencirane urotelijske celice, ki smo jih vzgojili na vezivnem tkivu amnijske membrane, uporabili za rekonstrukcijo sečnega mehurja, sečevodov in proksimalne sečnice.

Amnijsko membrano lahko za rekonstrukcije tkiv položimo tudi neposredno na poškodovano tkivo ali organ. Fishman in sodelavci (1987) so svežo amnijsko membrano kot presadek uporabili na pasjem sečnem mehurju. Dvanajst tednov za tem, ko so na poškodovan predel sečnega mehurja prišili intaktno amnijsko membrano, so histološke raziskave pokazale regeneracijo stene sečnega mehurja.

Kljub vsem obetavnim raziskavam pa je klinična uporaba s tkivnim inženirstvom rekonstruiranih sečnih mehurjev še v povojih. Za vzpostavitev celotnega sečnega mehurja je namreč potrebno veliko več kot v laboratoriju vzgojene urotelijske celice. Za normalno delovanje sečnega mehurja je med drugim zelo pomembna ožiljenost organa ter pravilna oživčenost gladkih mišic, ki regulirajo krčenje in sproščanje stene sečnega mehurja. Poleg tega je prehod od eksperimentalnega dela na živalih do klinične uporabe s tkivnim inženirstvom pridobljenih tkiv in organov zelo zahteven (Southgate in Wood, 2008). Zagotovo pa predstavljajo s tkivnim inženirstvom pridobljena tkiva in organi zelo uporabne modele za bazične in tudi aplikativne študije, povezane z zdravljenjem bolezni različnih tkiv in organov.

5.2 SKLEPI

1. Amnijska membrana je primeren nosilec za urotelij, saj omogoča pritrjanje, rast in diferenciacijo urotelijskih celic.
2. Površinske urotelijske celice dosežejo najvišjo stopnjo diferenciacije na vezivnem tkivu amnijske membrane.
3. V medij dodana amnijska membrana inducira diferenciacijo površinskih urotelijskih celic. Po treh tednih so površinske urotelijske celice, ki rastejo pod vplivom amnijske membrane, bolj diferencirane kot celice, ki rastejo brez vpliva amnijske membrane.
4. Površina celic z izraženimi uroplakini se po sedmih tednih gojenja celic poveča. Vzporedno z večanjem površine celic z uroplakini se zaradi prerazporejanja veziklov z uroplakini manjša intenziteta fluorescence uroplakinov.
5. Med sosednjimi površinskimi celicami so razviti funkcionalni tesni stiki. Z merjenjem TER smo dokazali tesnost vzpostavljenega urotelija *in vitro*.

6 POVZETEK

Za vzpostavljanje tkiv in organov s tkivnim inženirstvom je izbira ustreznega nosilca, ki omogoča neovirano pritrjanje, rast in diferenciacijo tkivno specifičnih celic, ključnega pomena. Amnijska membrana predstavlja zaradi edinstvene zgradbe ter mnogih pozitivnih lastnosti, kot so zaviranje vnetne reakcije, preprečevanje brazgotinjenja ter nizke imunogenosti, obetaven tkivni nosilec. V diplomskem delu smo ugotavljali, ali je amnijska membrana ustrezen nosilec za urotelij, in preučevali njen vpliv na diferenciacijo urotelijskih celic. Amnijsko membrano smo kot nosilec uporabili na tri načine. Urotelijske celice smo nasadili na intaktno amnijsko membrano, na golo amnijsko membrano, ki smo ji predhodno s termolizinom odstranili epitelij, ter na vezivno tkivo amnijske membrane. Ustreznost nosilca smo določili na podlagi uspešnosti in hitrosti razraščanja urotelijskih celic in na podlagi stopnje diferenciacije celic na različnih nosilcih. Diferenciacijo urotelijskih celic smo ovrednotili z elektronsko mikroskopijo in imunooznačevanjem specifičnih diferenciacijskih označevalcev (uroplakinov in okludina). V vseh treh primerih uporabe amnijske membrane kot nosilca smo vzpostavili urotelij iz bazalnih, vmesnih in površinskih urotelijskih celic. Površinske urotelijske celice so najvišjo stopnjo diferenciacije dosegle, ko so rasle na vezivnem tkivu intaktne amnijske membrane. Visoko diferencirane površinske urotelijske celice so imele apikalno plazmalemo, oblikovano v značilne urotelijske plake, in so vsebovale številne DFV v apikalni citoplazmi. Da bi ugotovili, ali amnijska membrana inducira rast in diferenciacijo urotelijskih celic, smo v medij pod sintetične nosilce (porozne membrane), na katere smo nasadili urotelijske celice, položili intaktno amnijsko membrano. Kot kontrolo smo uporabili urotelijske celice, nasajene na porozne membrane, brez amnijske membrane, dodane v medij. Celice smo gojili tri in sedem tednov. Po treh tednih gojenja celičnih kultur so urotelijske celice pod vplivom amnijske membrane, v primerjavi s kontrolo, dosegle višjo stopnjo diferenciacije. Po sedmih tednih gojenja nismo več opazili izrazite razlike v diferenciaciji celic med urotelijskimi celicami, ki so rasle z ali brez vpliva amnijske membrane. Predvidevamo, da smo z vsakodnevnim menjevanjem medija rastne faktorje, ki so se sproščali iz poškodovanih AEC in inducirali diferenciacijo urotelijskih celic, postopoma

sprali. V preučevanih in vitro modelih se je površina celic z uroplakini po sedmih tednih gojenja še povečala, medtem ko se je intenziteta fluorescence uroplakinov zmanjšala. Ugotovili smo, da na padec intenzitete fluorescence uroplakinov in povečanje celičnih površin z uroplakini vpliva prerazporejanje uroplakinov znotraj površinskih urotelijskih celic. Meritve transepitelijske upornosti so pokazale, da urotelijske celice v vzpostavljenih in vitro modelih tvorijo tesen epitelij. Med povprečnimi vrednostmi TER urotelijskih kultur, ki so rasle z oziroma brez vpliva amnijske membrane, ni bilo statistično značilnih razlik. V obeh primerih lahko kulturo urotelijskih celic na podlagi izmerjenih TER uvrstimo med tesne epitelije ($>500 \Omega\text{cm}^2$). V diplomskem delu smo dokazali, da je amnijska membrana primeren nosilec za urotelij, saj omogoča, poleg uspešnega pritrjevanja urotelijskih celic tudi njihovo neovirano razrast in diferenciacijo.

7 LITERATURA

Acharya P., Beckel J., Ruiz W.G., Wang E., Rojas R., Birder L., Apodaca G. 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: F305-F318.

Adinolfi M., Akle C., McColl I., Fensom A.H., Tansley L., Connolly P., His B.L., Faulk W.P., Travers P., Bodmer WF. 1982. Expression of HLA antigens beta 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature*, 295: 325-327.

Alroy J., Merk F.B., Morr  D.J., Weinstein R.S. 1982. Membrane differentiation in the Golgi apparatus of mammalian urinary bladder epithelium. *Anat Rec*, 203: 429-440.

Atala A., Vacanti J.P., Peters CA., Mandell J., Retik A.B., Freeman M.R. 1992. Formation of urothelial structures in vivo from dissociated cells attached to biodegradable polymer scaffolds in vitro. *J Urol*, 148: 658-662.

Atala A. 1998. Tissue engineering in urologic surgery. *Urol Clin North Am*, 25: 39-50.

Atala A., Bauer SB., Soker S., Yoo J.J., Retik A.B. 2006. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *The Lancet*, 367: 1241 – 1246.

Bailo M., Soncini M., Vertua E., Bonassi S. P., Sanzone S., Lombardi G., Arienti D., Calamani F., Zatti D., Paul P., Albertini A., Zorzi F., Cavagnini A., Candotti F., Wengler GS., Parolini O. 2004. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation*, 78: 1439-1448.

Banas R. A., Trumpower C., Bentejewski C., Marshall V., Sing G., Zeevi A. Immunogenicity and immunomodulatory effects of amnion-derived multipotent progenitor cells. *Human immunology*, 69: 321-328.

Benson-Martin J., Zammaretti P., Bilica G., Schweizerc T., Portmann-Lanza B., Burkhardt T., Zimmermann R., Ochsenbein-K blblea N. 2006. The Youngs modulus of fetal preterm and term amniotic membranes. *Eu J Obstet Gynaecol Reprod Biol*, 128: 103-107.

Bitar R. E., Yamasaki A. A., Sasaki S., Zugaib M. 1996. Cervical fetal fibronectin in patients at increased risk for preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*, 175: 178-181.

Bizjak M. L. 2005. Primerjalna anatomija vretenčarjev. Študijsko gradivo za vaje. *Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo*.

Bourne, G. 1962. The foetal membranes: a review of the anatomy of normal amnion and chorion and some aspects of their function. *Postgrad Med J*, 38: 193-201.

Branski L. K., Kulp G., Jeschke M. G., Norbury W. B. 2007. Amniotic membrane as a Wound coverage: The effects of irradiation and different processing methods on growth factor content. *J Surg Res*, 137-339.

Burman S., Tejwani S., Vemuganti G. K., Gopinathan U., Sangwan V.S. 2004. Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane: a review of current indications. *Cell Tissue Bank*, 5: 161-175.

Capeans C., Pineiro A., Pardo M., Sueiro-López C., José Blanco M., Domínguez F., Sánchez-Salorio M. 2003. Amniotic membrane as support for human retinal pigment epithelium cell growth. *Acta Ophthalmol Scand*, 81: 271-277.

Cör A., Legan, M. 2006. Posteljica. *Medicinski razgledi*, 45: 391-401.

Desgrandchamps F., Moulinier F., Cochand-Priollet B., Wassef M., Teillac P., Le Duc A. 1997. Microscopic Study of the Pig Ureteral Urothelium. *J of Urol*, 157: 1926-1927.

Díaz-Prado S., Rendal-Vázquez M. E., Muiños-López E., Hermida-Gómez T., Rodríguez-Cabarcos M., Fuentes-Boquete I., J. de Toro F., J. Blanco F. 2010. Potential use of the human amniotic membrane as a scaffold in human articular cartilage repair. *Cell Tissue Bank*, 11: 183-195.

Eble J. A., Golbik R., Mann K., Kühn K. 1993. The alpha 1 beta 1 integrin recognition site of the basement membrane collagen molecule (alpha 1 (IV) 2 alpha2 (IV)). *EMBO J*, 12: 4795-4802.

Enders A. C., King BF. 1988. Formation and differentiation of extraembryonic mesoderm in the rhesus monkey. *AM J Anat*, 181: 327-340.

Falke G., Caffaratti J., Atala A. 2000. Tissue engineering of the bladder. *World J Urol*, 18: 36-43.

Fatima A., Sangwan V. S., Iftexhar G., Reddy P., Matalia H., Balasubramanian D., Vemuganti G. K. 2006. Technique of cultivating limbal derived corneal epithelium on human amniotic membrane for clinical transplantation. *J Postgrad Med*, 52: 257-261.

Fishman I. J., Flores F. N., Scott F. B., Spjut H. J., Morrow. 1987. Use of fresh placental membranes for bladder reconstruction. *J Urol*, 138: 1291-1294.

Fromter E., Diamond J. 1972. Route of passive ion permeation in epithelia. *Nat New Biol*, 235: 9-13.

Gallicano G. I., Kouklis P., Bauer C., Vasioukhin V., Degenstein L., Fuchs E. 1998. Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage. *J Cell Biol*, 143: 2009-2022.

Gillebrand P. N. 1969. The rate of water transfer from the amniotic sac with advancing pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*, 76: 530-533.

Hao Y., Ma D. H., Hui-Kang D., Hwang D. G., Wan-Soo K., Fen Z. 2000. Identification of antiangiogenic and anti-inflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*, 19: 348-352.

Heinrikson R. L. 1977. Applications of thermolysin in protein structural analysis. *Methods Enzymol*, 47: 175-189.

Hennerbichler S., Reichl B., Pleiner D., Gabriel C., Eibl J., Redl H. 2007. The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. *Cell Tissue Bank*, 8:1-8.

Hicks R. M. 1965. The fine structure of the transitional epithelium of rat ureter. *J Cell Biol*, 26: 25-48.

Hicks R. M. 1966. The function of the Golgi complex in transitional epithelium: Synthesis of the thick cell membrane. *J Cell Biol*, 30: 623-643.

Hicks R. M. 1975. The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 50: 215-246.

Hicks R. M., Chowanec J. 1978. Experimental induction, histology and ultrastructure of hyperplasia and neoplasia of the urinary bladder epithelium. *Int Rev Exp Pathol*, 18: 199-280.

Hieber A. D., Corcino D., Motouse J., Sandberg L. B., Roosb P.J., Yeh Yuc S., Csiszard K., Kagane H. M., Boydd C. D., Bryant-Greenwood G. D. 1997. Detection of elastin in human fetal membranes: proposed molecular basis for elasticity. *Placenta*, 18: 301-312.

Higa K., Shimmura S., Shimazaki J., Kazuo T. 2005. Hyaluronic acid-CD44 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma. *Cornea*, 24: 206-212.

Hopkinson A., Shanmuganathan V. A., Yeung AM., Gray T., Lowe J., Dua H.S. 2008. Optimization of amniotic membrane denuding for tissue engineering. *Tissue Eng*, 14: 371-381.

Hori J., Wang M., Kamiya K., Hiroshi T., Norio S. 2006. Immunological characteristics of amniotic epithelium. *Cornea*, 25: 53-58.

Hu C. C., Liang F. X., Zhou G., Tu L., Tang C.H., Zhou J., Kreibich G., Sun T.T. 2005. Assembly of urothelial plaques: tetraspanin function in membrane protein trafficking. *Mol Biol Cell*, 16: 3937-3950.

Ishino Y., Sano Y., Nakamura T., Connon C. J., Rigby H., Fullwood N.J., Kinoshita S. 2004. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45: 800-806.

Jezerink K., Kreft M. E. 2010. Tesnostične pregrade v našem telesu. *Med Razgl*, 49: 51-62.

Jin C. Z., Park S.R., Choi B. H., Lee K. Y., Kang C.K., Min B. H. 2007. Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. *Tissue Eng*, 13: 693-702.

Kachar B., Liang F. X., Lins U., Ding M., Wu X. R., Stoffler D., Aebi U., Sun T.T. 1999. Three-dimensional analysis of the 16 nm uroepithelial plaque particle: luminal surface exposure, preferential head-to-head interaction, and hinge formation. *J Mol Biol*, 285: 595-608.

Kamiya K., Wang M., Uchida S., Amano S., Oshika T., Sakuragawa N., Hori J. 2005. Topical application of culture supernatant from human epithelial cells suppresses inflammatory reactions in cornea. *Exp Eye Res*, 80: 671-679.

Khandelwal P., Abraham S. N., Apodaca G. 2009. Cell biology and physiology of the uroepithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*, 297: F1477-F1501.

Khouw I. M., van Wachelm P. B., Plantinaga J. A., Vujaskovic Z., Wissink M. J. B., de Leij L., van Luyn M. 1999. TGF-beta and bFGF affect the differentiation of proliferating porcine fibroblasts into myofibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 20: 1815-1822.

Kim B. S., Carlos E. B., Atala A. 2000. Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol*, 18: 2-9.

King A. E., Paltoo A., Kelly R. W., Sallenave J. M., Bockingabc A. M., Challis J. R. G. 2007. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta*, 28: 161-169.

King B. F. 1982. Cell surface specializations and intracellular junctions in human amniotic epithelium: an electron microscopic and freeze-fracture study. *Anat Rec*, 203: 73-82.

King B. F. 1985. Related distribution and characterization of anionic sites in the basal lamina of the developing human amniotic epithelium. *Anat Rec*, 212: 57-62.

Kiviranta P., Rieppo J., Korhinen R.K., Julkunen P., Töyräs J., Jurvelin J. S. 2006. Collagen network primarily controls Poissons ratio of bovine articular cartilage in compression. *J Orthop Res*, 24: 690-699.

Kobayashi K., Kadohira I., Tanaka M., Yoshimura Y., Ikeda K., Yasui M. 2009. Expression and distribution of tight junction proteins in human amnion during late pregnancy. *Placenta*, 31: 158-162.

Koizumi N. J., Inatomi T. J., Sotozono C. J., Fullwood N. J., Quantock A. J., Kinoshita S. 2000a. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res*, 20: 173-177.

Koizumi N. J., Fullwood N. F., Bairaktaris G., Inatomi T., Kinoshita S., Quantock A.J. 2000b. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41: 2506-2513.

Koizumi N. J., Rigby H., Fullwood N. F., Kawasaki S., Tanioka H., Koizumi K., Kociok N., Jousen A. M., Kinoshita S. 2007. Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 245:123-134.

Kong X. T., Deng F. M., Hu P., Liang F. X., Zhou G., Auerbach A. B., Genieser N., Nelson P. K., Robbins E. S., Shapiro E., Kachar B., Sun T.T. 2004. Roles of uroplakins in plaque formation, umbrella cell enlargement, and urinary tract diseases. *JCB*, 167: 1195-120.

Koss L. G. 1969. The asymmetric unit membranes of the epithelium of the urinary bladder of the rat. An electron microscopic study of a mechanism of epithelial maturation and function. *Lab Invest*, 21: 154-168.

Kreft M. E., Romih, R., Sterle, M. 2002. Antigenic and ultrastructural markers associated with urothelial cytodifferentiation in primary explant outgrowths of mouse bladder. *Int Cell Biol*, 26: 63-74.

Kreft M. E., Sterle, M., Veranič, P., Jezernik, K. 2005. Urothelial injuries and the early wound healing response: tight junctions and urothelial cytodifferentiation. *Histochem Cell Biol*, 123: 529-539.

Kreft M. E., Sterle, M., Jezernik, K. 2006. Distribution of junction and differentiation related proteins in urothelial cells at the leading edge of primary explant outgrowths. *Histochem Cell Biol*, 125: 475-485.

Kreft M. E., Jezernik, K., Kreft, M., Romih R. 2009a. Apical plasma membrane traffic in superficial cells of bladder urothelium. *Ann NY Acad Sci*, 1152: 18-29.

Kreft M. E., Romih, R., Kreft, M., Jezernik, K. 2009b. Endocytotic activity of bladder superficial urothelial cells is inversely related to their differentiation stage. *Differentiation*, 77: 48-59.

Kreft M.E., Hudoklin, S., Jezernik, K., Romih, R. 2010. Formation and maintenance of blood-urine barrier in urothelium. *Protoplasma*, Jun 4. 10.1007/s00709-010-0112-1.

Krisanaprakornkit S., Weinberg A., Perez C. N., Dale B. A. 1998. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun*, 66: 4222-4228.

Kruse F. E., Jousen A. M., Rohrsnieder K., You L., Sinn B., Baumann J., Völcker H.E. 1999. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 238: 68-75.

Kubo M., Sonoda Y., Muramatsu R., Usui M. 2001. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42: 1539-1546.

Lee S. H., Tseng S. C. 1997. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol.* 123: 303-312.

Letko E., Stechschulte S. U., Kenyon K. R., Sadeq N., Romero T. R., Samson C. M., Nguyen Q. D., Harper S. L., Primack J. D., Azar D. T., Gruterich M., Dohlman C. H., Baltatzis S., Foster C. S. 2001. Amniotic membrane inlay and overlay grafting for corneal epithelial defects and stromal ulcers. *Arch Ophthalmol*, 119: 659-663.

Lewis S. A., Diamond J. M. 1976. Na⁺ transport by rabbit urinary bladder, a tight epithelium. *J Membr Biol*, 28: 1-40.

Lewis S. A. 2000. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol.* 278: F867-F874.

Li H., Niederkon J., Neelam S., Mayhew E., Word R.A., McCulley J. P., Alizadeh H. 2005. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest Ophthalmol*, 46: 900-907.

Liang F. X., Riedel I., Deng F. M., Zhou G., Xu C., Wu X. R., Kong X. P., Moll R., Sun T. T. 2001. Organization of uroplakin subunits: transmembrane topology, pair formation and plaque composition. *Biochem J*, 355: 13-18.

Lister U. M. 1968. Ultrastructure of the human amnion, chorion and fetal skin. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*, 75: 327-341.

Lo V., Pope E. 2009. Amniotic membrane use in dermatology. *Int J Dermatol*, 48: 935-940.

Mano J. F., Silva G. A., Azevedo H. S., Malafaya P. B., Sousa R. A., Silva S. S., Boesel L. F., Oliviera J. M., Santos T. C., Marques A. P., Neves N. M., Reis R. L. 2007. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J R Soc Interface*, 4: 999-1030.

Mikek K., Pfeifer V., Olup B. D. 2004. Uporaba amnijske membrane v očesni kirurgiji. *Zdrav Vest*, 73: 419-422.

Miki T., Strom S. C. 2006. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev*, 2: 133-141.

Miki T., Mitamura K., Ross M., Stolz D. B., Strom SC. 2007. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J Reprod Immunol*, 75: 91-96.

Mligiliche N., Endo K., Okamoto K., Fujimoto E., Ide C. 2002. Extracellular matrix of human amnion manufactured into tubes as conduits for peripheral nerve regeneration. *J Biomed Mater Res*, 63: 591-600.

Mohammad J., Shenaq J., Rabinovsky E., Saleh S. 2000. Modulation of peripheral nerve regeneration: a tissue-engineering approach. The role of amnion tube nerve conduit across a 1-centimeter nerve gap. *Plast Reconstr Surg*, 105: 660-666.

Moiseeva E. P. 2001. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res*, 52: 372-386.

Niknejad H., Habibollah P., Jorjani M., Ahmadiani A., Ghanavi J., Seifalian AM. 2008. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater*, 15: 88-99.

Norris M. A., Cohen M. S., Warren M. M., Becker S. N., Baur P. S., Seybold H. M. 1982. Bladder reconstruction in rabbits with glutaraldehyde-stabilized amniotic membranes. *Urology*, 19: 631-635.

Novikoff A. B. 1961. Lysosomes are related particles. *The Cell*, 11: 423-488.

Perrone R. D., Johns C., Grubman S.A, Moy E., Lee D. W., Alroy J., Sant G. R., Jefferson D. M. 1996. Immortalized human bladder cell line exhibits amiloride-sensitive sodium absorption. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*, 271: F148-F153.

Petrovič, D. 2003. Normalen razvoj človeškega zarodka in nepravilnosti v njegovem razvoju. *Med razgli*, 42:183-201.

Pollard S. M., Aye N. N., Symons E. M. 1976. Scanning electron microscope appearances of normal human amnion and umbilical cord at term. *Br J Obstet Gynaecol*, 83: 470-477.

Porter K. R., Kenyon K. Badenhausen S. 1967. Specializations of the unit membrane. *Protoplasm*, 63: 262-274.

Rhodin J. A. G. 1974. Histology. A text and atlas. *New York et al. University Press*. Fig. 32-35.

Romih R., Jezernik K., Masera A. 1998. Uroplakins and cytokeratins in the regenerating rat urothelium after sodium saccharin treatment. *Histochem. Cell Biol*, 109: 263-269.

Romih R., Veranič P., Jezernik K. 1999. Actin filaments during terminal differentiation of urothelial cells in the rat urinary bladder. *Histochem Cell Biol*, 112: 375-380.

Romih R., Koprivec D., Martinčič D. S., Jezernik K. 2001. Restoration of the rat urothelium after cyclophosphamide treatment. *Cell Biol Int*, 25: 531-537.

Romih R., Korošec P., de Mello W., Jezernik K. 2005. Differentiation of epithelial cells in the urinary tract. *Cell Tissue Res*. 320: 259-268.

Sargent I. L. 1993. Maternal and fetal immune responses during pregnancy. *Exp Clin Immunogenet*, 10: 85-102.

Sawhney C. P. 1989. Amniotic membrane as a biological dressing in the management of burns. *Burns*, 15: 339-342.

Seeds A. E., Stolee A., Eichhorst. 1975. Permeability of human chorion laeve to diazepam and meperidine. *Obstet Gynecol*, 47: 28-30.

Sharifiaghdas F., Hamzehiesfahani N., Moghadasali R., Ghaemimanesh F., Baharvand H. 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: 71-8.

Shimoya K., Zhang Q., Tenma K., Ota Y., Hashimoto K., Shizusawa Y., Kimura T., Koyama M., Murata Y. 2003. Fractalkine (FRK) levels in amniotic fluid and its production during pregnancy. *Mol Hum Reprod*, 9: 97-101.

Shokeir A. A. 2001. A novel technique of ureteroneocystostomy (extravesical seromuscular tunnel): a preliminary clinical study. *Urology*, 57:1055-1058.

Sikavitsas V. I., Temenoff J. S., Mikos A. G. 2001. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*, 22: 1581-1593.

Singer S. J. in Nicolson G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175: 720-731.

Solomon A., Rosenblatt M., Monroy D., Ji Z., Pflugfelder S. C., Tseng S. C. 2001. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol*, 85: 444-449.

Southgate J. in Wood D. 2008. Current status of tissue engineering in urology. *Current Opinion in Urology*, 18: 564-569.

Spurr S. J., Gipson I. K. 1985. Isolation of corneal epithelium with dispase II or EDTA. Effects on basement membrane zone. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 26: 818-827.

Staehelin L. A., Chlapowski F. J., Bonneville M. A. 1972. Luminal plasma membrane of the urinary bladder. *J Cell Biol*, 53: 73-91.

Stenn K. S., Link R., Moellmann G., Madri J., Kuklinska E. 1989. Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J Invest Dermatol*, 93: 287-290.

Sun T. T. 2006. Altered phenotype of cultured urothelial and other stratified epithelial cells: implications for wound healing. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291: F9-F21.

Taipale J., Keski-Oja J. 1997. Growth factors in the extracellular matrix. *The FASEB Journal*, 11: 51-59.

Thomas C. E. 1965. The ultrastructure of human amnion epithelium. *J Ultrastruct Res*, 13: 65-84.

Toda A., Motonori O., Yoshida T., Nikaïdo T. 2007. The potential of Amniotic Membrane/Amnion Derived Cells for Regeneration of Various Tissues. *J Pharmacol Sci*, 195: 215-228.

Tsai S. H., Liu Y. W., Tang W. C., Zhou Z. W., Hwang C. Y., Hwang G. Y., Ou B. R., Hu C. P., Yang V. C., Chen J. K. 2007. Characterization of porcine arterial endothelial cells cultured on amniotic membrane, a potential matrix for vascular tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun*, 357: 884-900.

Tseng S. C., Li D. Q., Ma X. 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: 325-335.

Tu L., Sun T. T., Kreibich G. 2002. Specific heterodimer formation is a prerequisite for uroplakins to exit from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, 13: 4221-4320.

van Herendael B. J., Obreti C., Brosens I. 1978. Microanatomy of the human amniotic membranes: a light microscopic, transmission and scanning electron microscopic study. *Am J Obstet Gynaecol*, 131: 872-880.

Veranič P., Jezernik K. 2002. Trajectory organization of cytokeratins within the subapical region of umbrella cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 53: 317-325.

Veranič P., Romih R., Jezernik K. 2004. What determines differentiation of urothelial umbrella cells? *Eur J Cell Biol*, 83: 27-34.

Veranič P., Erman A., Kerec-Kos M., Bogataj M., Mrhar A., Jezernik K. 2009. Rapid differentiation of superficial urothelial cells after chitosan-induced desquamation. *Histochem Cell Biol*, 131: 129-139.

Višnjar T. 2009. Fiziološke in strukturne spremembe v urotelijskih celicah *in vitro* med diferenciacijo. *Diplomsko delo. Biotehniška fakulteta. Univerza v Ljubljani.*

Walgenbach K. J., Voigt M., Raibikhin A.W., Andree C., Schaefer D.J., Galla T.J., Stark GB. 2001. Tissue engineering in plastic reconstructive surgery. *Anat Rec*, 263: 372-378.

Wu X. R., Medina J.J., Sun T.T. 1995. Selective interactions of UPIa and UPIb, two members of the transmembrane 4 superfamily, with distinct single transmembrane-domained proteins in differentiated urothelial cells. *J Biol Chem*, 270: 29752-29759.

Young M. J., Borrás T., Walter M., Ritch R. 2005. Tissue bioengineering: potential applications to glaucoma. *Arch Ophthalmol*, 123: 1725-1731.

Yang S., Leong K. F., Du Z., Chua C. K. 2001. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng*, 7: 679-689.

Yang L., Shirakata Y., Shudou M., Dai X., Tokumaru S., Hirakawa S., Sayama K., Hamuro J., Hashimoto K. 2006. New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane. *Cell Tissue Res*, 326: 69-77.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Mateji Erdani Kreft, ki je ob svojem delu vedno našla dovolj časa za pomoč in koristne nasvete pri delu v laboratoriju in pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvala gre tudi Tanji Višnjari, ki me je uvedla v delo v laboratoriju in je bila vedno pripravljena odgovorjati na moja vprašanja.

Zahvaljujem se vsem zaposlenim na Inštitutu za biologijo celice:

prof. dr. Kristijanu Jezerniku, izr. prof. dr. Petru Veraniču, izr. prof. dr. Roku Romihu, asist. dr. Andreji Erman, asist. dr. Daši Zupančič, asist. dr. Samu Hudoklinu, asist. Nataši Resnik, Sabini Železnik, Sanji Čebraja, Nadi Pavlica, Lindi Štrus in Marini Jeriha.

Zahvala tudi prof. dr. Branki Stirn Kranjc in Mateju Beltramu dr. med iz Očesne klinike, ge. Marjani Limoni iz Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, dr. Nevenki Velikonja Kergar iz Educell d.o.o., asist. dr. Lilijani Bizjak Mali iz Biotehniške fakultete katedre za zoologijo ter članoma komisije prof. dr. Jasni Štrus in prof. dr. Borisu Bulogu.

Iskrena zahvala tudi staršema, ki sta mi študij omogočila, bratoma, fantu, prijateljem in vsem, ki so mi v času študija ter nastajanja diplomskega dela stali ob strani in verjeli vame.

PRILOGE

Priloga A: Povprečna površina celic z uroplakini glede na nosilec po treh tednih gojenja v μm^2 . M - aritmetična sredina, SE - standardna napaka, N - velikost vzorca, AMsp –porozne membrane z amnijsko membrano v mediju pod njimi, Intaktna AM - intaktna amnijska membrana, Gola AM – gola amnijska membrana, Vezivno tkivo AM – vezivno tkivo amnijske membrane.

	M [μm^2]	SE	N
Kontrola	9226.40	701.87	60
AMsp	8200.24	420.42	70
Intaktna AM	5888.00	340.87	20
Gola AM	4463.34	482.48	40
Vezivno tkivo AM	7197.77	360.26	40

Priloga B: Povprečna površina celic z uroplakini glede na nosilec po sedmih tednih gojenja v μm^2 . M - aritmetična sredina, SE - standardna napaka, N – velikost vzorca, AMsp – na porozne membrane z amnijsko membrano v mediju pod njimi, Vezivno tkivo AM – vezivno tkivo amnijske membrane.

	M [μm^2]	SE	N
Kontrola	13477.44	210.28	40
AMsp	12835.87	330.65	40
Vezivno tkivo AM	9277.08	758.92	40

Priloga C: Povprečna površina celic z uroplakini glede na nosilec po treh tednih gojenja v %. M - aritmetična sredina, SE - standardna napaka, N - velikost vzorca, AMsp –porozne membrane z amnijsko membrano v mediju pod njimi, Intaktna AM - intaktna amnijska membrana, Gola AM – gola amnijska membrana, Vezivno tkivo AM – vezivno tkivo amnijske membrane.

	M [μm^2]	SE	N
Kontrola	60.19	4.58	60
AMsp	53.47	2.75	70
Intaktna AM	38.39	2.22	20
Gola AM	29.1	3.14	40
Vezivno tkivo AM	46.93	2.35	40

Priloga D : Povprečna površina celic z uroplakini glede na nosilce po sedmih tednih gojenja v %. M - aritmetična sredina, SE - standardna napaka, N - velikost vzorca, AMsp –porozne membrane z amnijsko membrano v mediju pod njimi, Vezivno tkivo AM – vezivno tkivo amnijske membrane.

	M [μm^2]	SE	N
Kontrola	87.88	1.37	40
AMsp	83.70	2.15	40
Vezivno tkivo AM	60.50	4.94	40

Priloga E: Povprečna intenziteta fluorescence uroplakinov glede na nosilce po treh tednih gojenja. M - aritmetična sredina, SE - standardna napaka, N - velikost vzorca, AMsp – porozne membrane z amnijsko membrano v mediju pod njimi, Intaktna AM - intaktna amnijska membrana, Gola AM – gola amnijska membrana, Vezivno tkivo AM – vezivno tkivo amnijske membrane.

	M [a.e.]	SE	N
Kontrola	3524.30	163.22	60
AMsp	3333.02	196.99	70

	M [a.e.]	SE	N
Intaktna AM	836.53	63.09	20
Gola AM	2303.11	241.93	40
Vezivno tkivo AM	2592.81	200.22	40

Priloga F: Povprečna intenziteta fluorescence uroplakinov glede na nosilce po sedmih tednih gojenja. M - aritmetična sredina, SE - standardna napaka, N - velikost vzorca, AMsp – porozne membrane z amnijsko membrano v mediju pod njimi, Vezivno tkivo AM – vezivno tkivo amnijske membrane.

	M [a.e.]	SE	N
Kontrola	1620.81	110.53	40
AMsp	2604.43	60.93	40
Vezivno tkivo AM	2431.34	122.92	40

Priloga G: Razporeditev uroplakinov po z-osi v tri tedne starih urotelijskih celicah, nasajenih na različne nosilce. M - aritmetična sredina, SE - standardna napaka, N - velikost vzorca, AMsp - porozne membrane z amnijsko membrano v mediju pod njimi, Vezivno tkivo AM – vezivno tkivo amnijske membrane.

	M [μm]	SE	N
Kontrola	3.26	0.22	10
AMsp	2.95	0.16	10
Vezivno tkivo AM	2.86	0.13	10

Priloga H: Razporeditev uroplakinov po z-osi v sedem tednov starih urotelijskih celicah, nasajenih na različne nosilce. M - aritmetična sredina, SE - standardna napaka, N - velikost vzorca, AMsp – porozne membrane z amnijsko membrano v mediju pod njimi, Vezivno tkivo AM – vezivno tkivo amnijske membrane.

	M [μm]	SE	N
Kontrola	2.54	0.12	10
AMsp	2.49	0.15	10
Vezivno tkivo AM	2.45	0.14	10

Priloga I: Razporeditev uroplakinov po z-osi v tri tedne starih urotelijskih celicah, nasajenih na intaktno in golo amnijsko membrano. M - aritmetična sredina, SE – standardna napaka, N - velikost vzorca, Intaktna AM – intaktna amnijska membrana, Gola AM – gola amnijska membrana.

	M [μm]	SE	N
Intaktna AM	2.57	0.09	10
Gola AM	2.93	0.08	10

Priloga J: Meritve TER urotelijskih celičnih kultur, nasajenih na kontrolne membrane. M - aritmetična sredina, SE - standardna napaka, N - velikost vzorca.

Datum	M [Ωcm^2]	SE	N
23.4.2010	0.19	0.01	14
26.4.2010	0.72	0.06	14
28.4.2010	2.36	0.09	14
29.4.2010	2.76	0.12	14
30.4.2010	3.02	0.23	14
3.5.2010	2.35	0.06	14
4.5.2010	3.04	0.12	14
5.5.2010	3.37	0.16	14
6.5.2010	3.69	0.19	14
7.5.2010	3.81	0.21	14
10.5.2010	3.46	0.14	14

Datum	M [Ωcm^2]	SE	N
11.5.2010	4.65	0.18	14
12.5.2010	4.85	0.21	14
13.5.2010	5.15	0.29	14
14.5.2010	5.67	0.32	14
17.5.2010	3.16	0.07	14
18.5.2010	4.74	0.22	14
19.5.2010	4.64	0.21	14
20.5.2010	4.31	0.18	14
21.5.2010	4.95	0.22	14
24.5.2010	4.46	0.23	14
25.5.2010	5.04	0.29	14
26.5.2010	4.42	0.29	14
27.5.2010	4.58	0.21	14
28.5.2010	6.00	0.41	14
31.5.2010	4.57	0.34	14
1.6.2010	5.82	0.43	14
2.6.2010	5.47	0.35	14
3.6.2010	5.58	0.33	14
4.6.2010	5.68	0.41	14
7.6.2010	5.46	0.25	14
8.6.2010	8.07	0.46	14
9.6.2010	6.16	0.50	14
10.6.2010	6.19	0.29	14
11.6.2010	6.15	0.48	14
14.6.2010	4.57	0.26	14
15.6.2010	6.64	0.27	14
16.6.2010	6.42	0.27	14
17.6.2010	6.36	0.37	14
18.6.2010	7.26	0.45	14
Povprečje	4.64	0.08	560

Priloga K: Meritve TER urotelijskih celičnih kultur, ki so rasle pod vplivom amnijske membrane. M - aritmetična sredina, SE - standardna napaka, N - velikost vzorca.

Datum	M [Ωcm^2]	SE	N
23.4.2010	0.17	0.001	6
26.4.2010	0.31	0.02	6
28.4.2010	0.91	0.23	6
29.4.2010	1.76	0.26	6
30.4.2010	2.06	0.20	6

Datum	M [Ωcm^2]	SE	N
3.5.2010	2.17	0.17	6
4.5.2010	3.02	0.11	6
5.5.2010	3.82	0.28	6
6.5.2010	3.31	0.58	6
7.5.2010	3.67	0.23	6
10.5.2010	2.96	0.13	6
11.5.2010	3.89	0.17	6
12.5.2010	4.40	0.36	6
13.5.2010	4.55	0.30	6
14.5.2010	4.73	0.47	6
17.5.2010	3.24	0.23	6
18.5.2010	4.50	0.30	6
19.5.2010	4.60	0.36	6
20.5.2010	5.61	0.53	6
21.5.2010	6.12	0.60	6
24.5.2010	5.46	0.51	6
25.5.2010	5.37	0.54	6
26.5.2010	5.10	0.47	6
27.5.2010	6.85	0.55	6
28.5.2010	6.23	0.45	6
31.5.2010	4.86	0.14	6
1.6.2010	5.71	0.39	6
2.6.2010	6.30	0.28	6
3.6.2010	6.40	0.44	6
4.6.2010	6.40	0.68	6
7.6.2010	4.87	0.67	6
8.6.2010	6.63	0.91	6
9.6.2010	6.11	0.76	6
10.6.2010	6.74	0.93	6
11.6.2010	6.79	0.46	6
14.6.2010	4.91	0.41	6
15.6.2010	6.63	0.63	6
16.6.2010	6.46	0.47	6
17.6.2010	7.00	0.68	6
18.6.2010	6.85	0.88	6
Povprečje	4.69	0.14	240