

DENEYSSEL İNTERSTİSİYEL SİSTİT MODELİ : IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOPİK İNCELEME

EXPERIMENTAL INTERSTITIAL CYSTITIS : INVESTIGATION ON LIGHT AND TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPIC BASIS

ÇETİNEL, B.* , ŞAN, T.** , DEMİRKESEN, C.*** , DEMİRKESEN, O.* , BELGE, A.**** , OKAR, İ.** , ÇETİNEL, Ş.** , ÖZ, F.*** , SOLOK, V.*

* İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı

** Marmara Üniv. Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

*** İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

**** Yüzüncü Yıl Üniv. Veteriner Fak. Cerrahi Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada bir glikozaminoglikan (GAG) inaktivatörü olan protaminin mesane instilasyonlarının köpek mesane epiteli üzerindeki etkileri ışık ve transmisyon elektron mikroskopi (TEM) düzeyinde incelenmiş ve protaminin köpek mesanesinde "leaky epithelium" oluşturduğu tesbit edilmiştir. Literatürdeki intersitisiyel sistit ile ilgili deneysel ve klinik çalışmalar göz önüne alındığında protamin mesane instilasyonlarıyla deneysel modelde intersitisiyel sistit oluşturabileceği sonucuna varıldı.

SUMMARY

Protamine is a known inactivator of glycosaminoglicans. In this study, the effects of protamine bladder instillations on dog bladder epithelium were investigated on light and transmission electron microscopic basis, and it was concluded that protamine bladder instillations in dogs resulted in "leaky epithelium". Reviewing the literature about experimental and clinical studies on interstitial cystitis, it was our conclusion that protamine bladder instillations could result in experimental interstitial cystitis model.

GİRİŞ

Mesane transisyonel epitel yüzeyini örten glikozaminoglikan (GAG) tabakasının

önemi son yıllarda sıklıkla vurgulanmaktadır. Hidrofilik özelliğiyle idrardaki bakterilerin, mikrokristallerin , çeşitli iyon ve moleküllerin mesane yüzeyine yapışmasını engelleyen bu tabaka transisyonel epitelin mesane idrar arası bariyer işlevinde önemli katkı sağlamaktadır (1,2).

Bir kuartarnen amin olan protamin 'in hayvanlarda hücre yüzeyi polisakkaridlerini inaktive ederek epitel permeabilitesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca protamin'in yüzey membranlarında permeabilite artışına neden olduğu belirtilmiştir (3,4). Protaminin anefrik sıçanlarda pulmoner hipertansiyon ve ödeme neden olduğu bildirilmiştir (5,6). Parson intersitisiyel sistitli hastalarda mesane epitel permeabilitesinde artış olduğunu üre difüzyon çalışmasıyla fizyolojik olarak, Eldrup ise ince yapısal düzeyde göstermiştir (2,7). Stein hayvanlarda protamin'in mesane epitelinde permeabilite artışına neden olduğunu fizyolojik olarak göstermiş ve protamin ile deneysel modelde intersitisiyel sistit oluşturulabileceğini ileri sürmüştür (8).

Bu çalışmada amacımız protamin'in köpek mesane epiteli üzerindeki etkisini histolojik ve yüksek mikroskop büyütmelerinde kullanarak ince yapısal düzeyde incelemektir ve bilgimiz dahilinde kullandığımız inceleme yöntemiyle bu konudaki ilk çalışmadır.

MATERYAL VE METOD

Çalışma 7'si dişi, 4'ü erkek toplam 11 köpek üzerinde yapıldı. Köpeklerin yaşları 6 ay-

7 yaş (ortalama 3 yaş) ağırlıkları 8.5-26 kg. (ortalama 17 kg) arasında değişmekteydi. 8 deney hayvanının mesanelerine 5 hafta süreyle haftada 2 kez dörder ampul (20 cc) protamin hidroklorid uretral kateterle verildi. Kontrol grubundaki 3 köpeğin mesanelerinde 5 hafta süreyle haftada 2 kez 20 cc serum fizyolojik instilasyonu yapıldı. Birinci, üçüncü ve beşinci haftalarda genel anestezi altında suprapubik median kesiyle açık mesane biyopsileri alındı. Köpeklerin instilasyon öncesi ve sonrası idrar kültürleri yapıldı ve üriner enfeksiyon tesbit edilen protamin grubundan 2, kontrol grubundan 1 köpek çalışma dışı bırakıldı.

Biyopsiler histolojik değerlendirme için Bouin fiksasyonundan sonra parafin kesitlere rutin alkol takibi yapıp, HE (Hematoksilen-Eozin), PAS VAN- GİESON , TOLUIDİN MAVİSİ, MASSON boyaları ile boyandı. Pas Van Gieson boyalarıyla yüzeyde pembeye boyanan nonasid mukopolisakkarid tabaka ve lamina propriada kahverengi turuncuya boyanan proteinöz madde birikimi incelendi. Toluidin mavisi mast hücrelerini, Masson ise bağ dokusu artışını göstermek için kullanıldı.

Elektron mikroskopik incelemeler için alınan biyopsiler, glutaraldehidin % 3'lük kakodilat tampon (0.15 M, pH 7.2) ve % 1'lik osmium tetroksit içerisinde fikse edildiler. Epon 812 içinde bloklanan biyopsiler NOVA ultramikrotomunda 60 mm kalınlıkta kesilerek, uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandıktan sonra JEOL EM 1200 mikroskobunda incelendi.

BULGULAR

A) Işık mikroskopisinde bulgular (Resim 1-4)

a) Kontrol bulguları

Ürotelyumun 4-5 katlı değişti epitelten oluştuğu ve yüzeyindeki GAG'ın düzenli varlığı tespit edildi. Lamina propriada damarlanma belirgindi (köpeklere özgü). Damarlar etrafında tek tük mast hücreleri görüldü. Kas tabakasında bir büyük büyütme ile en fazla bir mast hücresi görüldü.

b) Protamin instilasyonu sonrası bul-

gular

(I) Birinci ve üçüncü hafta bulguları

Kontrol bulgularından önemli bir farklılık tespit edilmedi.

(II) Beşinci hafta bulguları

Ürotelyumda kısmi dökülme, yer yer atrofi, kısmi GAG kaybı (1 köpekte tam GAG kaybı), lamina propriada polimorflardan zengin belirgin iltihabi hücre infiltrasyonu, kas tabakasında proteinöz madde varlığı ve hem lamina propriada hem kas tabakasında mast hücrelerinde artış tesbit edildi.

B) TEM bulguları (Resim 5-13)

a) Kontrol bulguları

Luminal epitel hücreleri kesin sınırlarla ayırt edilmemekle beraber nükleer yapıların pleoformik karakter gösterdiği izlendi. Hücrelerin lümen bakan yüzeyleri oldukça düzgün görünümdeydi. Hücre içinde çok sayıda intrastoplazmik fuziform veziküller gözlemlendi. Bu vezikülleri çevreleyen membranın asimetrik membran (AUM) özelliği gösterdiği izlendi. Hücreler arası bağlantı komplekslerinden sıkı bağlantılar (tight junction) luminal yüzeydeki çok sayıda fuziform vezikül nedeniyle gösterilemedi ancak alt katmanlarda hücreler arası alanların darlığı sıkı desmozomal yapılarla izlendi.

b) Protamin instilasyonu sonrası bulgular

(I) Üçüncü hafta bulguları

Kontrol mesane epitel luminal konturu düz bir hat şeklindeyken üçüncü haftada bu yapı oldukça girintili çıkıntılıydı. Hücre lümen yüzeylerinde mikrovillus oluşumu gözlemlendi. Yüzey hücre yan yüzleri arasındaki hafif ayrılmalar ve intersitisyel alanda genişleme belirgindi. Değişici epitelin bazale yakın alt katmanlarında hücreler arası ayrılmaların sitoplazmik uzantılarla sürdürülmeye çalışıldığı izlendi. Desmozomların izlenebildiği hücreler arası bağlantıların desmozomlar arası açılmaları dikkat çekiciydi.

(II) Beşinci hafta bulguları

Luminal hücrelerde bir miktar sitoplazmik korunmaya karşın membran kayıplarına paralel yönde bir hücre dejenerasyonu ve lizozomal artış yoğun şekilde izlendi. Hücreler arası alanlarda genişleme ve hücrelerin birbirlerinden uzaklaştığı görüldü. Bazal katmanlara doğru hücreler arası alanların iyice genişlediği ve bağımsız hücre adacıklarının oluştuğu izlendi.



Resim 1: (Kontrol) Düzenli yapıda köpek mesanesi. (HEX32)



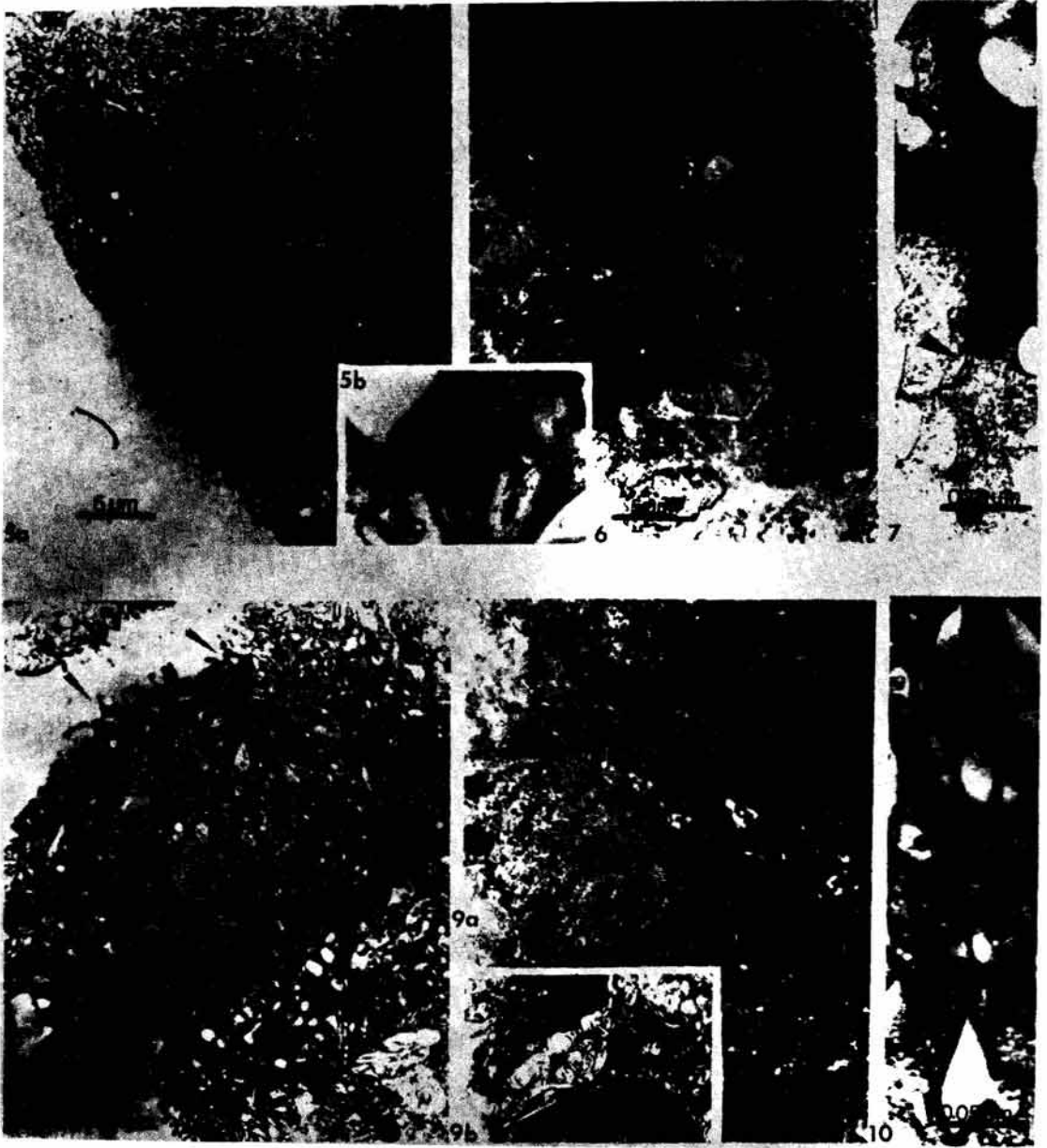
Resim 3: (Kontrol) Urotelyum ve üzerindeki GAG tabakası düzenli olarak izlenmekte (PVG x 80)



Resim 2: (Protamin sonrası beşinci hafta) Epitel çoğu alanda normal. Lamina propriada ödem, damarlanma artışı, proteinöz madde varlığı (HEX32)



Resim 4: (Protamin sonrası beşinci hafta) Yüzeyde GAG tabakası yer yer kaybolmuş Lamina propriada sarı kahverengi boyanan madde varlığı (PVGx32)



Resim 5a: (Kontrol) Düzgün mesane epitel yüzeyi (→) ve hücreler içerisinde fuziform veziküller.

Resim 5b: (Kontrol) Vezikül (V) içindeki AUM varlığı (→)

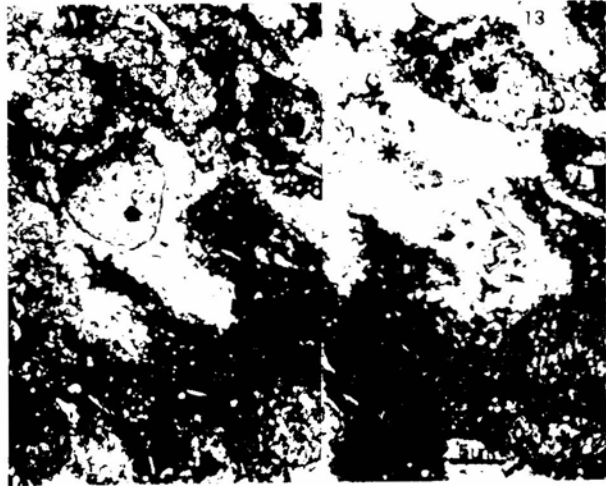
Resim 6: (Kontrol) Luminal epitel hücreleri kesin sınırlarla ayırd edilememekte, nükleer yapılar pleomorfik özellik göstermekte.

Resim 7: (Kontrol) Desmosomlar arası sıkı bağlantılar (→)

Resim 8: (Protamin sonrası üçüncü hafta) Hücre lümen yüzeyinde mikrovillus oluşumu (→)

Resim 9a: (Protamin sonrası üçüncü hafta) Epitel hücre alanlarında genişlemiş sıkı bağlantılar.

Resim 9b: (Protamin sonrası üçüncü hafta) Genişlemiş sıkı bağlantıların büyütülmüş şekli.



esim 11: (Protamin sonrası beşinci hafta) Ücreler arası alanlarda genişlemeler (↔).Hücre rejenerasyonu

esim 12: (protamin sonrası beşinci hafta) Ağımsız hücre adacıkları oluşması (↔)

esim 13: (Protamin sonrası beşinci hafta) Bazal alanlarda hücre nekrozu (*)

TARTIŞMA

İntersitisyel sistit etyopatogenezi halen belli olmayan bir ürolojik sorundur. Son zamanlarda mesane epiteli GAG tabakasındaki bir defektin epitel permeabilitesinde artışa neden olarak (leaky epithelium), idrardaki toksik maddelerin epitelden geçerek intersitisyel sistitdeki tabloyu oluşturduğu görüşü popülarite kazanmıştır (2,7). Ancak bu görüş tartışmalıdır (9). Mesane epiteli yüzeyindeki GAG tabakası negatif elektrik yüklüdür ve suyla iyonik olarak bağlanma eğilimindedir. Bunun sonucunda da mesane yüzeyiyle idrar arasında bir barrier oluşmakta ve idrardaki toksik maddeler mesane yüzey hücre membranına ulaşmamakta, yapışmamakta ve difuze olamamaktadırlar (2). Bunun yanı sıra kuartarner aminler, GAG tabakası ile kimyasal reaksiyona girdiklerinde GAG sülfat gruplarına bağlanma eğilimindeki suyla kompetisyona girerler ve GAG tabakasının epitel impermeabilitesini sağlama işlevini bloke ederler (2). Parsons intersitisyel sistitte başlatıcı faktörün GAG tabakasındaki bir yetersizlik olduğunu öne sürmüştür. Halen intersitisyel sistit etyopatogenezinde en geçerli görüşlerden biri olmasına rağmen GAG tabakasının intersitisyel sistit'li hastalarda morfolojik olarak yetersizliğiyle ilgili çalışmaların sonuçları çelişkilidir (2,7,9,10). İntersitisyel sistitli hastalarda yaptığımız çalışmada mesane GAG tabakasının % 90.9 oranında kaybolduğunu göstermiştik (11).

Bu çalışmada protamin instilasyonu sonrası 5. haftada ışık mikroskopisinde üroteilyumda kısmi dökülme, kısmi ve tam GAG kaybı, lamina propriada iltihabi hücre infiltrasyonu ve lamina propria ve kas tabakasında mast hücrelerinde artış dikkat çeken bulgulardı. Bu bulgular intersitisyel sistitli hastalarda yaptığımız klinikopatolojik çalışmamızdaki histopatolojik bulgularla ve literatürdeki bu konudaki çeşitli çalışmalardakilerle benzerlik göstermektedir (7,10,11,12).

Bu çalışmadaki protamin instilasyonları sonra 3. haftadan başlayarak ultrastrüktürel düzeyde mesane yüzey hücreleri lateral yüzleri arasındaki ayrılmalar ve intersitisyel alandaki belirgin genişlemeler ve bağımsız hücre adacık-

larının oluşması Parsons'un intersitisyel sistit etyopatogenezindeki GAG defektine bağlı "leaky epithelium" varsayımını morfolojik olarak destekler niteliktedir. Anderstrom intersitisyel sistitli hastalarda GAG tabakasının kısmi veya tam kaybının kontrol grubuna oranla daha fazla olduğunu ultrastrüktürel düzeyde göstermiş, ancak Eliot insanlarda akut ve kronik enfeksiyonlarda benzer bulgular rapor etmiştir (13,14). Ayrıca mesane tümörlerinde, akut ve kronik üriner enfeksiyonlarda, polipoid sistitte GAG tabakasında yer yer kayıplar ve hücreler arası bağlantılarda gevşemeler olduğu gösterilmiştir (13). Dolayısıyla bu çalışmada bir GAG inaktivitörü olan protaminin mesane instilasyonlarının "leaky epithelium" oluşturduğu belirgindir. Ancak bu durumun intersitisyel sistit için spesifik olup olmadığı tartışmalıdır.

Normal köpek mesane epiteli luminal hücrelerinde mikrovillus oluşumu yoktur ve bu hücreler bol miktarda fuziform veziküller içermektedirler (15). Bu çalışmada da kontrol grubunda mikrovillusların olmadığı, yüzeyel hücreler içinde bol miktarda intrasitoplazmik fuziform veziküller ve bu vezikülleri çevreleyen membranın asimmetrik ünit membran (AUM) özelliği gösterdiği tespit edildi. Bu iki özellik mesane luminal membran rezervini oluşturmaktadır (16).

Bu çalışmada dikkat çeken başka bir noktada protamin instilasyonları sonrası 3. haftadan başlayarak belirginleşen mesane yüzey hücreleri luminal yüzeylerinde mikrovillus oluşumuydu. Kimyasal karsinogenezde mikrovillus oluşumu ilk ultrastrüktürel bulgularındandır (15). Ayrıca insanda cerrahi insizyonlara bağlı mesane travmasında, mesane tümörlerinde donmaya bağlı ülserasyonlarda, mesane formalin instilasyonlarında, kronik mesane inflamasyonlarında, intersitisyel sistitte mikrovillar oluşumlarda artış gösterilmiştir (15). Smith mikrovilluslarda artış görülmesinin mesane epitelinde hızlı bir hücre "turn-over"nın göstergesi olduğunu bildirmiştir (17). Kjaergard bu "turn-over (mushrooming) sırasında hücreler arası tight junction"ların yeterli olmayabileceğini ve intersellüler bir idrar kaçağı meydana gelebileceğini öne sürmüştür (16). Bu çalışmada protamin instilasyonları sonrası ortaya çıkan

mikrovillus oluşumu mesane epitelinde hızlı bir turn-over'ın göstergesi olarak kabul edilirse bu turn-over nedeniyle tight junctionların yetersiz kalması ve sonucunda epitel permeabilitesinde bir artış (leaky epithelium) ve buna bağlı epitel hücreleri arasında bir gevşemenin ortaya çıktığı düşünülebilir.

Bu çalışmadaki bulgularımız Parsons'un intersitisiyel sistitli hastalardaki üre difüzyon çalışması sonuçlarının ışığında protamin instilasyonlarının köpek mesanesinde "leaky epithelium" oluşturduğunu ve ışık mikroskopisindeki histopatolojik bulgularımızın desteği de göz önüne alındığında bu durumun deneysel modelde intersitisiyel sistit olarak kabul edilebileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Parsons, C.L., Boychuk, D., Jones, S., Hurst, S., Callahan, N.: Bladder surface glycosaminoglycans: an epithelial permeability barrier. *J. Urology*. 143: 139-142, 1990.
- 2- Parsons, C.L., Lily, J.D., Stein, P.: Epithelial dysfunction in nonbacterial cystitis (interstitial cystitis). *J. Urology*. 145: 732-735, 1991.
- 3- Veheskari, V.M., Root E.R., Germuth, F.G. Jr, Robson, A.M.: Glomerular charge and urinary protein excretion: effects of systemic and internal polycation infusion in the rat. *Kidney Int*. 22: 127-135, 1982.
- 4- Hunsicker, L.G., Shearer, T.P., Shaffer, S.J.: Acute reversible proteinuri induced by infusion of the polycation hexadimethrine. *Kidney Int*. 20: 7-17, 1981.
- 5- Sunnergren, K.P., Fairman, R.P., de Blois, G.G., Glauser, F.L.: Effects of protamine, heparinase, and hyaluronidase on endothelial permeability and surface charge. *J. Appl. Physiol*. 63: 1987-1992, 1987.
- 6- Fairman, R.P., Sessler, C.N., Bierman, M., Glauser, F.L.: Protamine sulfate causes pulmonary hypertension and edema in isolated rat lungs. *J. Appl. Physiol*. 62: 1363-1367, 1987.
- 7- Eldrup, J., Thourp, J., Nielsen, S.L., Hald, T., Hainau, B.: Permeability and ultrastructure of human bladder epithelium. *Brit. J. Urol*. 55: 488-492, 1983.
- 8- Stein, P.C. and Parsons, C.L.: Animal model of interstitial cystitis. *J. Urol. Supplement (AUA eighty-five annual meeting abstract book)*. Interstitial cystitis. voiding dysfunction. 144: 258A, 1990.
- 9- Dixon, J.S., Holm-Bentzen, M., Gilpin, C.J., Gosling, J.A., Bostofte, E., Hald, T., Larsen, S.: Electron microscopic investigation of the bladder urothelium and glycocalyx in patients with interstitial cystitis. *J. Urol*. 135: 621-625, 1986.
- 10- Gillespie, L., Said, J., Sostrin, S., Kleiwer, K.: Immunofluorescent and histochemical staining confirm the identification of the many diseases called interstitial cystitis. *Br. J. Urol*. 66: 265-273, 1990.
- 11- Çetinel, B., Demirkesen, C., Demirkesen, O., Öz, F., Solok, V.: İntersitisiyel sistit: Klinik ve immunopatolojik çalışma *Türk Üroloji Dergisi* (baskıda)
- 12- Johansson, S.L., Fall, M.: Clinical features and spectrum of light microscopic changes in interstitial cystitis. *J. Urol*. 143: 1118-1124, 1990.
- 13- Anderstorm, CRK, Fall, M., Johansson, S.L.: Scanning electron microscopic findings in interstitial cystitis. *Br. J. Urol*. 63: 270-275, 1989.
- 14- Elliot, T.S.J., Slcak, R.C.B., Bishop, M.C.: Scanning electron microscopy of human bladder mucosa in acute and chronic urinary tract infection. *Br. J. Urol*. 56:38-43, 1984.
- 15- Hirao, Y., Sasaki, K., Sanmu, S., Ozono, S., Babaya, K., Okujima, E.: Scanning electron microscopy of changes in the urinary bladder in dogs treated with n-butyl-n'-4-hydroxybutyl) nitrosamine (bbn.)
- 16- Kjaerguard, J., Sturklint, H., Bierring, F., Thybo, E.: Surface topography of healthy and diseased transitional cell epithelium of the human urinary bladder. *Urol. Int*. 32: 34-38, 1972.
- 17- Smith, A.F.: An ultrastructural and morphometric study of bladder tumors II. *Virchows Arch. Path. Anat*. 396: 291-301, 1982.