

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Taja ŽELEZNIK

**VLOGA AMNIJSKE MEMBRANE PRI ZAVIRANJU
RASTI RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC IN
UROPATOGENE BAKTERIJE *Escherichia coli***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Taja ŽELEZNIK

**VLOGA AMNIJSKE MEMBRANE PRI ZAVIRANJU RASTI
RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC IN UROPATOGENE
BAKTERIJE *Escherichia coli***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**THE ROLE OF AMNIOTIC MEMBRANE IN INHIBITING GROWTH
OF CANCER UROTHELIAL CELLS AND UROPATHOGENIC
BACTERIA *Escherichia coli***

M. Sc. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani in na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Matejo Erdani Kreft, za somentorico prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec in za recenzentko prof. dr. Ines Mandić Mulec.

Mentorica: prof. dr. Mateja Erdani Kreft

Somentorica: prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec

Recenzentka: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Komisija za oceno dela in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Alojz IHAN

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Mateja ERDANI KREFT

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

Članica: prof. dr. Marjanca STARČIČ ERJAVEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Ines MANDIČ MULEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Taja Železnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 616.62+576+577.2+579.61(043)=163.6
KG rak/sečni mehur/urotelij/urotelijske celice/uropatogene bakterije/uropatogena *Escherichia coli*/amnijska membrana/protimikrobno delovanje
AV ŽELEZNIK, Taja, dipl. mikrobiol. (UN)
SA ERDANI KREFT, Mateja (mentorica)/STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (somentorica)/MANDIĆ MULEC, Ines (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2016
IN VLOGA AMNIJSKE MEMBRANE PRI ZAVIRANJU RASTI RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC IN UROPATOGENE BAKTERIJE *Escherichia coli*
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP XV, 101 str., 16 pregl., 30 sl., 5 pril., 246 vir.
IJ SI
JI sl/en
AI Amnijska membrana (AM) ima številne biološke lastnosti, ki so primerne za uporabo v regenerativni medicini. V nalogi smo: i) proučevali vpliv AM na rast rakavih urotelijskih celic, in sicer celic RT4, ki izvirajo iz humanega urotelijskega papiloma in celic T24, ki izvirajo iz humanega urotelijskega karcinoma, ii) vzpostavili kokulture normalnih in rakavih urotelijskih celic na AM ter iii) proučevali vpliv AM na rast uropatogenih bakterij *Escherichia coli* (UPEC). Rakave urotelijske celice RT4 smo nasadili na: epitelij AM (eAM), na bazalno lamino AM (gAM) ali na stromo AM (sAM). Vsi trije nosilci iz AM so vplivali na rast rakavih celic RT4, njihovo rast je najbolj zaviral nosilec eAM. Rakave urotelijske celice RT4 niso prehajale bazalne lamine nosilcev iz AM in so povečale izražanje E-kadherina ter okludina, ki sta značilna za normalne urotelijske celice. V kokulturi z normalnimi urotelijskimi celicami je nosilec eAM zmanjšal rast rakavih urotelijskih celic RT4 in T24 za več kot 90 %. Krioshranjevana in sveža AM, ki tekom shranjevanja nista prišli v stik z antibiotiki, nista vplivali na rast UPEC v tekočem ali na trdnem gojišču. Krioshranjevana AM, ki je bila shranjena v mediju za zamrzovanje z gentamicinom, je zavirala rast UPEC na trdnem gojišču. Sama AM ne deluje protimikrobno, kar smo potrdili tudi s pripravo mutant UPEC, odpornih proti gentamicinu. AM z dodanimi antibiotiki bi lahko uporabili kot obliž po odstranitvi urotelijskih papilomov, saj bi AM inhibirala rast rakavih celic ter zmanjšala potencialno možnost recidivov in pooperativnih mikrobnih okužb.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDC 616.62+576+577.2+579.61(043)=163.6

CX cancer/urinary bladder/urothelium/urothelial cells/uropathogenic bacteria/uropathogenic *Escherichia coli*/amniotic membrane/antimicrobial activity

AU ŽELEZNIK, Taja

AA ERDANI KREFT, Mateja (supervisor)/STARČIČ ERJAVEC, Marjanca (co-advisor)/MANDIČ MULEC, Ines (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology

PY 2016

TI THE ROLE OF AMNIOTIC MEMBRANE IN INHIBITING GROWTH OF CANCER UROTHELIAL CELLS AND UROPATHOGENIC BACTERIA *Escherichia coli*

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)

NO XV, 101 p., 16 tab., 30 fig., 5 ann., 246 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Amniotic membrane (AM) has many biological properties suitable for use in regenerative medicine. In this study we: i) investigated the effect of AM on growth of cancer urothelial cells, namely RT4 cells, originating from human urothelial papilloma and T24 cells, originating from human urothelial carcinoma, ii) we established co-cultures of normal and cancer urothelial cells on AM and iii) we investigated the effect of AM on growth of uropathogenic bacteria *Escherichia coli* (UPEC). Cancer cells RT4 were seeded on: epithelium of AM (eAM), basal lamina of AM (dAM) and AM stroma (sAM). Growth of RT4 cells was most inhibited by eAM. They didn't cross the basal lamina of AM and they increased the expression of E-cadherin and occludin. In co-culture with normal cells, eAM decreased the growth of cancer cells RT4 and T24 for more than 90%. Cryopreserved and fresh AM, which didn't come in contact with antibiotics, didn't affect the growth of UPEC in liquid or solid culture media. Cryopreserved AM, stored in freezing medium with gentamicin, inhibited the growth of UPEC on solid culture medium. AM alone has no antimicrobial properties, which we confirmed with gentamicin-resistant UPEC. AM with added antibiotics could be used as a plaster after removal of urothelial papilloma, where AM would inhibit the growth of cancer cells and decrease the possibility of recurrence and post-operative microbial infections.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO SLIK.....	XI
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XIV
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SEČNI MEHUR.....	3
2.1.1 Epitelij sečnega mehurja – urotelija	4
2.1.1.1 Struktura urotelija.....	4
2.1.2 Vloga urotelija pri vzpostavljanju krvno-urinske pregrade.....	6
2.2 AMNIJSKA MEMBRANA.....	6
2.2.1 Zgradba amnijske membrane.....	6
2.2.2 Lastnosti amnijske membrane.....	7
2.2.2.1 Protivnetne lastnosti amnijske membrane in zaviranje brazgotinjenja	7
2.2.2.2 Angiogene in anti-angiogene lastnosti amnijske membrane.....	8
2.2.2.3 Spodbujanje epitelizacije.....	9
2.2.2.4 Nizka imunogenost.....	9
2.2.2.5 Netumorigenost	9
2.2.2.6 Pluripotentnost	10
2.2.2.7 Druge lastnosti amnijske membrane	10
2.3 RAKAVE CELICE	10
2.3.1 Lastnosti rakavih celic.....	12
2.3.1.1 Sposobnost neprekinjenih celičnih delitev	12
2.3.1.2 Neodzivnost na signale, ki zavirajo celične delitve	12
2.3.1.3 Izogibanje apoptozi	13
2.3.1.4 Neskončen potencial za mitotske delitve	13
2.3.1.5 Sprožitev angiogeneze.....	13
2.3.1.6 Invazija rakavih celic v tkiva in metastaziranje	14
2.3.1.7 Nastajanje mutacij in nestabilnost genoma	14
2.3.1.8 Reprogramiranje celične energijske presnove.....	14
2.3.1.9 S tumorji spodbujeno vnetje.....	15
2.3.1.10 Izogibanje imunskemu sistemu	15
2.3.2 Karcinogeni	15

2.3.3 Rak sečnega mehurja.....	16
2.3.3.1 Mišično neinvazivni rak sečnega mehurja	18
2.3.3.2 Mišično invazivni rak sečnega mehurja	18
2.4 REGENERATIVNA MEDICINA	18
2.4.1 Tkivno inženirstvo sečnega mehurja.....	19
2.4.2 Uporaba amnijske membrane v tkivnem inženirstvu	19
2.4.2.1 Uveljavljena uporaba amnijske membrane v kliniki.....	20
2.4.2.2 Klinične študije, ki vključujejo uporabo amnijske membrane	20
2.5 UROTELIJSKE CELICE IN VITRO	20
2.5.1 Celične kokulture	21
2.6 MIKROORGANIZMI V URINARNEM TRAKTU.....	21
2.6.1 Normalna mikrobiota urinarnega trakta	21
2.6.2 Okužbe urinarnega trakta	21
2.6.3 Okužbe sečnega mehurja	22
2.6.4 Potek okužbe urinarnega trakta.....	23
2.6.4.1 Nezapletena okužba urinarnega trakta	23
2.6.4.2 Zapletena okužba urinarnega trakta	24
2.6.5 Odpornost povzročiteljev okužb urinarnega trakta proti antibiotikom ...	25
2.6.6 Uropatogena bakterija <i>Escherichia coli</i>.....	26
3 MATERIAL IN METODE	27
3.1 METODE UGOTAVLJANJA PROTIRAKAVEGA DELOVANJA AMNIJSKE	
MEMBRANE	27
3.1.1 Material, ki smo ga uporabili pri ugotavljanju protirakavega delovanja	
amnijske membrane	27
3.1.2 Shema poteka dela	29
3.1.3 Celične kulture, ki smo jih uporabili pri proučevanju protirakavega	
delovanja amnijske membrane.....	29
3.1.4 Odmrzovanje in nasajanje normalnih prašičjih urotelijskih celic.....	30
3.1.5 Odmrzovanje in nasajanje celičnih linij RT4 in T24.....	30
3.1.5.1 Hranilni medij za rakave in normalne urotelijske celice.....	31
3.1.6 Označevanje membran celic RT4, T24 in NPU s fluorescentnima barviloma	
DiI ter DiO.....	31
3.1.7 Vzpostavitev konstruktov celic rakavih urotelijskih celic RT4 na različnih	
nosilcih iz amnijske membrane	32
3.1.7.1 Priprava kontrolnih vzorcev	34
3.1.7.2 Spremljanje rasti celic RT4 na nosilcih iz AM	34
3.1.8 Vzpostavitev konstruktov normalnih in rakavih urotelijskih celic na nosilcu	
eAM in na sintetičnem nosilcu.....	34

3.1.8.1 Priprava kontrolnih vzorcev kokultur normalnih in rakavih urotelijskih celic.....	35
3.1.8.2 Spremljanje rasti celic NPU in RT4 oziroma T24 na nosilcu iz eAM in na sintetičnem nosilcu.....	35
3.1.9 Priprava preparatov za svetlobno mikroskopijo	36
3.1.9.1 Priprava parafinskih rezin	36
3.1.10 Histološko barvanje celic RT4, T24 in NPU na nosilcih iz amnijske membrane in na sintetičnem nosilcu.....	36
3.1.10.1 Barvanje hematoksilin-eozin.....	36
3.1.11 Imunofluorescentno označevanje proteinov.....	36
3.1.11.1 Imunofluorescentno označevanje E-kadherina, kolagena IV in kolagena VII na parafinskih rezinah	36
3.1.11.2 Imunofluorescentno označevanje N-kadherina, E-kadherina in okcludina direktno na nosilcih iz amnijske membrane z nasajenimi celicami.....	37
3.1.12 Analiza fluorescence	37
3.1.12.1 Analiza imunofluorescence	37
3.1.12.2 Ugotavljanje odstotka preraščenosti amnijske membrane s celicami RT4, T24 ali NPU	38
3.1.13 Statistična analiza rezultatov dinamike rasti celic RT4, T24 in NPU na nosilcih iz AM in na sintetičnem nosilcu	39
3.2 METODE UGOTAVLJANJA PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA AMNIJSKE MEMBRANE	40
3.2.1 Material, ki smo ga uporabili pri ugotavljanju protimikrobnega delovanja amnijske membrane	40
3.2.2 Bakterijski sevi	41
3.2.3 Gojišča za bakterije	41
3.2.4 Shema poteka dela	43
3.2.5 Gojenje bakterij in priprava inokuluma	43
3.2.6 Priprava uropatogenih <i>E. coli</i> , odpornih proti gentamicinu	43
3.2.6.1 Izolacija plazmidne DNA z alkalno lizo	43
3.2.6.2 Priprava elektrokompetentnih celic <i>E. coli</i> in elektroporacija	44
3.2.7 Priprava amnijske membrane	45
3.2.7.1 Krioshranjena amnijska membrana, ki je tekom priprave in shranjevanja prišla v stik z antibiotiki in antimikotikom	45
3.2.7.2 Krioshranjena amnijska membrana, ki tekom priprave in shranjevanja ni prišla v stik z antibiotiki.....	45
3.2.7.3 Sveža amnijska membrana, ki tekom priprave in shranjevanja ni prišla v stik z antibiotiki	45
3.2.7.4 Priprava homogenata iz amnijske membrane.....	45

3.2.8	Testiranje sterilnosti amnijske membrane	46
3.2.9	Ugotavljanje protimikrobnega učinka amnijske membrane z metodo izpostavitve v tekočem gojišču	46
3.2.10	Ugotavljanje protimikrobnega učinka amnijske membrane z difuzijsko metodo	46
3.2.10.1	Difuzijska metoda s koščkom amnijske membrane v mehkem agarju	46
3.2.10.2	Difuzijska metoda s koščkom amnijske membrane na trdnem agarju	47
3.2.10.3	Difuzijska metoda s homogenatom iz amnijske membrane	47
3.2.11	Določanje minimalne inhibitorne koncentracije za gentamicin	47
3.2.12	Statistična analiza testiranja protimikrobnega učinka amnijske membrane z metodo izpostavitve v tekočem gojišču	47
4	REZULTATI	48
4.1	PROTIRAKAVO DELOVANJE AMNIJSKE MEMBRANE	48
4.1.1	Vzpostavitev konstruktov celic RT4 na različnih nosilcih iz amnijske membrane in na sintetičnem nosilcu	48
4.1.2	Fluorescentno označevanje membran celic RT4 s fluorescentnim barvilom DiI	48
4.1.3	Histološka analiza konstruktov celic RT4 na različnih nosilcih iz amnijske membrane in na sintetičnem nosilcu	49
4.1.4	Dinamika rasti celic RT4 na nosilcih iz amnijske membrane in na sintetičnem nosilcu	50
4.1.5	Proteinska sestava bazalne lamine v konstruktih celic RT4 na nosilcih iz amnijske membrane	52
4.1.5.1	Imunofluorescenca kolagena IV in kolagena VII	52
4.1.6	Vpliv amnijske membrane na izražanje stičnih proteinov celic RT4	53
4.1.6.1	Imunofluorescenca okcludina	53
4.1.6.2	Imunofluorescenca E-kadherina	54
4.1.6.3	Imunofluorescenca N-kadherina	55
4.1.7	Vzpostavitev konstruktov kokultur normalnih in rakavih urotelijskih celic na nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu	56
4.1.7.1	Dinamika rasti kokulture normalnih in rakavih urotelijskih celic na nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu	59
4.2	PROTIMIKROBNO DELOVANJE AMNIJSKE MEMBRANE	60
4.2.1	Ugotavljanje sterilnosti amnijske membrane	60
4.2.2	Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti amnijske membrane z metodo izpostavitve v tekočem gojišču	61
4.2.3	Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti amnijske membrane z difuzijsko metodo s koščkom AM v mehkem agarju	62

4.2.3.1	Krioshranjevana amnijska membrana, ki je tekom priprave in shranjevanja prišla v stik z antibiotiki.....	62
4.2.3.2	Krioshranjevana amnijska membrana, ki tekom priprave in shranjevanja ni prišla v stik z antibiotiki.....	64
4.2.3.3	Sveža amnijska membrana, ki tekom priprave in shranjevanja ni prišla v stik z antibiotiki	65
4.2.4	Difuzijska metoda s homogenatom iz amnijske membrane.....	67
4.2.5	Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti amnijske membrane proti uropatogeni <i>E. coli</i> , odporni proti gentamicinu.....	69
4.2.5.1	Ugotavljanje vpliva spiranja amnijske membrane na protimikrobno aktivnost amnijske membrane.....	70
4.2.6	Ugotavljanje minimalnih inhibitornih koncentracij različnih sevov <i>E. coli</i> proti gentamicinu.....	71
5	RAZPRAVA.....	73
5.1	<i>VPLIV AMNIJSKE MEMBRANE NA ZAVIRANJE RASTI RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC</i>	<i>73</i>
5.1.1	Vzpostavitev konstruktov rakavih urotelijskih celic RT4 na nosilcih iz amnijske membrane in na sintetičnem nosilcu	73
5.1.1.1	AEC igrajo ključno vlogo pri zaviranju rasti rakavih urotelijskih celic RT4.....	74
5.1.1.2	Amnijska membrana vpliva na izražanje proteinov medceličnih stikov....	74
5.1.2	Vzpostavitev konstruktov normalnih in rakavih urotelijskih celic na nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu.....	75
5.1.3	Rakave urotelijske celice ne prehajajo skozi bazalno lamino amnijske membrane.....	76
5.2	<i>VPLIV AMNIJSKE MEMBRANE NA ZAVIRANJE RASTI UROPATOGENE BAKTERIJE <i>E. coli</i></i>	<i>78</i>
5.2.1	kAM+atb in kAM nimata protimikrobnega učinka na uropatogeno <i>E. coli</i> v tekočem gojišču	78
5.2.2	kAM in svAM nimata protimikrobnega učinka na uropatogeno <i>E. coli</i> na trdnem gojišču.....	78
5.2.3	kAM+atb, ki tekom priprave in shranjevanja pride v stik z antibiotiki, zavira rast uropatogene <i>E. coli</i> na trdnem gojišču	79
6	SKLEPI	81
7	POVZETEK.....	82
8	VIRI	84
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Opredelitev stadijev raka sečnega mehurja.	17
Preglednica 2: Aparati, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju protirakavega delovanja AM.	27
Preglednica 3: Laboratorijski material in kemikalije, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju protirakavega delovanja AM.	27
Preglednica 4: Sestava hranilnega medija, prilagojenega za gojenje normalnih urotelijskih celic.	31
Preglednica 5: Sestava hranilnega medija, prilagojenega za gojenje celične linije RT4. ...	31
Preglednica 6: Aparati, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju protimikrobnega delovanja AM.	40
Preglednica 7: Laboratorijski material in kemikalije, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju protimikrobnega delovanja AM.	40
Preglednica 8: Uporabljeni bakterijski sevi <i>E. coli</i> in njihov genotip oziroma značilnost.	41
Preglednica 9: Uporabljena gojišča za bakterije.	42
Preglednica 10: Raztopine za izolacijo plazmidne DNA.	44
Preglednica 11: Vpliv kAM+atb na rast laboratorijskega seva <i>E. coli</i> DH5 α in divjih sevov UPEC.	63
Preglednica 12: Vpliv kAM na rast laboratorijskega seva <i>E. coli</i> DH5 α in divjih sevov UPEC.	65
Preglednica 13: Vpliv svAM na rast laboratorijskega seva <i>E. coli</i> DH5 α in divjih sevov UPEC.	66
Preglednica 14: Vpliv homogenata iz kAM+atb na rast laboratorijskega seva <i>E. coli</i> DH5 α in divjih sevov UPEC.	67
Preglednica 15: Vpliv homogenata iz kAM na rast laboratorijskega seva <i>E. coli</i> DH5 α in divjih sevov UPEC.	68
Preglednica 16: MIK za gentamicin za vse testirane seve.	72

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba stene sečnega mehurja in urotelija.	4
Slika 2: Shematski prikaz zgradbe amniona in horiona.	7
Slika 3: Shema tumorskega mikrookolja in lastnosti rakavih celic.	11
Slika 4: Opredelitev stadijev raka sečnega mehurja.	17
Slika 5: Shematski prikaz nezapletene okužbe in zapletene okužbe urinarnega trakta.	25
Slika 6: Shematski prikaz poteka ugotavljanja protirakavega delovanja AM.	29
Slika 7: Shematski prikaz nosilcev iz AM, ki so vpeti v obročasti nosilec.	33
Slika 8: Shematski prikaz konstruktov normalnih in rakavih celic na nosilcih eAM in na sintetičnem nosilcu.	35
Slika 9: Analiza prekritosti nosilcev iz AM in sintetičnega nosilca s celicami RT4 v programu ImageJ.	39
Slika 10: Shematski prikaz poteka ugotavljanja protimikrobnega delovanja AM.	43
Slika 11: Flurescenčna in faznokontrastna mikroskopija celic RT4 na nosilcih iz AM in na sintetičnem nosilcu 1. in 21. dan poskusa pri 30-minutni inkubaciji z barvilom DiI.	49
Slika 12: Parafinske rezine celic RT4 na nosilcih iz AM in na sintetičnem nosilcu, barvane s hematoksilinom in eozinom.	50
Slika 13: Primerjava dinamike rast celic RT4 na nosilcih iz AM in na sintetičnem nosilcu v 3 tednih trajanja poskusa.	51
Slika 14: Celice RT4 na nosilcih iz AM in na sintetičnem nosilcu.	53
Slika 15: Imunofluorescenca okludina v celicah RT4 pri rasti na nosilcih eAM, gAM, sAM in na sintetičnem nosilcu.	54
Slika 16: Imunofluorescenca E-kadherina v celicah RT4 pri rasti na nosilcih eAM, gAM, sAM in na sintetičnem nosilcu.	55
Slika 17: Imunofluorescenca N-kadherina v celicah RT4 pri rasti na nosilcih eAM, gAM, sAM in na sintetičnem nosilcu.	56
Slika 18: Parafinske rezine normalnih in rakavih celic na nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu, barvane s hematoksilinom in eozinom.	58
Slika 19: Primerjava rasti celic NPU in RT4 na nosilcih eAM in na sintetičnem nosilcu.	59
Slika 20: Primerjava rasti celic T24 in NPU na nosilcih eAM in na sintetičnem nosilcu.	60
Slika 21: Test sterilnosti kAM+atb, kAM in svAM.	61
Slika 22: Rast <i>E. coli</i> DH5 α v tekočem gojišču LB s kAM+atb, kAM in brez AM.	61
Slika 23: Rast UPEC DL90 v tekočem gojišču LB s kAM+atb, kAM in brez AM.	62
Slika 24: Testiranje protimikrobnega učinka kAM+atb na laboratorijski sev <i>E. coli</i> DH5 α in na divje seve UPEC z difuzijsko metodo s koščkom AM v mehkem agarju.	64
Slika 25: Testiranje protimikrobnega učinka kAM na laboratorijski sev <i>E. coli</i> DH5 α in na divje seve UPEC z difuzijsko metodo s koščkom AM v mehkem agarju.	65

Slika 26: Testiranje protimikrobnega učinka svAM na laboratorijski sev <i>E. coli</i> DH5 α in na divje seve UPEC z difuzijsko metodo s koščkom AM v mehkem agarju.	66
Slika 27: Testiranje protimikrobnega učinka homogenata iz kAM+atb na laboratorijski sev <i>E. coli</i> DH5 α in na divje seve UPEC.	68
Slika 28: Testiranje protimikrobnega učinka homogenata iz kAM na laboratorijski sev <i>E. coli</i> DH5 α in na divje seve UPEC.	69
Slika 29: Testiranje protimikrobnega učinka kAM+atb in kAM ter njunih homogenatov na divja seva UPEC DL88 in UPEC DL90 ter na mutante istih sevov, ki imajo gentamicinsko rezistenco.	70
Slika 30: Testiranje protimikrobnega učinka koščka kAM+atb na divja seva UPEC DL88 in UPEC DL90 ter na njune mutante z gentamicinsko odpornostjo, z difuzijsko metodo s koščkom AM.	71

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Dinamika rasti celic RT4 na nosilcih iz AM in na sintetičnem nosilcu.
- Priloga B: Statistična analiza rasti rakavih urotelijskih celic RT4 na različnih nosilcih iz AM in na sintetičnem nosilcu.
- Priloga C: Primerjava dinamike rasti celic RT4 oziroma T24 in NPU v kokulturi na nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu.
- Priloga D: Statistična analiza rasti normalnih in rakavih urotelijskih celic na nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu.
- Priloga E: Statistična analiza protimikrobne aktivnosti AM pri metodi izpostavitve v tekočem gojišču.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AEC	amnijske epiteljske celice
AM	amnijska membrana
eAM	nosilec iz amnijske membrane, ki je orientiran z epiteljsko stranjo navzgor
gAM	nosilec iz amnijske membrane, ki je orientiran z bazalno lamino navzgor in je brez amnijskih epiteljskih celic
sAM	nosilec iz amnijske membrane, ki je orientiran s stromalno (vezivno) stranjo navzgor
Ang-2	angiopoietin-2
bFGF	osnovni fibroblastni rastni dejavnik (angl. basic Fibroblast Growth Factor)
BSA	goveji serumski albumin (angl. Bovine Serum Albumin)
CNF1	citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 (angl. Cytotoxic Necrotizing Factor 1)
CO ₂	ogljikov dioksid
DAPI	fluorescentno barvilo, ki obarva kromatin (angl. 4,6-diamine-2-phenylindole dihydrochloride)
DMSO	α -dimetilsulfoksid
<i>E. coli</i>	bakterija <i>Escherichia coli</i>
EGF	epidermalni rastni dejavnik (angl. Epidermal Growth Factor)
FBS	fetalni goveji serum (angl. Fetal Bovine Serum)
gojišče LB	gojišče Luria-Bertani
HB-EGF	heparin vezavni epidermalni rastni dejavnik (angl. Heparin Binding Epidermal Growth Factor)
HGF	hepatocitni rastni dejavnik (angl. Hepatocyte Growth Factor)
ICAM	znotrajcelične adhezijske molekule (angl. Intercellular Cell Adhesion Molecules)
IGF-1	inzulinu podoben rastni dejavnik 1 (angl. Insulin-like Growth Factor 1)
IL	interlevkin
kAM	krioshranjevana AM, ki tekom priprave in shranjevanja ni prišla v stik z antibiotiki
kAM+atb	krioshranjevana AM, ki je tekom priprave in shranjevanja prišla v stik z antibiotiki
LPS	lipopolisaharid
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
NK	naravne celice ubijalke (angl. Natural Killer cells)

NPU	normalne prašičje urotelijske celice
PBS	fosfatni pufer (angl. Phosphate Buffered Saline)
PDGF	trombocitni rastni dejavnik (angl. Platelet-Derived Growth Factor)
PEDF	iz pigmentnega epitelijskega izhajajoči dejavnik (angl. Pigment Epithelium Derived Factor)
PLGF	placentni rastni dejavnik (angl. PLacental Growth Factor)
SE	standardna napaka
SN	sintetični nosilec
svAM	sveža AM, ki tekom priprave in shranjevanja ni prišla v stik z antibiotiki
TGF- β	transformirajoči rastni faktor β (angl. Transforming Growth Factor β)
TIMP	tkivni inhibitor metaloproteinaz
TSB-1	trombospondin-1
UP	uroplakin
UPEC	uropatogena <i>Escherichia coli</i>
UPEC DL88-Gen ^R	proti gentamicinu odporen divji tip uropatogene bakterije <i>Escherichia coli</i> (sev DL88)
UPEC DL90-Gen ^R	proti gentamicinu odporen divji tip uropatogene bakterije <i>Escherichia coli</i> (sev DL90)
VEGF	vaskularni endotelijski rastni dejavnik (angl. Vascular Endothelial Growth Factor)

1 UVOD

Leta 2013 so v Sloveniji zabeležili 344 novih primerov raka sečnega mehurja (Onkološki inštitut, 2016). Ob začetni diagnozi večina rakavih obolenj sečnega mehurja spada med mišično neinvazivne. Za njih je značilno, da po odstranitvi tumorjev pogosto pride do ponovnega pojava le-teh (Babjuk in sod., 2015). Mišično neinvazivni rak sečnega mehurja zdravijo s transuretralno resekcijo (delna ali popolna odstranitev tumorja skozi sečnico), medtem ko v primeru invazivnega raka sečnega mehurja ali obsežnih, ponavljajočih se neinvazivnih tumorjev ali tumorjev, neodzivnih na terapijo, opravijo cistektomijo (odstranitev dela sečnega mehurja ali celotnega organa) (Onkološki inštitut, 2016).

Da bi povečali preživetje bolnikov z rakom sečnega mehurja, se je pojavila potreba po novih metodah zdravljenja in ena izmed teh je tudi tkivno inženirstvo. Tkivno inženirstvo je hitro razvijajoče se interdisciplinarno področje, ki uporablja načela bioloških in inženirskih znanosti za razvoj živih tkivnih ali organskih nadomestkov (Dragin Jerman in Erdani Kreft, 2012; O'Brien in sod., 2011; Orabi in sod., 2013).

Okužbe urinarnega trakta so med najpogostejšimi bakterijskimi okužbami pri človeku (Foxman, 2003). Uropatogena bakterija *Escherichia coli* (UPEC) je povzročitelj 70 – 90 % teh okužb, njihovo zdravljenje pa postaja vedno težje zaradi pojava mikroorganizmov, odpornih proti antibiotikom (Bradford, 2001).

Amnijska membrana (AM) je ekstraembrionalna ovojnica, ki obdaja z amnijsko tekočino napolnjeno amnijsko votlino. Zaradi svojih lastnosti, kot so nizka imunogenost, pospeševanje epitelizacije, preprečevanje brazgotinjenja tkiva in primerne mehanske lastnosti, je AM primerna za uporabo v tkivnem inženirstvu (Erdani Kreft in Dragin, 2010).

V nalogi smo uporabili metode tkivnega inženirstva in proučevali možnost uporabe nosilcev iz AM v regenerativni medicini (urologiji). Namen našega dela je bil ugotoviti vpliv AM na dinamiko in način rasti rakavih in normalnih urotelijskih celic ter na rast UPEC in analizirati možnost uporabe AM za prekritje rane po operativnem odstranjevanju urotelijskih tumorjev.

1.1 CILJI NALOGE

- Vzpostaviti konstrukte rakavih urotelijskih celic RT4, ki izvirajo iz humanega urotelijskega papiloma sečnega mehurja, na različnih nosilcih iz AM.
- Vzpostaviti konstrukte kokultur normalnih urotelijskih celic in rakavih urotelijskih celic RT4, ki izvirajo iz humanega urotelijskega papiloma oziroma celic T24, ki izvirajo iz humanega urotelijskega karcinoma sečnega mehurja, na nosilcih iz AM.

- Hkrati spremljati dinamiko rasti normalnih in rakavih urotelijskih celic na nosilcih iz AM.
- Ugotoviti, ali AM učinkuje protimikrobno na UPEC.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- AM zavira rast rakavih in spodbuja rast normalnih urotelijskih celic.
- AM zavira rast UPEC.

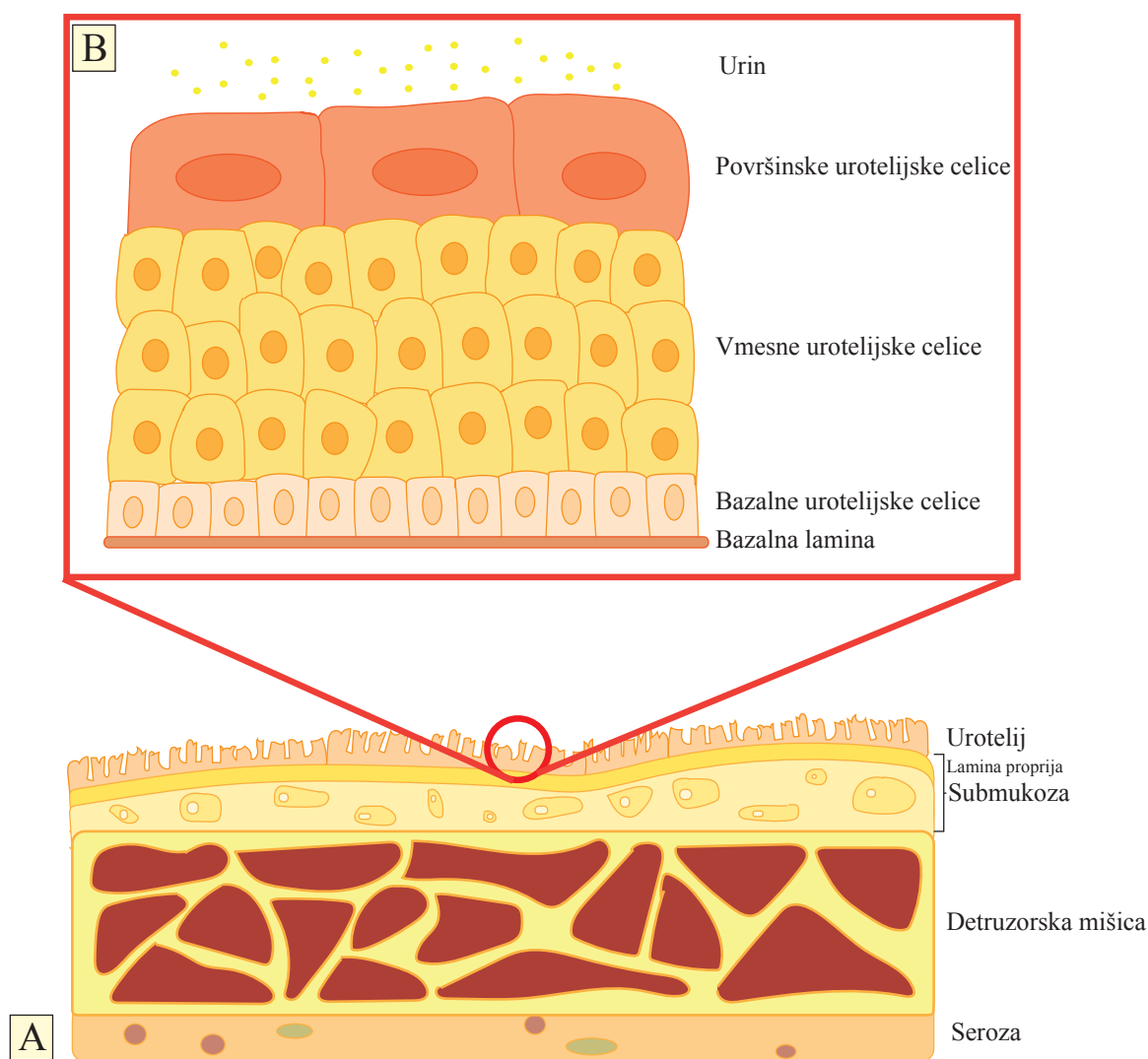
2 PREGLED OBJAV

2.1 SEČNI MEHUR

Sečni mehur je votel, mišičast in elastičen organ medeničnega dna. Namenjen je kratotrajnemu hranjenju urina, ki vsebuje odpadne produkte metabolizma (Lukacz in sod., 2011).

Steno sečnega mehurja sestavljajo tri plasti: *tunica mucosa* – sluznica, *tunica muscularis* – mišična plast in *tunica adventitia* – adventicija oziroma ožiljeno vezivno tkivo (Birder in Andersson, 2013). Sluznico gradi urotelij – epitelij, ki je v stiku z urinom. Bazalna lamina loči urotelij od spodaj ležeče lamine proprije. Submukozo sestavljata lamina proprija, ki je tanka plast kompaktnega vezivnega tkiva in rahlo vezivno tkivo, ki vsebuje več tipov celic, vključno s fibroblasti, maščobnimi celicami, intersticijskimi celicami, celicami imunskega sistema in aferentnimi ter eferentnimi nevroni. Submukoza vsebuje tudi krvne in limfne žile, elastinska vlakna in manjše (redke) snope mišičnih vlaken. Mišično plast tvorijo detruzorske in gladkomišične celice (Slika 1A) (Paner in sod., 2007; Romih in sod., 2005).

Ključna naloga sečnega mehurja je preprečevanje izmenjave odpadnih produktov ter vode med urinom in telesnimi tekočinami ter krvjo (t.i. krvno-urinska pregrada). Pomembna naloga sečnega mehurja je tudi natančna regulacija izločanja urina (Romih in sod., 2005).



Slika 1: Zgradba stene sečnega mehurja in urotelija. (A) Prerez stene sečnega mehurja, ki vključuje epitelijsko, submukozno in mišično plast. (B) Prerez urotelija, ki vključuje bazalne, vmesne in površinske urotelijske celice.

2.1.1 Epitelij sečnega mehurja – urotelij

2.1.1.1 Struktura urotelija

Uroepitelij oziroma urotelij je prehodni epitelij, ki meji na urin v ledvičnem mehu, sečevodu, sečnem mehurju in proksimalnem delu sečnice. Urotelij sestavlja tri do sedem plasti celic, ki jih glede na lego razdelimo na površinske, vmesne in bazalne celice (Slika 1B). Površinske oziroma dežnikaste celice so v stiku z urinom in pokrivajo manjše vmesne celice. Pod dežnikastimi celicami je nekaj plasti vmesnih celic, katerim sledijo bazalne celice, ki se s hemidezmosomi pritrjujejo na bazalno lamino. Dežnikaste celice se povezujejo s tesnimi in adherentnimi stiki, dezmosomi in presledkovnimi stiki. Med vmesnimi in bazalnimi celicami

so prisotni dezmosomi in presledkovni stiki (Castillo-Martin in sod., 2010; Khandelwal in sod., 2009; Peter, 1978).

Bazalne celice tvorijo eno plast, so enojedrne in v premeru merijo 10 μm . Vmesne in bazalne celice izražajo citokeratin-13, a le bazalne celice izražajo citokeratine-5, -14 in -17. Vse urotelijske celice izražajo citokeratine-7, -8 in -18, medtem ko le dežnikaste celice izražajo citokeratine-18 in -20 (Erman in sod., 2006; Castillo-Martin in sod., 2010; Jones, 2001; Jost in sod., 1989; Veranič in Jezernik, 2002).

Vmesne celice predstavljajo večinski delež urotelija, so enojedrne, v premeru merijo 10 do 15 μm in so med seboj in z dežnikastimi celicami povezane z dezmosomi in presledkovnimi stiki. Vmesne celice, ki so tik pod dežnikastimi celicami, so delno diferencirane in izražajo uroplakine. Ta populacija celic se v primeru poškodbe urotelija ali bakterijske okužbe (luščenja dežnikastih celic) hitro diferencira (Apodaca, 2004; Haefliger in sod., 2002; Hossler in Monson, 1995; Jost in sod., 1989; Veranič in sod., 2009; Wu in sod., 2009).

Dežnikaste celice predstavljajo eno plast visoko diferenciranih in polariziranih celic, ki imajo značilne domene apikalne in bazolateralne plazmaleme razmejene s tesnimi stiki. Lahko so eno- ali večjedrne, različnih oblik in v premeru merijo od 25 do 250 μm . Morfologija in velikost teh celic je odvisna od napolnjenosti sečnega mehurja – v praznem sečnem mehurju so dežnikaste celice kubične oblike, medtem ko so v polnem mehurju bolj sploščene oblike. Apikalna plazmalema dežnikastih celic je asimetrično odebeljena na račun transmembranskih proteinov uroplakinov (UPIa, UPIb, UPII, UPIIIa, UPIIIb), katerih večinski masni delež je v E-polovici lipidnega dvosloja. Urotelijski plak vsebuje približno 1000 do 3000 uroplakinskih delcev (Acharya in sod., 2004; Hicks, 1975; Khandelwal in sod., 2009; Lewis in sod., 1976; Min in sod., 2006; Porter in sod., 1967; Truschel in sod., 2002; Varley in sod., 2006; Walz in sod., 1995; Yu in sod., 1992).

Dežnikaste celice vsebujejo diskoidalne oziroma fuziformne vezikle. Fuziformni vezikli se zbirajo tik pod apikalno plazmalemo in se zlijejo z apikalno površino celic kot odziv na polnjenje sečnega mehurja (Hicks, 1975; Truschel in sod., 2002). Fuziformni vezikli so odgovorni za dostavo uroplakinov in drugih proteinov na apikalno površino urotelijskih celic. Pri človeku so ti vezikli primarno v obliki diskov ali ovalne oblike. Za njih je značilen zakisan lumen, a ni še znano, kakšna je funkcionalna vloga nizkega pH (Apodaca, 2004; Jost in sod., 1989). Manjše, nezrele fuziformne vezikle najdemo tudi v vmesnih celicah (Hudoklin in sod., 2012).

2.1.2 Vloga urotelija pri vzpostavljanju krvno-urinske pregrade

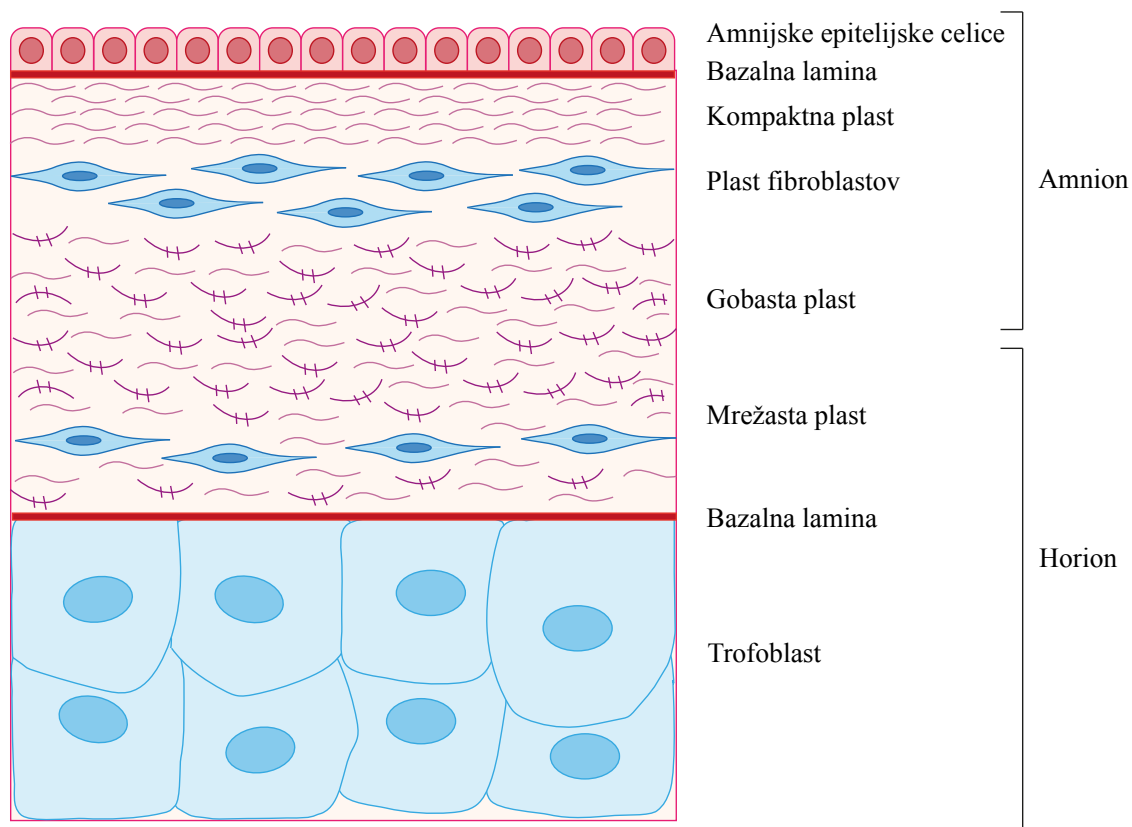
Urotelij igra ključno vlogo pri vzpostavitvi krvno-urinske pregrade. Do razvoja krvno-urinske pregrade pride med normalnim procesom diferenciacije urotelija, in sicer več lastnosti dežnikastih celic pomaga sečnemu mehurju pri vzpostavitvi in ohranjanju normalne funkcije pregrade tekom polnjenja in praznjenja sečnega mehurja. Uroplakini igrajo pomembno funkcijo pri vzdrževanju pregrade s preprečevanjem prehoda proteinom, ionskim in ne-ionskim snovem. K tvorbi krvno-urinske pregrade prispevajo tudi tesni stiki med dežnikastimi celicami, ki so sestavljeni iz večih proteinov, npr. okludinov in klavdinov. Poleg tega dežnikaste celice prekriva plast proteoglikanov, ki ščiti pred mikroorganizmi ter karcinogenimi in toksičnimi snovmi v urinu. Urotelij predstavlja tudi integralni del senzoričnega sistema sečnega mehurja, ki sprejema, ojača in prenaša informacije v spodaj ležeča tkiva (Acharya in sod., 2004; Apodaca, 2004; Birder in Andersson, 2013; Parsons in sod., 1990).

2.2 AMNIJSKA MEMBRANA

Posteljica (placenta) je zgrajena iz dveh delov – iz materinega in zarodkovega dela. Zarodkov del posteljice izvira iz zarodkovega tkiva in je sestavljen iz dveh plasti – horiona (zunanja plast) in amniona (notranja plast) (Mehats in sod., 2011). Amnijska membrana *in vivo* zagotavlja zaščito in podporo zarodku, poleg tega pa ima tudi metabolno vlogo, saj regulira transport vode in topljencev ter proizvodnjo rastnih dejavnikov, citokinov in drugih bioaktivnih molekul (Mamede in Botelho, 2015).

2.2.1 Zgradba amnijske membrane

Amnijska membrana je od 0,02 mm do 0,5 mm debela, elastična in polprepustna. Pritrjena je na horion. Amnijsko membrano sestavlja enoskladen epitelij, debela bazalna lamina ter vezivno tkivo. Amnijske epitelijske celice (AEC) imajo apikalno plazmalemo oblikovano v mikrovile. Bazalna lamina AM vsebuje laminin-1, laminin-5, nidogen, kolagen tipov IV in VII ter fibronektin. V vezivnem tkivu (t.j. mezenhimski del AM, imenovan tudi stroma), ki je bogato s kolageni tipov I, III, IV, V, VI, nidogenom, fibronektinom, hialuronsko kislino in proteoglikani, ločimo kompaktno, fibroblastno in gobasto plast (Slika 2) (Akashi in sod., 1999; Cirman in sod., 2013; Rocha in Baptista, 2015; Pollard in sod., 1976; Toda in sod., 2007; Wilshaw in sod., 2006).



Slika 2: Shematski prikaz zgradbe amniona in horiona. AEC izločajo kolagen tipov III in IV ter nekolagenske glikoproteine (laminini, fibronektin, nidogen), ki tvorijo bazalno lamino. Kompaktno plast tvorijo kolageni tipa I, III, V, VI in fibronektin, plast fibroblastov tvorijo kolageni tipa I, III, VI, nidogen, laminin in fibronektin, gobasto plast tvorijo kolageni tip I, III, IV in proteoglikani.

2.2.2 Lastnosti amnijske membrane

Amnijska membrana ima številne lastnosti zaradi katerih je primerna za klinično uporabo, saj deluje protivnetno in zavira brazgotinjenje, ima angiogene in anti-angiogene lastnosti, spodbuja epitelizacijo, ima nizko imunogenost, je netumorogena in iz AM izhajajoče celice so pluripotentne (Magatti in sod., 2012).

2.2.2.1 Protivnetne lastnosti amnijske membrane in zaviranje brazgotinjenja

Številne študije poročajo, da celice posteljice zavirajo razmnoževanje aktiviranih limfocitov T, zmanjšajo sintezo vnetnih citokinov celic T pomagalk in inducirajo regulatorne limfocite T ter tarčne limfocite B (Kronsteiner in sod., 2011; Ma in sod., 2012; Parolini in sod., 2014a; Pianta in sod., 2015). Poleg tega lahko vplivajo tudi na antigen predstavitvene celice preko blokade diferenciacije monocitov v dendritične celice, inducirajo diferenciacijo makrofagov M2 in celo inhibirajo nevtrofilce ter naravne celice ubijalke (Chen in sod., 2014; Donders in sod., 2015; Li in sod., 2015; Magatti in sod., 2015; Schwartz in sod., 2011). Raziskovalci so

pokazali, da celice posteljice proizvajajo dejavnike, ki zmanjšajo vnetje, kot so npr. interleukin-10, transformirajoči rastni faktor (TGF- β), hepatocitni rastni faktor (HGF), prostaglandin E2 in indolamin-2,3-dioksigenazni (IDO) encim (Donders in sod., 2015; Magatti in sod., 2015; Pianta in sod., 2015; Yamahara in sod., 2014).

Poleg naštetih, je predvsem v gobasti plasti vezivnega tkiva AM veliko hialuronske kisline, ki deluje kot ligand za določene receptorje (npr. receptorje CD44 na limfocitih) in veže TGF- β , s čimer zavira vnetne reakcije, saj tako zmoti signalno pot TGF- β (Erdani Kreft in Dragin Jerman, 2010; Tseng in sod., 1999).

AM zmanjšuje brazgotinjenje tkiva in ima protiadhezivno aktivnost, saj sintetizira in izloča tkivne inhibitorje metaloproteinaz (TIMP-1, -2, -3, -4). Poleg tega AM zavira izražanje receptorjev ravnega dejavnika TGF- β , kar bistveno zmanjša brazgotinjenje tkiva (Kim in sod., 2000).

2.2.2.2 Angiogene in anti-angiogene lastnosti amnijske membrane

Za AM je značilno angiogeno delovanje, ki je pomembno pri zdravljenju ran in regeneraciji tkiva. V AM so našli citokine, ki spodbujajo angiogenezo, npr. angiopoetin-2 (Ang-2), interleukin 8 (IL-8), interleukin 6 (IL-6), epidermalni rastni dejavnik (EGF), osnovni fibroblastni rastni dejavnik (bFGF), heparin vezavni epidermalni rastni dejavnik (HB-EGF), hepatocitni rastni dejavnik (HGF), iz trombocitov izhajajoči rastni dejavnik (PDGF), placentni rastni dejavnik (PLGF) in vaskularni endotelijski rastni dejavnik (VEGF) (Koob in sod., 2014, Paeini-Vayghan in sod., 2011).

Intaktna AM izloča tudi različne anti-angiogene dejavnike, kot so npr. iz pigmentnega epitelija izhajajoči dejavnik (PEDF), tkivne inhibitorje metaloproteinaz 1, 2, 3, 4 (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4) in trombospondin-1 (TSB-1) (Hao in sod., 2000; Kim in Tseng, 1995; Paeini-Vayghan in sod., 2011; Zaslavsky in sod., 2010). Niknejad in sod. (2014) navajajo, da dejavniki, ki spodbujajo angiogenezo, izhajajo predvsem iz plasti fibroblastov v amnijski membrani, medtem ko lahko AEC izločajo tako angiogene, kot tudi anti-angiogene dejavnike.

Kontradiktorne lastnosti kažejo na velik pomen razumevanja vpliva mikrookolja pri določanju angiogenih ali anti-angiogenih sposobnosti AM, saj ko je AM nanešena na ishemične organe, spodbuja angiogenezo, a v primeru patoloških stanj, kot je npr. rak, preprečuje angiogenezo (Niknejad in sod., 2013; Silini in sod., 2015).

2.2.2.3 Spodbujanje epitelizacije

Intaktna AM služi kot substrat za spodbujanje migracije epiteljskih celic, spodbuja njihovo diferenciacijo in preprečuje apoptoze epiteljskih celic (Malhotra in Jain, 2014). AM proizvaja dejavnike, ki lahko stimulirajo epitelizacijo, kot so npr. bFGF, HGF, TGF- β in tudi dejavnike, ki podpirajo rast in diferenciacijo matičnih ter predniških celic, kot je npr. keratocitni rastni dejavnik (Casey in sod., 1997; Koizumi in sod., 2000; Meller in sod., 2002).

V zunajceličnem matriksu AM so tudi drugi proteini, npr. fibronektin, laminin-1, laminin-5, kolageni tipov I, III, IV, V in VII, ki prav tako spodbujajo adhezijo epitelija in migracijo celic (Fukuda in sod., 1999; Mamede in Botelho, 2015; Lobert in sod., 2010).

Epiteljske celice AM in mezenhimske stromalne celice AM izločajo epidermalni rastni dejavnik (EGF), interleukin-8 (IL-8), inzulinu podoben rastni dejavnik (IGF-1), iz trombocitov izhajajoči rastni dejavnik (PDGF), ki pospešujejo delitve in migracijo celic (Jin in sod., 2015; Kim in sod., 2012).

2.2.2.4 Nizka imunogenost

AM je zaradi nizke imunogenosti primerna za uporabo v regenerativni medicini. Epiteljske in mezenhimske celice AM šibko do srednje izražajo molekule razreda HLA I, vključno z antigeni Ia (HLA-A, B, C) in Ib (HLA-G, E), vendar zelo šibko ali pa sploh ne izražajo molekul razreda HLA II (HLA-DP, DQ, DR) in kostimulatornih molekul (CD80, CD86) na površini celic. Vloga molekul razreda HLA I je indukcija imunskega odziva preko predstavljanja peptidnih antigenov limfocitom T (zato pri AM ne pride do imunskega odziva, saj ta zelo šibko izraža antigene Ia), medtem ko je molekula HLA-G vključena v indukcijo imunske tolerance, kjer sodeluje kot ligand za inhibitorne receptorje, ki so prisotni na celicah NK in makrofagih (Szekeres-Bartho, 2002). Te lastnosti lahko znižajo tveganje imunske zavrnitve po transplantaciji (Kubo in sod., 2001; Parolini in sod., 2014b).

2.2.2.5 Netumorigenost

Raziskave kažejo, da celice AM ne tvorijo teratomov (tumorjev iz vseh treh zarodnih plasti) ali drugih tipov tumorjev v imunokompromitiranih miših. Netumorigen značaj AEC je bil pokazan tudi v primeru transplantacij AEC v bolnike z boleznimi lizosomskega kopičenja in zdrave prostovoljce (Kang in sod., 2012; Miki in sod., 2005).

2.2.2.6 Pluripotentnost

Celice AM, ki imajo pluripotentne lastnosti so AEC in mezenhimske matične celice. Oboje se lahko v ustreznih pogojih diferencirajo v celice vseh treh zarodnih plasti – endoderm (celice jeter, trebušne slinavke), mezoderm (srčnomišične celice) in ektoderm (živčne in glia celice) (Ilancheran in sod., 2007; Lindenmair in sod., 2012; Manuelpillai in sod., 2011; Miki in sod., 2005; Portmann-Lanz in sod., 2006).

2.2.2.7 Druge lastnosti amnijske membrane

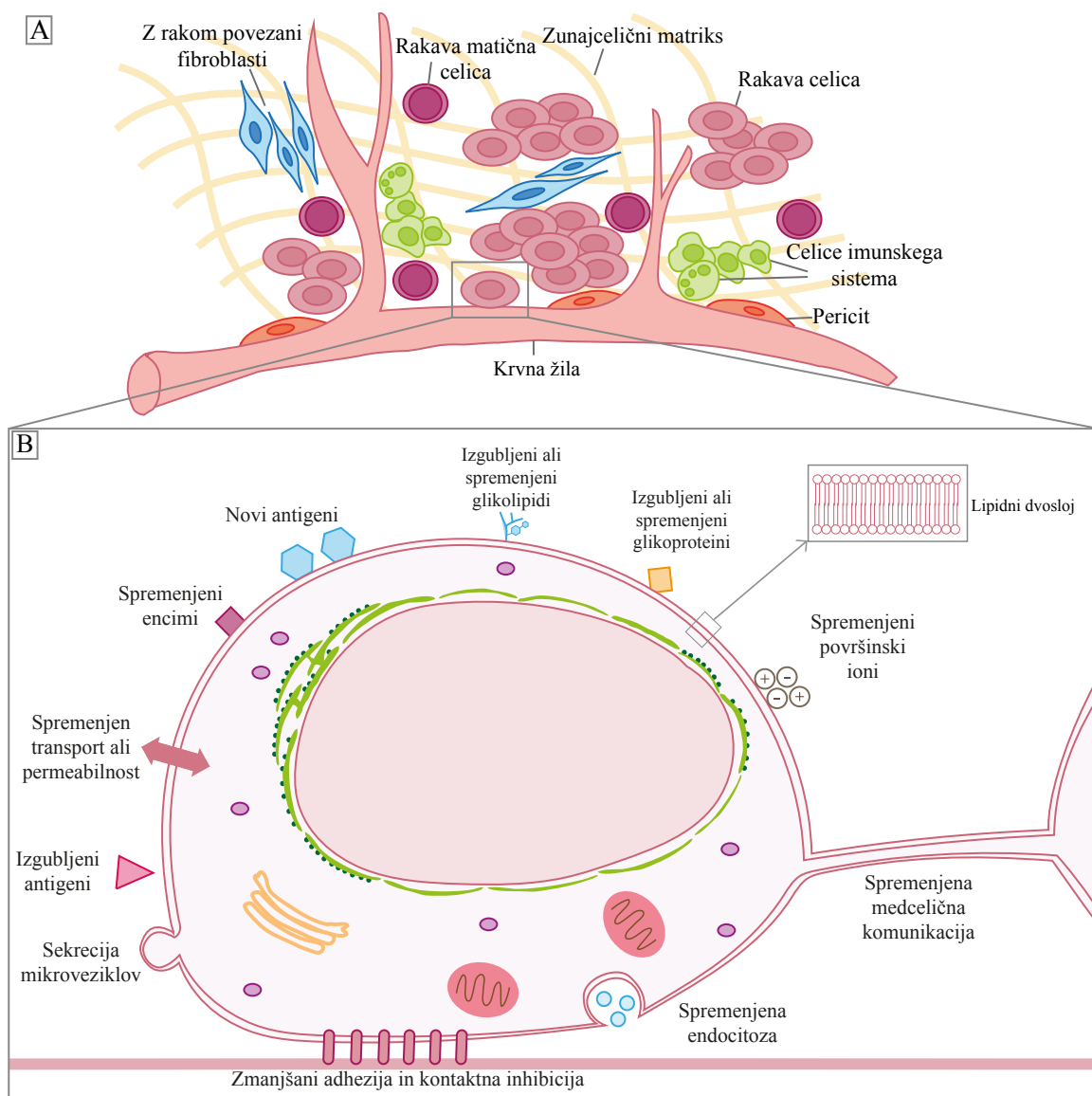
AM izraža naravne protimikrobne peptide, kot so defenzini, elafin in SLPI (angl. secretory leukocyte protease inhibitor), ki so ključni elementi prirojenega imunskega sistema (Tehrani in sod., 2013). AM izloča tudi dejavnike, ki zmanjšajo raven izražanja protiapoptotskih signalnih poti NF- κ B in Akt-FKHR, kar vodi celice v apoptozo (Li in sod., 2006; Niknejad in sod., 2014). AM lahko deluje tudi kot naravna anatomsko pregrada, saj lahko loči potencialno adhezivne površine.

2.3 RAKAVE CELICE

Fenotip, ki je značilen za rakave celice, je posledica številnih heterogenih mutacij (točkastih mutacij, translokacij, delecij idr.), ki spremenijo več signalnih poti in s tem prispevajo k razvoju raka. Tudi histopatološko identični tumorji so lahko posledica različnih mutacij (Parsons in sod., 2008).

Raziskave kažejo, da tumor ni le struktura homogenih celic, ampak da so zanj značilni različni, specializirani tipi celic in specifično mikrookolje, ki se vzpostavi tekom tumorigeneze. Osnovna sestavina tumorjev so rakave celice, ki sprožijo nastanek in vodijo razvoj tumorjev. Zanje so značilne lastnosti, ki so opisane v nadaljevanju (Slika 3B). Posamezna področja tumorjev se razlikujejo glede na raven diferenciacije, proliferacije, invazivnosti, ožiljenosti in vnetja, kar je vodilo v odkritje novih celic v tumorjih – rakavih matičnih celic. Rakave matične celice pojasnijo fenotipsko heterogenost rakavih celic in zmožnost razvoja novih tumorjev na oddaljenih mestih v telesu tudi po operativni odstranitvi tumorja in kemoterapiji, saj so rakave matične celice bolj odporne proti kemoterapevtskim agensom. Tumorji vsebujejo tudi endotelijske celice in pericite, ki tvorijo krvožilje tumorja ter celice, ki tvorijo limfne žile tumorja. V tumorjih najdemo tudi celice imunskega sistema, in sicer podtype makrofagov, tkivne bazofilce (mastocite), nevtrofilce, limfocite B in limfocite T, ki izločajo signalne molekule, ki spodbujajo progresijo tumorjev (Coffelt in sod., 2010; Murdoch in sod., 2008). Poleg navedenih so v tumorjih prisotni tudi z rakom povezani fibroblasti (angl. carcinoma-associated fibroblasts (CAFs)), ki s parakrinim

signaliziranjem in rekrutiranjem imunskih in vnetnih celic ali mastocitov spodbudijo proliferacijo rakavih celic, angiogenezo, invazijo in metastaziranje. Stromalne celice, ki sestavljajo stromo tumorjev, običajno izvirajo iz okoliških tkiv ali iz kostnega mozga in zagotavljajo različne dejavnike, ki prispevajo k tumorigenezi. Te celice lahko sprožijo nadaljnjo transformacijo normalnih epitelijskih celic in vodijo v nastanek tumorja (Slika 3A) (Bergfeld in Declerck, 2010; Hanahan in Weinberg, 2011; Dragin Jerman in sod., 2015).



Slika 3: Shema tumorskega mikrookolja (A) in lastnosti rakavih celic (B).

2.3.1 Lastnosti rakavih celic

2.3.1.1 Sposobnost neprekinjenih celičnih delitev

Normalne celice skrbno uravnavajo sintezo in sproščanje signalov, ki usmerjajo v celično delitev, medtem ko so pri rakavih celicah mehanizmi, ki kontrolirajo celični cikel, okvarjeni (Hanahan in Weinberg, 2011). Rakave celice sintetizirajo rastne dejavnike, ki avtokrino zagotavljajo njihove delitve. Poleg tega lahko stimulirajo normalne celice, ki so v stromi tumorja, in te jim zagotovijo različne rastne dejavnike (Bhowmick in sod., 2004; Cheng in sod., 2008). Rakave celice lahko povečajo število membranskih receptorjev, s čimer, postanejo zelo odzivne na sicer minimalne koncentracije rastnih dejavnikov. Podobno lahko dosežejo tudi s strukturnimi spremembami v receptorski molekuli, ki omogoča od liganda neodvisno aktivacijo. Neodvisnost od rastnih dejavnikov je lahko tudi posledica stalne aktivacije komponent kaskade, ki je navzdol od teh receptorjev, saj posledično ni potrebe po stimulaciji teh poti z ligandom (Hanahan in Weinberg, 2011).

2.3.1.2 Neodzivnost na signale, ki zavirajo celične delitve

V normalnem tkivu številni signali omejujejo celične delitve in s tem zagotavljajo mirovanje celic in tkivno homeostazo. Ti signali so topni rastni inhibitorji in imobilizirani inhibitorji, ki so vezani na proteoglikane, vezane v membranah celic ali prosto prisotni v zunajceličnem matriksu. Signali lahko zavirajo delitve s preusmeritvijo celice v fazo G_0 celičnega cikla na dva načina. Celice lahko vodijo v stanje mirovanja, ki ga celice lahko prikinajo ob prisotnosti ustreznih zunajceličnih in celičnih signalov. Signali lahko celice vodijo tudi v trajno izgubo delitvenega potenciala, ker te vstopijo v postmitotično fazo, ki je običajno povezana s pridobitvijo specifičnih lastnosti, ki so povezane z diferenciacijo (Hanahan in Weinberg, 2000).

Rakave celice se morajo tem signalom izogniti, tako da npr. spremenijo delovanje pRb-signalne poti. Signalno pot pRb nadzirajo TGF- β in drugi zunanji dejavniki. Različni tumorji namreč izgubijo odzivnost na TGF- β preko zmanjšanja občutljivosti na TGF- β ali preko mutiranih, nefunkcionalnih receptorjev za TGF- β (Fynan in Reiss, 1993). Potek pRb-signalne poti lahko spremenijo tudi virusni onkoproteini, ki pogosto povečajo izražanje ciklina D, kar vodi v nekontrolirane celične delitve (npr. onkoprotein E7 pri z virusi induciranih tumorjih, predvsem pri raku materničnega vratu) (Dyson in sod., 1989). Pogosto je v rakavih celicah prost in aktiven transkripcijski dejavnik E2F, ki v Rb-signalni poti sproži izražanje genov za ciklina E in A in posledično omogoči celično delitev.

Eden od mehanizmov, ki rakavim celicam omogoča nekontrolirane celične delitve je tudi zmanjšano izražanje integrinov in drugih celičnih adhezijskih molekul, ki celične delitve zavirajo. Poleg tega rakave celice pogosto izgubijo sposobnost dokončne (terminalne) diferenciacije in obdržijo manj diferenciran, visoko proliferativen fenotip (Hanahan in Weinberg, 2000).

2.3.1.3 Izogibanje apoptozi

Odpornost proti apoptozi lahko rakave celice pridobijo na več načinov. Najpogostejši je mutacija tumorsupresorskega gena *p53*, pri čemer pride do okvare senzorja-proteina *p53*, ki zaznava poškodbe DNA in lahko sproži apoptotsko kaskado (Harris, 1996). V proces izogibanja apoptoze je vključena tudi signalna pot PI3 kinaza-AKT/PKB, ki prenaša protiapoptotske signale za preživetje in je ključna za preživetje normalnih celic. To pot izkoriščajo tudi rakave celice. Signalna kaskada je lahko aktivirana z zunajceličnimi dejavniki (npr. IGF-1/2 ali IL-3) (Evan in Littlewood, 1998), z aktivacijo proteinov Ras (Downward, 1998) ali z izgubo tumorsupresorskega proteina *pTEN* (Cantley in Neel, 1999). Do 30 % rakavih celic ima mutiran gen *Ras*, kar vodi v delovanje proteina Ras neodvisno od zunajceličnih signalov (Fernandez-Medarde in Santos, 2011). Rakave celice se izogibajo apoptozi tudi z izničenjem t.i. signala smrti FAS (Pitti in sod., 1998).

2.3.1.4 Neskončen potencial za mitotske delitve

Zgolj neodvisnost od rastnih signalov, neodzivnost na signale, ki zavirajo celične delitve in odpornost proti apoptozi ne zagotovijo velike rasti tumorja. Eden ključnih mehanizmov, ki rakavim celicam zagotavlja neskončen potencial za delitve, je ohranjanje izražanja encima telomeraze. Telomeraza dodaja ponovitve telomernih segmentov na konce telomerne DNA. Drugi način ohranjanja dolžine telomer je z mehanizmom alternativnega podaljševanja telomer (Cesare in Reddel, 2010).

Poleg tega je ključni korak za preživetje rakavih celic tudi izogibanje senescenci. Celična senescenca je ireverzibilna zaustavitev proliferacije celic, ki jo sprožijo skrajšane telomere ali zunajcelični signali, ki celice ireverzibilno usmerijo v fazo podobno G_0 (Hanahan in Weinberg, 2000; Hanahan in Weinberg, 2011; Campisi, 2012).

2.3.1.5 Sprožitev angiogeneze

Krvožilje zagotavlja kisik in hranila, ki so ključni za celično delovanje in preživetje. Rakave celice morajo pridobiti sposobnost sproženja in ohranjanja angiogeneze. Tumorji aktivirajo angiogeno stikalo preko spremembe ravnotežja sprožilcev in inhibitorjev

angiogeneze, in sicer običajno pride do povečanja izražanja VEGF in/ali FGF ter zmanjšanja izražanja inhibitorjev angiogeneze, kot sta trombospodin-1 ali interferon β (Hanahan in Weinberg, 2000; Hanahan in Weinberg, 2011; Hanahan, 1996).

2.3.1.6 Invazija rakavih celic v tkiva in metastaziranje

Sposobnost invazije in metastaziranja omogoča rakavim celicam kolonizacijo tkiv oziroma organov, kjer vsaj na začetku hranila in prostor niso limitni dejavnik. Proces invazije in metastaziranja sestavlja več korakov, imenovanih invazivno-metastazna kaskada. Ta kaskada vsebuje zaporedje bioloških sprememb v celici, najprej invazijo v lokalno okolje, nato prenos v krvožilje in limfni sistem in prehod v oddaljena tkiva, kjer tvorijo najprej mikrometastaze in nato makroskopske tumorje (Hanahan in Weinberg, 2011). V tem procesu pride do spremembe številnih proteinov. Zmanjša ali popolnoma prekine se izražanje proteinov celične adhezije (molekule ICAM (angl. intercellular cell adhesion molecules), ki spadajo v naddružino imunoglobulinom sorodnih molekul), od kalcija odvisnih kadherinov, ki uravnavajo medcelične povezave (Christofori in Semb, 1999) in inhibitorjev proteaz (Hanahan in Weinberg, 2000). Poveča pa se izražanje zunajceličnih proteaz in transkripcijskih dejavnikov, ki uravnavajo epitelijsko-mezenhimski prehod (angl. epithelial-mesenchymal transition, EMT), kot so npr. Snail, Slug, Twist in Zeb1/2 (Hanahan in Weinberg, 2011).

2.3.1.7 Nastajanje mutacij in nestabilnost genoma

Med tumorigenezo se v rakavih celicah poveča število genskih in kromosomskih mutacij, ki vodijo v nestabilnost genoma. Do nestabilnosti genoma pride v celicah, ki so bolj občutljive na mutagene agense in/ali preko poškodb oziroma uničenja popravljalnih mehanizmov. Številne mutacije v popravljalnih mehanizmih, spremembe števila kopij določenih genov in spremembe nukleotidnih zaporedij so ključne za napredovanje tumorja in zato je nestabilnost genoma ena izmed ključnih lastnosti rakavih celic (Hanahan in Weinberg, 2011).

2.3.1.8 Reprogramiranje celične energijske presnove

Nekontrolirana rast rakavih celic zahteva tudi spremembo celične energijske presnove, ki omogoča celično rast in proliferacijo na tem nivoju. Rakave celice spremenijo celično energijsko presnovo tako, da se tudi v aerobnih razmerah omejijo predvsem na glikolizo, kar vodi v t.i. aerobno glikolizo oz. Warburgov učinek. Za glikolizo je značilna nizka učinkovitost tvorbe ATP, vendar je prednost te poti v tem, da pri povečani glikolizi lahko celica porabi več intermediatov glikolize v biosinteznih poteh, npr. nukleozidov in aminokislin, kar omogoča biosintezo makromolekul in organelov za nove celice (Hanahan

in Weinberg, 2011). Znotraj enega tumorja obstaja več populacij rakavih celic, in sicer ena populacija proizvaja laktat z aerobno glikolizo (Warburgov učinek), medtem ko druga populacija kot glavni vir energije uporablja laktat. Tako populaciji delujeta v simbiozi. Nivo oksigenacije se v tumorju regionalno spreminja, kar je posledica kompleksne organizacije tumorja (Hardee in sod., 2009; Hanahan in Weinberg, 2011; Kennedy in Dewhirst, 2010).

2.3.1.9 S tumorji spodbujeno vnetje

Vsi tumorji vsebujejo celice imunskega sistema, a njihovo število in vloga variira. Primarna vloga imunskih celic je odstranjevanje tumorja, lahko pa vplivajo tudi na progresijo tumorjev. Vnetje pripomore k razvoju tumorja tako, da zagotovi prisotnost bioaktivnih molekul v mikrokolju tumorja, vključno z rastnimi dejavniki, anti-apoptotskimi dejavniki, angiogenimi dejavniki, encimi, ki spreminjajo zunajcelični matriks in omogočajo angiogenezo, invazijo in metastaziranje ter signali, ki vodijo v aktivacijo epitelijsko-mezenhimskega prehoda. Poleg tega celice imunskega sistema proizvajajo, reaktivne kisikove zvrsti, ki delujejo kot mutageni na rakave celice in s tem pospešujejo razvoj teh celic v smeri povečane malignosti (Grivennikov in sod., 2010; Hanahan in Weinberg, 2011).

2.3.1.10 Izogibanje imunskemu sistemu

Celice in tkiva stalno nadzoruje imunski sistem, ki prepozna in odstrani večino porajajočih se rakavih celic in posledično nastajajočih tumorjev. Makroskopski tumorji so tako posledica celic, ki so se izognile zaznavanju imunskega sistema ali omejile učinek imunskega sistema. Interakcije med rakavimi in imunskimi celicami še niso pojasnene. Možno je, da se rakave celice izogibajo imunskemu sistemu z onemogočanjem posameznih komponent imunskega sistema (npr. inhibicijo citotoksičnih limfocitov T in celic ubijalk, sekrecijo TGF- β ali drugih imunosupresivnih dejavnikov) ali uporabo imunskih celic, ki delujejo imunosupresivno, npr. regulatornih limfocitov T ali supresorskih celic mieloidnega izvora (angl. myeloid-derived suppressor cells), ki lahko onemogočijo delovanje citotoksičnih limfocitov T (Yang in sod., 2010; Hanahan in Weinberg, 2011; Mougiakakos in sod., 2010).

2.3.2 Karcinogeni

Karcinogene lahko razdelimo na okoljske in endogene. Okoljske karcinogene delimo na a) fizikalne (npr. ionizirajoče sevanje, ki povzroča genske in kromosomske mutacije in ultravijolična svetloba, ki lahko povzroča nastanek pirimidinskih dimerov), b) kemijske (npr. benzopiren, etanol, heterociklični amini, azbest, kadmij, arzenik, arilamini, aflatoksini) in c) biološke (npr. virus hepatitisa B, virus hepatitisa C, človeški T-celični limfotropni virus, humani papiloma virus, *Helicobacter pylori*, *Schistosoma mansoni*). Med endogene

karcinogene spadajo presnovne reakcije, v katerih nastajajo reaktivne kisikove zvrsti, kronična vnetja in mutacije genov, ki predstavljajo tveganje za razvoj raka. Med slednje spadajo geni, ki vsebujejo zapis za encime, ki popravljajo DNA in geni celičnega cikla (npr. *Rb1*, *p53*) (Saeki in Sugimachi, 2001).

2.3.3 Rak sečnega mehurja

Rak sečnega mehurja je peto najpogostejše rakavo obolenje v Evropi in deveto najpogostejše rakavo obolenje na svetu (Bray in sod., 2013; Cancer Research UK, 2016). Leta 2012 so na svetovni ravni zabeležili 429.800 novih primerov raka sečnega mehurja (Cancer Research UK, 2016).

Rak sečnega mehurja je primarno bolezen starejših (Murphy in Karnes, 2014). Povprečna starost bolnika ob diagnozi je 73 let in kar 90 % bolnikov z rakom sečnega mehurja je starejših od 55 let (Cancer Research UK, 2016). Rak sečnega mehurja je trikrat pogostejši pri moških kot pri ženskah in epidemiološke študije kažejo, da je višja incidenca povezana z intrinzičnimi razlikami med spoloma in epidemiološkimi dejavniki (razlike v hormonskih poteh, izpostavitvi karcinogenom, aktivnosti presnovnih encimov, diagnostični obravnavi bolnikov) (Dobruich in sod., 2016; Kaufman in sod., 2009). Pojavnost raka sečnega mehurja je trikrat do štirikrat večja v razvitih državah (Ferlay in sod., 2015).

K razvoju raka sečnega mehurja prispevajo različni poklicni in okoljski dejavniki, med katerimi naj bi bilo kajenje odgovorno kar za 50 % rakavih obolenj sečnega mehurja pri moških in 30 % pri ženskah (Murphy in Karnes, 2014). Poleg tega so dejavniki tveganja tudi vdihavanje in izpostavljenost aromatičnim aminom in kemikalijam v gumarski industriji ter industriji barv, kronična absorpcija nitratov in arzenovega (III) oksida (arzenika) v hrani ali v pitni vodi (Anton-Culver in sod., 1993; Engeland in sod., 1996; Guo in sod., 1997; Ouellet-Hellstrom in sod., 1996). V endemičnih področjih Afrike k razvoju raka sečnega mehurja najbolj prispeva kronična okužba s parazitom *Schistosoma hematobium* (Zaghloul, 2012).

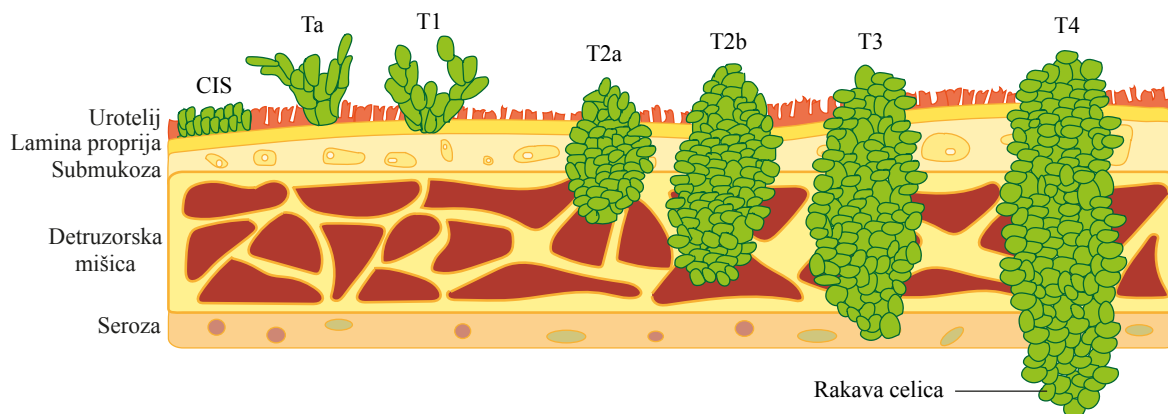
Rak sečnega mehurja kategoriziramo glede na tip celice, iz katere izhaja. Glede na to ločimo rake sečnega mehurja urotelijskega ali ne-urotelijskega izvora. Urotelijski karcinomi, ki vključujejo urotelijske karcinome, papilarne lezije in mišično-invazivne lezije predstavljajo 90 % vseh obolenj raka sečnega mehurja, medtem ko je preostalih 10 % obolenj raka sečnega mehurja ne-urotelijskega izvora, in sicer so to ploščatocelični karcinomi in adenokarcinomi (Dahm in Gschwend, 2003; Prasad in sod., 2011). Mišično neinvazivni raki (urotelijski karcinomi in papilarne lezije) izkazujejo različne morfologije in različne potenciale za invazijo. Na podlagi tega so prišli do zaključka, da imajo različni tipi celic različne vrste mutacij. Urotelijski karcinom spada med tumorje visokega gradusa, za

katere so značilne hitro rastoče in manj diferencirane celice in je ploščata lezija. Papilarni karcinomi so običajno nizkega gradusa, za njih so značilne počasnejše rastoče in bolj diferencirane celice ter so usmerjeni v lumen sečnega mehurja. Urotelijski karcinom pogosteje napreduje v mišično invazivni rak sečnega mehurja v primerjavi s papilarnimi lezijami, ki se običajno ponovno pojavijo po resekciji, ampak redkeje postanejo invazivne. Molekularne analize kažejo, da papilarne lezije običajno pridobijo mutacije v onkogenih (*H-ras*, *FGFR3*, *PI3K*), medtem ko so urotelijski karcinomi običajno okarakterizirani z mutacijami, ki povzročajo izgubo funkcije tumorsupresorskih genov (*p53*, *pRB*, *PTEN*) (Cheng in sod., 1999; Cordon-Cardo, 2008; Goebell in Knowles, 2010).

Ob diagnozi zdravnik na podlagi biopsije in drugih pregledov določi stadij raka sečnega mehurja. Stadij raka se določi po sistemu TNM in je osnovan na treh glavnih informacijah – T (tumor) opiše rast primarnega tumorja (Preglednica 1, Slika 4), N (bezgavke (*nodus lymphaticus*), angl. nodes) opiše morebitno širitev v bezgavke, M (metastaze) opiše, ali se je rak razširil v oddaljena mesta v telesu (American Cancer Society, 2016; Knowles in Hurst, 2015). Petletna stopnja preživetja bolnikov z rakom sečnega mehurja v prvem stadiju je 88 %, v drugem 63 %, v tretjem 46 % in v četrtem stadiju 15 % (Cancer Research UK, 2016).

Preglednica 1: Opredelitev stadijev raka sečnega mehurja (Cancer Research UK, 2016).

Okrajšava stadija	Opis stadija
CIS	Neinvazivni urotelijski karcinom (<i>carcinoma in situ</i>)
Ta	Neinvazivni papilarni karcinom
T1	Tumor vrašča v lamino proprijo
T2	Tumor vrašča v detruzorsko mišico (muskularis proprijo)
T2a	Tumor vrašča v notranjo plast detruzorske mišice
T2b	Tumor vrašča v zunanjo plast detruzorske mišice
T3	Tumor raste skozi detruzorsko mišico in se vrašča v maščobno tkivo
T4	Tumor se je razširil iz maščobnega tkiva v sosednje organe ali strukture.



Slika 4: Opredelitev stadijev raka sečnega mehurja.

2.3.3.1 Mišično neinvazivni rak sečnega mehurja

Ob začetni diagnozi večina rakavih obolenj sečnega mehurja spada med mišično-neinvazivne, ki so omejeni na mukozo ali vdirajo v lamino proprijo, a ne vdirajo v detruzorsko mišico (TIS, Ta, T1; Preglednica 1, Slika 4). Večina teh tumorjev (70 – 75 %) je omejenih na mukozo in so običajno papilarne oblike. Po njihovi odstranitvi pogosto pride do ponovnega pojava tumorjev. Le pri majhnem deležu bolnikov (manj kot 5 %) pride do napredovanja v mišično-invazivne oblike (Babjuk in sod., 2015; Heney in sod., 1983; Ro in sod., 1992).

Mišično-neinvazivni rak sečnega mehurja zdravijo s transuretralno resekcijo (delna ali popolna odstranitev tumorja skozi sečnico) in elektrokoagulacijo tumorja v kombinaciji z imunoterapijo (s cepivom BCG) ali fokalno kemoterapijo v sečnem mehurju. V primeru obsežnih, ponavljajočih se ali na terapijo neodzivnih tumorjev izvedejo radikalno cistektomijo (odstranitev sečnega mehurja v celoti). Sledenje bolnikov z mišično-neinvazivnim rakom sečnega mehurja zahteva redne cistoskopije na tri mesece prvo leto, drugo leto na šest mesecev, nato enkrat letno (Onkološki inštitut, 2016).

2.3.3.2 Mišično invazivni rak sečnega mehurja

Približno 25 % rakavih obolenj sečnega mehurja ob prvi diagnozi uvrščamo med mišično-invazivne (T2-T4; Preglednica 1, Slika 4). Navkljub agresivnim načinom zdravljenja, je za mišično invazivni rak sečnega mehurja značilna visoka ponovljivost in slaba prognoza. Kar 50 – 70 % bolnikov z mišično invazivnim rakom sečnega mehurja umre v obdobju 5 let od postavitve diagnoze (Park in sod., 2014).

Mišično invazivni rak sečnega mehurja zdravijo z operativno radikalno cistektomijo z odstranitvijo regionalnih bezgavk, z radikalnim obsevanjem sečnega mehurja in področnih bezgavk (s sočasno kemoterapijo) ter s kemoterapijo (predoperativno ali dopolnilno) oziroma s kombinacijo naštetih načinov zdravljenja. Napredovani rak sečnega mehurja zdravijo s kemoterapijo, saj operativna odstranitev raka ni smiselna (Onkološki inštitut, 2016).

2.4 REGENERATIVNA MEDICINA

Regenerativna medicina je interdisciplinarno področje raziskav in kliničnih aplikacij, ki uporablja načela bioloških in inženirskih znanosti za razvoj živih tkivnih ali organskih nadomestkov. V regenerativni medicini ločimo tri pristope, 1) vsaditev funkcionalnih celic, med drugim tudi matičnih celic, v poškodovano ali okvarjeno tkivo, 2) uporabo različnih

sintetičnih materialov ali materialov naravnega izvora, ki pomagajo pri ponovnem oblikovanju poškodovanega ali okvarjenega tkiva in 3) tkivno inženirstvo, t.j. uporabo ustreznih nosilcev, ki spodbujajo rast tkivno specifičnih celic in oblikovanje novega tkiva (Dragin Jerman in Erdani Kreft, 2012). Priprava biološkega nosilca je ključna v razvoju s tkivnim inženirstvom pridobljenih tkiv. Tip biološkega materiala igra ključno vlogo pri nadzorovanju strukture in funkcije tkiva, saj interagira s presajenimi celicami ali celicami gostitelja. Idealni nosilec ne sme biti toksičen, imeti mora enake mehanske lastnosti kot želeno tkivo, poleg tega pa mora integrirati biokemijske, topografske lastnosti na način, da posnema lastnosti naravnega tkiva (Mahfouz in sod., 2013).

2.4.1 Tkivno inženirstvo sečnega mehurja

Urinarni trakt je podvržen različnim bolezenskim stanjem, kot so npr. kongenitalne anomalije, travme, vnetja in malignosti. Te bolezni zahtevajo zamenjavo poškodovanih organov ali tkiv. Zaradi nezadostnega števila darovanih organov, težav z imunosupresijo in zapletov povezanih z uporabo tujih tkiv se je pojavila potreba po novih terapijah, in sicer po tkivnem inženirstvu (Mahfouz in sod., 2013).

Tkivno inženirstvo je najnaprednejša tehnologija regenerativne medicine in vključuje principe transplantacij, znanosti o materialih in celicah z namenom zamenjave bolnega ali poškodovanega tkiva z novim. Zmožnost učinkovite uporabe donorskega tkiva in zagotavljanje ustreznih pogojev za dolgoročno preživetje, rast in diferenciacijo so ključni koraki za uspešno uporabo nosilcev in celic v tkivnem inženirstvu sečnega mehurja. Raziskovalci izbirajo med uporabo celic iz izbranega organa (npr. urotelijske celice in celice gladkih mišic) in uporabo matičnih celic (Mahfouz in sod., 2013). Zaradi naraščajočega števila bolnikov z invazivnim rakom sečnega mehurja se je pokazala potreba po novih metodah zdravljenja, a navkljub napredku na tem področju bodo potrebne številne raziskave, preden bo rekonstrukcija sečnega mehurja postala standard v klinični regenerativni urologiji (Omar in sod., 2015).

2.4.2 Uporaba amnijske membrane v tkivnem inženirstvu

Izbira ustreznega biološkega materiala za nosilec je pomemben korak v tkivnem inženirstvu. Nosilci morajo zagotavljati ustrezno okolje za rast in diferenciacijo celic in omogočati tvorbo funkcionalnega tkivnega nadomestka, poleg tega pa se morajo učinkovito integrirati v gostiteljevo tkivo po transplantaciji *in vivo*. Biološki materiali običajno vsebujejo naravne bioaktivne molekule, ki spodbujajo rast in diferenciacijo in so zaradi tega pogosta izbira v tkivnem inženirstvu (Hsiao in sod., 2011).

2.4.2.1 Uveljavljena uporaba amnijske membrane v kliniki

Amnijsko membrano je v kirurgiji prvi uporabil Davis leta 1910 pri presaditvi kože. AM je pogosto uporabljena v oftalmologiji, kjer jo uporabljajo za zdravljenje poškodb epitelijske ali ulkusov in kot obliž, ki prekrije oko ter spodbuja epitelizacijo (Dua in sod., 2004; Liu in sod., 2010; Silini in sod., 2015). AM uporabljajo tudi v dermatologiji, in sicer za zdravljenje opeklin in kroničnih ulkusov (Lo in Pope, 2009) ter pri številnih kirurških postopkih, npr. pri preprečevanju pooperativnih adhezij, v abdominalni kirurgiji, pri operacijah rekonstrukcije vagine itd. (Silini in sod., 2015).

2.4.2.2 Klinične študije, ki vključujejo uporabo amnijske membrane

Trenutno je v teku 117 kliničnih študij, ki vključujejo uporabo amnijske membrane (National Institutes of Health, 2016). Rezultati zaključenih študij in preliminarne rezultati potekajočih študij kažejo pozitiven terapevtski učinek uporabe AM v oftalmologiji (keratitis, bolezni oči, glavkoma idr.), zdravljenju diabetesa in z njim povezanih obolenj (diabetična noga, periferna arterijska bolezen), poškodb kože (opeklin, amputacijskih ran, dermatitisa), v dentalni medicini (kronični periodontitis, gingivitis), ortopediji (osteoartritis), poškodbah hrbtenjače, preprečevanju brazgotinjenja tkiva (po operativnih posegih kraniektomije, artroplastiki kolen, zdrsu medvretenčne ploščice), poškodbah pljuč, hematoloških malignih obolenjih, multipli sklerozi idr. (Silini in sod., 2015).

2.5 UROTELIJSKE CELICE *IN VITRO*

Celice *in vitro* (v kulturi) rastejo v nadzorovanih pogojih (običajno v petrijevkah z ustreznim hranilnim medijem in ustrezno atmosfero (5 % CO₂, 37 °C)) izven njihovega naravnega okolja (Johnson in sod., 1991). Primarno celično kulturo predstavljajo celice neposredno po osamitvi iz tkiva ali kužnine. Trajno celično kulturo predstavljajo istovrstne celice, gojene po predhodnem kloniranju, ki so pogosto transformirane in se neprestano delijo (Slovenski medicinski slovar, 2016).

Urotelijske celične kulture so model *in vitro*, ki omogoča raziskave razvoja in diferenciacije urotelijskih celic, proučevanje raka sečnega mehurja, intersticijskega cistitisa in okužb sečnega mehurja. Poleg študija biologije in fiziologije sečnega mehurja, so ti modeli pomembni predvsem pri razvoju na tkivnem inženirstvu osnovanih novih metod zdravljenja patoloških stanj v urologiji (Zhang in Atala, 2013).

2.5.1 Celične kokulture

Kokultura je način gojenja celic, pri katerem gojimo dve različni populaciji celic v medsebojnem kontaktu. Kokulture raziskovalci uporabljajo za študij naravnih interakcij med dvema populacijama, izboljšanje pogojev gojenja za določene celične populacije ali vzpostavitev umetnih interakcij med dvema populacijama. Kokulture so posebej pomembne pri razvoju zdravil, saj posnemajo okolje, ki je bolj podobno *in vivo* razmeram in omogočajo testiranja medceličnih interakcij (Goers in sod., 2014).

2.6 MIKROORGANIZMI V URINARNEM TRAKTU

2.6.1 Normalna mikrobiota urinarnega trakta

Izraz mikrobiota je definiran kot mikroorganizmi v določenem okolju (Cho in Blaser, 2012). Natančneje se izraz nanaša na mikrobne taksonomske skupine, ki so povezane z določenim okoljem in jih odkrijemo z uporabo molekularnih metod, npr. s sekvenciranjem 16S ribosomske RNA (Whiteside in sod., 2015).

Mikrobioto urinarnega trakta so analizirali z molekularnimi metodami. Urin je bil pridobljen s 1) prostim mokrenjem – prvi curek (Dong in sod., 2011; Nelson in sod., 2012; Nelson in sod., 2010), 2) prostim mokrenjem – srednji curek (Fouts in sod., 2012; Lewis in sod., 2013; Siddiqui in sod., 2011; Willner in sod., 2014), 3) transuretralno kateterizacijo (Hilt in sod., 2014; Pearce in sod., 2014; Wolfe in sod., 2012), 4) suprapubičnim aspiratom (Wolfe in sod., 2012). Najpogostejše identificirani rodovi bakterij so bili *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Sneathia*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Actinobaculum*, *Aerococcus*, *Anaerococcus*, *Burkholderia*, *Gardnerella*, *Prevotella*, *Corynebacterium*, *Bifidobacterium*. Mikrobiota pri bolnikih se razlikuje od zdravih posameznikov, razlike pa se pojavljajo tudi glede na tip obolenja (Whiteside in sod., 2015).

Whiteside in sod. (2015) ugotavljajo, da so variacije v rezultatih zaznanih rodov bakterij prevelike, da bi lahko dokazali, da obstajajo primerljive bakterijske združbe v posameznikih istega spola ali starosti, vendar menijo, da imajo razlike v strukturi mikrobiote vlogo pri zdravju in razvoju bolezni sečil.

2.6.2 Okužbe urinarnega trakta

Okužbe urinarnega trakta so med najpogostejšimi bakterijskimi okužbami pri ljudeh (Foxman, 2003). Tovrstne okužbe so pogoste predvsem pri ženskah, saj ima kar polovica žensk okužbo sečnega mehurja vsaj enkrat v življenju. Poleg tega kar 20 – 30 % žensk

ponovno zbolijo za okužbo sečnega mehurja v času treh do štirih mesecev po primarni okužbi (Foxman, 2002). Tudi starejši in otroci pred puberteto so dovzetni za ponavljajočo se in kronično okužbo sečnega mehurja (Conway in sod., 2007; Foxman, 2002).

Klinične okužbe urinarnega trakta delimo na nezapletene in zapletene. Nezapletene okužbe urinarnega trakta običajno prizadanejo posameznike, ki so sicer zdravi in nimajo strukturnih ali nevroloških posebnosti urinarnega trakta (Hooton, 2012; Nielubowicz in Mobley, 2010). Zapletene okužbe urinarnega trakta definiramo kot okužbe urinarnega trakta, ki so povezane z dejavniki, ki ogrozijo urinarni trakt ali zaščitne mehanizme gostitelja, kar vključuje motnjo v odtoku urina (t.i. urinarno obstrukcijo), nezmožnost popolnega odvajanja urina (t.i. urinarno retencijo), povzročeno z nevrološko boleznijo, imunosupresijo, odpoved ali presaditev ledvic, nosečnost in prisotnost tujih teles, kot so kamni v sečilih, katetri ali druge naprave za drenažo (Levison in Kaye, 2013; Lichtenberger in Hooton, 2008).

Okužbe urinarnega trakta povzročajo po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije ter določene glive (Flores-Mireles in sod., 2015). Najpogostejši povzročitelj nezapletenih in zapletenih okužb urinarnega trakta je uropatogena bakterija *Escherichia coli* (UPEC). Pri nezapletenih okužbah urinarnega trakta po pogostosti UPEC sledijo naslednji povzročitelji: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, streptokoki skupine B, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Candida* spp. (Foxman, 2014; Kline in sod., 2011; Nielubowicz in Mobley, 2010; Ronald, 2003). Najpogostejši povzročitelji zapletenih okužb urinarnega trakta (poleg UPEC) so *Enterococcus* spp., *K. pneumoniae*, *Candida* spp., *Staphylococcus aureus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* in skupina B streptokoki (Chen in sod., 2013; Fisher in sod., 2011; Jacobsen in sod., 2008; Levison in Kaye, 2013).

2.6.3 Okužbe sečnega mehurja

Dejavniki tveganja za nezapleteno okužbo sečnega mehurja (cistitis) pri odraslih predstavljajo ženski spol, spolna aktivnost, predhodna okužba urinarnega trakta, izpostavljenost spermicidom, sladkorna bolezen, vaginalna vnetja, izpostavljenost antibiotikom ter anatomske, genetske ali fiziološke dejavniki, kot so obstrukcije v spodnjem genitalnem traktu, pomanjkanje estrogena ali če posameznica ni sekretorka antigenov krvnih skupin ABH (ne izloča antigenov krvnih skupin ABH v slini, znoju, solzah in serumu) (Foxman, 2014; Hannan in sod., 2012; Harrington in Hooton, 2000; Lee in sod., 2014; Scholes in sod., 2000; Sheinfeld in sod., 1989).

Večja prevalenca okužb sečnega mehurja je pri mlajših ženskah (največja prevalenca je v starostni skupini 15 – 29 let) in se povečuje pri starostnikih, tako pri moških in pri ženskah.

Do 60. leta starosti je prevalenca signifikantno višja pri ženskah kot pri moških (Johnson, 1991).

Simptomi cistitisa so lahko relativno blagi in vključujejo pogosto ali nujno uriniranje in suprapubično bolečino ali vodijo v okužbe ledvic (pielonefritis), kar spremlja povišana telesna temperatura, slabost, bruhanje in v 30 % primerov bakteriemija in (morebitna) sepsa (Bower in sod., 2005). Okužbe sečnega mehurja se pogosto ponavljajo, največkrat v nekaj tednih ali mesecih po prvi akutni okužbi in lahko prispevajo k dodatnim težavam, vključno z brazgotinjenjem ledvic in povečanim tveganjem za razvoj raka sečnega mehurja (Foxman, 2002; Kantor in sod., 1984; La Vecchia in sod., 1991; Yamamoto in sod., 1992).

Bolnike s simptomatsko okužbo urinarnega trakta običajno zdravijo z antibiotiki (npr. sulfametoksazol, ciprofloksacin, ampicilin), ki sicer lahko dolgotrajno spremenijo normalno mikrobioto vagine in gastrointestinalnega trakta ter vodijo k razvoju mikroorganizmov, odpornih proti antibiotikom (Foxman, 2014; Kostakioti in sod., 2013).

2.6.4 Potek okužbe urinarnega trakta

2.6.4.1 Nezapletena okužba urinarnega trakta

Nezapletena okužba urinarnega trakta se prične, ko mikroorganizmi, ki bivajo v gastrointestinalnem traktu, kontaminirajo periuretralni predel in so sposobni kolonizirati sečnico. Rezultat posledične migracije v sečni mehur in izražanje pilov ter adhezinov je kolonizacija in invazija v dežnikaste površinske urotelijske celice. Zaradi vnetnega odziva gostitelja, vključno z infiltracijo nevtrofilcev, se prične število zunajceličnih bakterij manjšati. V sečnem mehurju je od posledice kompleksnih interakcij med gostiteljem in patogenom odvisno, ali bo patogen koloniziral sečni mehur ali bo odstranjen (Slika 5A) (Flores-Mireles in sod., 2015).

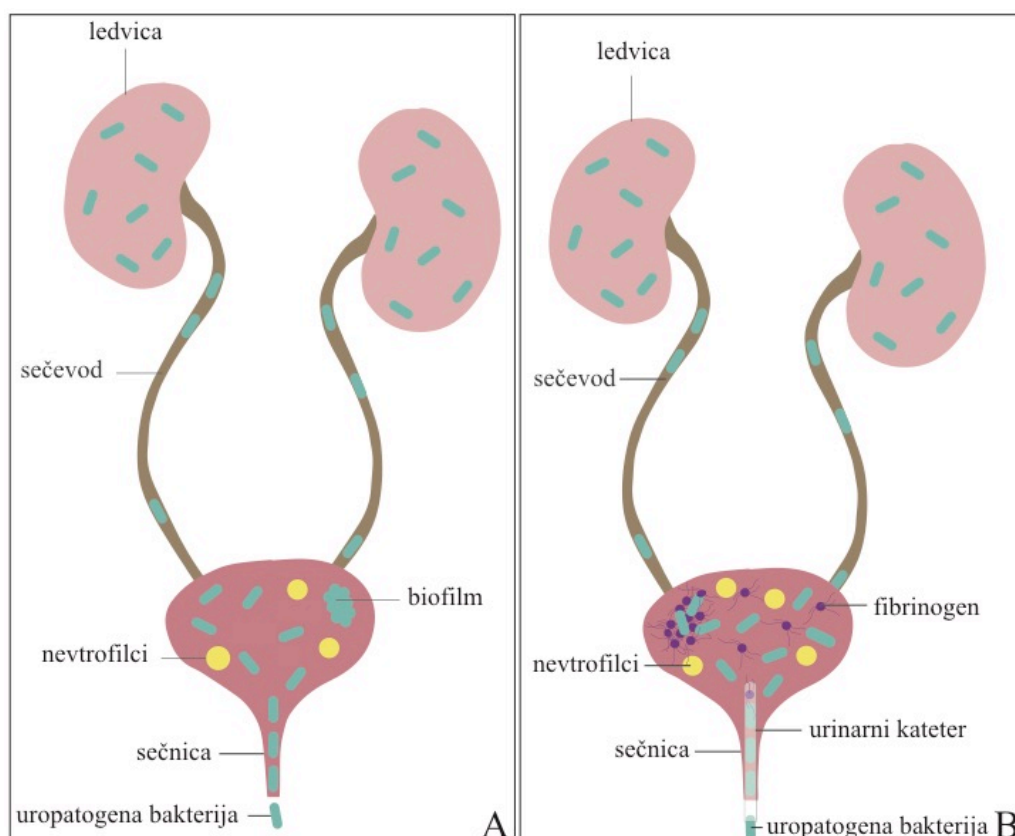
Nekatere bakterije se izognejo imunskemu sistemu z invazijo v gostiteljeve celice ali z morfološkimi spremembami, ki jim omogočijo odpornost proti nevtrofilcem. UPEC proizvaja toksine in proteaze, ki poškodujejo celice gostitelja, čemur sledi sproščanje ključnih hranil iz celic ter sinteza sideroforov, s katerimi pridobijo železo. To omogoča preživetje in migracijo bakterij v ledvice. V ledvicah se s pomočjo adhezinov ali pilov pritrjujejo na ledvični epitelij in proizvajajo toksine, ki poškodujejo gostiteljevo tkivo. Če okužbe ne zdravimo, lahko uropatogeni mikroorganizmi prečkajo epitelno pregrado, tako prehajajo v krvni obtok in povzročijo bakteriemijo (Flores-Mireles in sod., 2015).

Uropatogeni, ki povzročajo nezapletene okužbe urinarnega trakta, npr. UPEC, *K. pneumoniae*, *S. saprophyticus*, so zmožni vezave direktno na urotelij oziroma natančneje, na uroplakin Ia. Uroplakini so glavna proteinska komponenta apikalne plazmaleme dežnikastih celic. Poleg uroplakinov so receptorji za UPEC tudi integrini $\alpha_3\beta_1$ (Eto in sod., 2007; Flores-Mireles in sod., 2015; Liu in sod., 2015; Khandelwal in sod., 2009).

2.6.4.2 Zapletena okužba urinarnega trakta

Patogeni, ki povzročajo zapletene okužbe urinarnega trakta sledijo enakim začetnim korakom okužbe (kolonizacija periuretralnega predela, napredovanje po sečnici in migracija v sečni mehur), vendar mora biti sečni mehur kompromitiran, da pride do okužbe. Najpogostejši vzrok kompromitiranega sečnega mehurja je kateterizacija, sledijo sečni ali ledvični kamni ali če so patogeni zadržani v urinarnem traktu zaradi fizične ovire (npr. zaradi povečanja prostate pri moških). Zaradi intenzivnega imunskega odziva, ki je induciran s kateterizacijo, pride do akumulacije fibrinogena na katetru in nastanka idealnega okolja za pritrjanje uropatogenov, ki izražajo fibrinogen vezavne proteine. Ob okužbi pride do infiltracije nevtrofilcev, vendar se bakterije kljub temu po vezavi na s fibrinogenom prekrите katetre razmnožujejo, tvorijo biofilm, spodbujajo poškodbe epitelija in lahko povzročijo okužbo ledvic, kjer proizvodnja toksinov sproži poškodbe tkiva. Če okužbe ne zdravimo, lahko patogeni s prečkanjem epitelne pregrade povzročijo bakteriemijo (Slika 5B) (Flores-Mireles in sod., 2015).

Nekateri patogeni, npr. UPEC, lahko povzročajo zapletene in nezapletene okužbe urinarnega trakta, medtem ko druge bakterije, npr. *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* in *Enterococcus spp.* večinoma povzročajo zapletene okužbe urinarnega trakta (Flores-Mireles in sod., 2015; Jacobsen in Shirtliff, 2011; Muruganandham in sod., 2007; Niveditha in sod., 2012).



Slika 5: Shematski prikaz (A) nezapletene okužbe in (B) zapletene okužbe urinarnega trakta. Strukture na sliki zaradi nazornosti niso prikazane v ustreznem razmerju.

2.6.5 Odpornost povzročiteljev okužb urinarnega trakta proti antibiotikom

Zdravljenje okužb urinarnega trakta postaja vedno težje zaradi pojava mikroorganizmov, odpornih proti antibiotikom. Predvsem so problematične bakterije iz družine *Enterbacteriaceae*, npr. *E. coli* in *K. pneumoniae*, ki sta obe pridobili plazmide z zapisom za β -laktamaze z razširjenim spektrom delovanja. Preko plazmidov je prišlo tudi do razvoja odpornosti proti tretji generaciji cefalosporinov in drugih antibiotikov. Druge bakterije iz družine *Enterobacteriaceae* proizvajajo β -laktamaze razreda C (encimi AmpC), ki so aktivne proti cefamicinu in tretji generaciji cefalosporinov ter tudi odporne proti β -laktamaznim inhibitorjem. Tudi proti karbapenemom odporne bakterije *K. pneumoniae* izražajo encim AmpC (Bradford, 2001; Chen in sod., 2013; Garau, 2008; Gupta in Bhadelia, 2014; Paterson, 2006; Pendleton in sod., 2013).

Ravno zaradi razvoja odpornosti mikroorganizmov proti antibiotikom in pogostega ponavljanja vnetij urinarnega trakta se kaže potreba po uvedbi alternativnih načinov zdravljenja tovrstnih okužb. Na osnovi novega znanja o patogenezi povzročiteljev okužb urinarnega trakta, raziskovalci razvijajo nove pristope odstranjevanja patogenov, ki bi ohranili komenzalno mikrobioto (Flores-Mireles in sod., 2015).

2.6.6 Uropatogena bakterija *Escherichia coli*

E. coli običajno naseljuje gastrointestinalni trakt ljudi in živali. Živi v simbiozi z gostiteljem in igra pomembno vlogo pri ohranjanju stabilnosti črevesne mikrobiote in homeostaze. Kot komenzal je *E. coli* običajno omejena na lumen črevesja in redko povzroča bolezni (Kaper in sod., 2004; Yan in Polk, 2004).

Določeni sevi *E. coli* pridobijo specifične virulentne dejavnike (s horizontalnim prenosom preko transpozonov, plazmidov, bakteriofagov in otokov patogenosti), kar poveča zmožnost adaptacije bakterij na nove ekološke niše in poveča sposobnost bakterij, da povzročijo bolezni. Ločimo 6 različnih enteričnih / diarejičnih *E. coli*: enteropatogena *E. coli*, enterohemoragična *E. coli*, enterotoksigena *E. coli*, enteragregativna *E. coli*, enteroinvazivna *E. coli*, difuzivno adherentna *E. coli* in dve zunajčrevesni *E. coli* – *E. coli*, ki povzroča neonatalni meningitis in uropatogena *E. coli* (Kaper in sod., 2004; Russo in Johnson, 2000).

Uropatogeni sevi bakterije *E. coli* so povzročitelji kar 80 % okužb urinarnega trakta (Hooton in Stamm, 1997; Svanborg in Godaly, 1997). Genetsko so heterogena skupina in se močno razlikujejo v sposobnosti kolonizacije in obstanka v sečnem mehurju ali ledvicah (Zhang in sod., 2000). Bakterijsko virulenco v urinarnem traktu uravnavajo virulentni dejavniki, ki so zapisani na kromosomu ali na otokih patogenosti. Za UPEC značilni virulentni dejavniki so toksina alfa-hemolizin in citotoksični nekrotizirajoči dejavnik 1 (CNF1), siderofora aerobaktin in enterobaktin, lipopolisaharid (LPS), kapsula in številne adhezivne strukture, ki predstavljajo najpomembnejšo determinanto patogenosti (npr. fimbrije tipa I, P-fimbrije, S/F1C-fimbrije, družina adhezinov Dr) (Mulvey, 2002).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 METODE UGOTAVLJANJA PROTIRAKAVEGA DELOVANJA AMNIJSKE MEMBRANE

3.1.1 Material, ki smo ga uporabili pri ugotavljanju protirakavega delovanja amnijske membrane

V Preglednicah 2 in 3 so navedeni aparati, laboratorijski material in kemikalije, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju protirakavega delovanja AM na Inštitutu za biologijo celice, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani.

Preglednica 2: Aparati, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju protirakavega delovanja AM.

Aparat	Proizvajalec
Avtoklav A-21 CA	Kambič, Slovenija
Avtomatske pipete Eppendorf	Eppendorf, Nemčija
Celični incubator HeraCell	Heraeus, Nemčija
Fluorescenčni mikroskop AxioImager.Z1 z dodatkom Apotome	Zeiss, Nemčija
Fluorescenčni mikroskop Nikon Eclipse TE 300	Nikon, Japonska
Mikrotom Leica RM 2135	Leica, Nemčija
Mikrovalovna pečica	Gorenje, Slovenija
Namizna centrifuga 5810R	Eppendorf, Nemčija
Stresalnik KS 260 basic	Ika, Nemčija
Svetlobni mikroskop Leica DM IL	Leica, Nemčija

Preglednica 3: Laboratorijski material in kemikalije, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju protirakavega delovanja AM.

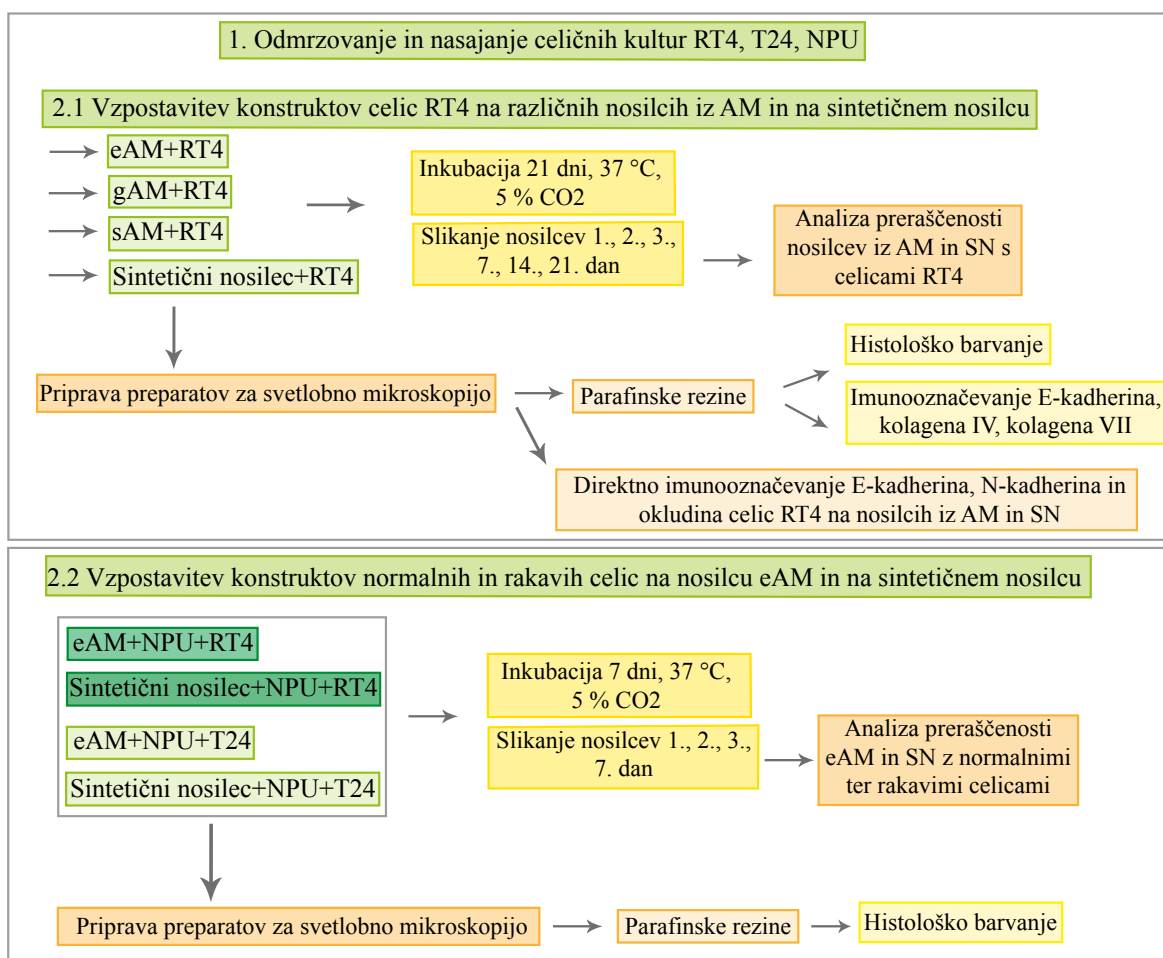
Laboratorijski material in kemikalije	Proizvajalec
Aceton	Carlo Erba Reagents, Francija
Adenin	Sigma, Nemčija
BSA	Sigma, Nemčija
Eozin	Merck, Nemčija
Etanol	KEFO, Slovenija
F12 (HAM)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ZDA
FBS	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ZDA
Fluorescentno barvilo DiI	Thermo Fisher Scientific, ZDA
Fluorescentno barvilo DiO	Thermo Fisher Scientific, ZDA
Fosfoetanolamin	Sigma, Nemčija
Glutamax	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ZDA
Gojitvene stekleničke (25 cm ² , 75 cm ²)	TPP, Švica

se nadaljuje.

Nadaljevanje Preglednice 3: Laboratorijski material in kemikalije, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju protirakavega delovanja AM.

Laboratorijski material in kemikalije	Proizvajalec
Hidrokortizon	Sigma, Nemčija
Hranilni medij A-DMEM (<i>Advanced-Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ZDA
Hranilni medij MCDB153	Sigma, Nemčija
Hranilni medij MEM (<i>Modified Eagle's medium</i>)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ZDA
Inzulin	Sigma, Nemčija
KCl	Merck, Nemčija
KH ₂ PO ₄	Merck, Nemčija
Ksilol	Carlo Erba Reagents, Francija
Mayerjeva raztopina hematoksilina	Sigma, Nemčija
Metanol	J.T. Baker, ZDA
Mišja sekundarna protitelesa	Invitrogen, ZDA
Mišje primarno protitelo proti E-kadherinu	BD Pharmingam, ZDA
Na ₂ HPO ₄	Merck, Nemčija
NaCl	Merck, Nemčija
Obročasti nosilci	Scaffdex, Finska
Paraformaldehid	Acros Organics, ZDA
PenStrep	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ZDA
Porozne membrane BD Falcon	BD Biosciences, ZDA
Serološke pipete Falcon	Thermo Fisher Scientific, ZDA
Termolizin	Sigma, Nemčija
Tripansko modrilo	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ZDA
Tryple Select	Invitrogen, ZDA
Uranil acetat	Merck, Nemčija
Vectashield	Vector Laboratories, ZDA
Vodikov peroksid	Carlo Erba Reagents, Francija
Zajčja sekundarna protitelesa	Invitrogen, ZDA
Zajčje primarno protitelo proti kolagenu IV	Invitrogen, ZDA
Zajčje primarno protitelo proti kolagenu VII	Invitrogen, ZDA
Zajčje primarno protitelo proti N-kadherinu	Abcam, Velika Britanija

3.1.2 Shema poteka dela



Slika 6: Shematski prikaz poteka ugotavljanja protirakavega delovanja AM.

3.1.3 Celične kulture, ki smo jih uporabili pri proučevanju protirakavega delovanja amnijske membrane

Trajna celična kultura RT4 izvira iz urotelijskega papiloma sečnega mehurja 63-letnega bolnika (ATCC, 2016). Za celice RT4 sta značilni epitelijska morfologija in neinvazivnost (Hudson in McReynolds, 1997).

Trajna celična kultura T24 izvira iz urotelijskega karcinoma sečnega mehurja 81-letne bolnice. Za celice T24 so značilne epitelijska morfologija, več kromosomskih nepravilnosti (hipodiploidija do hipopentaploidija), 16-urni čas podvojevanja (čas podvojevanja normalnih urotelijskih celic v celični kulturi je 36-90 ur) (Teng in sod., 2008). Celična linija je invazivna (ATCC, 2016).

Primarna kultura prašičjih urotelijskih celic izvira iz normalnih sečnih mehurjev prašičev. Sečni mehur so razrezali na več delov in normalne prašičje urotelijske celice (NPU) postrgali z urotelija, filtrirali skozi filter s premerom por $40\ \mu\text{m}$ in nato celice nasadili na gojitvene stekleničke z nasaditveno gostoto 2×10^5 celic/ cm^2 v hranilnem mediju, ki je prilagojen za gojenje prašičjih urotelijskih celic (Preglednica 4). Ko so celice dosegle 80 – 100 % konfluentnost, so celice inkubirali v proteolitičnem encimu TrypleSelect, da so se te odlepili od podlage in jih nasadili na nove gojitvene stekleničke (Erdani Kreft in sod., 2010).

3.1.4 Odmrzovanje in nasajanje normalnih prašičjih urotelijskih celic

Normalne prašičje urotelijske (NPU) celice so bile shranjene globoko zamrznjene v tekočem dušiku. Epruvete za zamrzovanje, v katerih so bile shranjene celice, smo najprej 1 minuto odmrzovali v vodni kopeli pri $37\ ^\circ\text{C}$. Nato smo celice centrifugirali (5 minut, $23\ ^\circ\text{C}$, $200 \times g$; Eppendorf), odlili supernatant in preostale celice resuspendirali z ustreznim volumnom hranilnega medija. Za štetje celic smo pripravili mešanico $50\ \mu\text{l}$ celične suspenzije in $10\ \mu\text{l}$ tripsanskega modrila. Nato smo $10\ \mu\text{l}$ mešanice nanесли na hemocitometer in prešteli celice pod svetlobnim mikroskopom (Leica) ter izračunali viabilnost in število živih celic v suspenziji. Celice smo nato z nasaditveno gostoto 1×10^5 celic/ cm^2 nasadili v nove gojitvene stekleničke (TPP) različnih velikosti ($12,5\ \text{cm}^2$, $25\ \text{cm}^2$, $75\ \text{cm}^2$), ki smo jim dodali ustrezen volumen hranilnega medija, upoštevajoč velikost gojitvene stekleničke. Celice smo gojili pri $37\ ^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 atmosferi in 100 % relativni zračni vlažnosti. Naslednji dan smo celičnim kulturam zamenjali hranilni medij, s čimer smo odstranili odmrle in nepritrjene celice.

3.1.5 Odmrzovanje in nasajanje celičnih linij RT4 in T24

Uporabili smo rakave urotelijske celice RT4 (ATCC HTB-2) in T24 (ATCC HTB-4), ki so bile shranjene v zamrzovalni skrinji na $-80\ ^\circ\text{C}$. Epruvete za zamrzovanje, v katerih so bile celice shranjene, smo najprej eno minuto odmrzovali v topli kopeli pri $37\ ^\circ\text{C}$, nato smo celice centrifugirali (5 minut, $23\ ^\circ\text{C}$, $200 \times g$; Eppendorf), odlili supernatant in pelet resuspendirali z ustreznim volumnom hranilnega medija. Potem smo pripravili mešanico $50\ \mu\text{l}$ celične suspenzije in $10\ \mu\text{l}$ tripsanskega modrila in nato $10\ \mu\text{l}$ mešanice nanесли na hemocitometer in celice prešteli pod svetlobnim mikroskopom (Leica DM IL). Potem smo izračunali viabilnost in število živih celic v suspenziji in jih nato nasadili z nasaditveno gostoto 5×10^4 celic/ cm^2 v nove gojitvene stekleničke (TPP) različnih velikosti ($12,5\ \text{cm}^2$, $25\ \text{cm}^2$, $75\ \text{cm}^2$), ki smo jih dodali ustrezen volumen hranilnega medija, upoštevajoč velikost gojitvene stekleničke. Celice smo gojili pri $37\ ^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 atmosferi in 100 % relativni zračni vlažnosti v celičnem CO_2 -inkubatorju (HeraCell, Heraus). Naslednji dan smo celičnim kulturam zamenjali hranilni medij, s čimer smo odstranili odmrle in nepritrjene celice.

3.1.5.1 Hranilni medij za rakave in normalne urotelijske celice

Za gojenje celic NPU smo uporabili hranilni medij, ki je prilagojen za gojenje le-teh. Osnova hranilnega medija sta medija A-DMEM (*Advanced-Dulbecco's modification of Eagle's medium*, Gibco) in MCDB153 (Sigma) in dodatki adenina, inzulina, hidrokortizona, glutamina, fosfoetanolamina, FBS ter antibiotikov (penicilin, streptomycin) (natančnejša sestava sledi v Preglednici 4).

Preglednica 4: Sestava hranilnega medija, prilagojenega za gojenje normalnih urotelijskih celic.

Sestavine medija	Končne koncentracije sestavin v hranilnem mediju
MCDB153 (Sigma)	50 %
A-DMEM (Gibco)	50 %
Adenin (Sigma)	15 µg/ml
Inzulin (Sigma)	5 µg/ml
Hidrokortizon (Sigma)	0,5 µg/ml
Fosfoetanolamin (Sigma)	0,1 mM
Glutamax (Gibco)	4 mM
PenStrep (Gibco)	100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicilin
FBS (Gibco)	2,5 %

Za gojenje celic RT4 in T24 smo uporabili hranilni medij, katerega osnova sta A-DMEM (*Advanced-Dulbecco's modification of Eagle's medium*, Gibco) in F12 (Gibco), dodani so še FBS in antibiotiki (penicilin, streptomycin) (natančnejša sestava sledi v Preglednici 5).

Preglednica 5: Sestava hranilnega medija, prilagojenega za gojenje celične linije RT4.

Sestavine hranilnega medija	Končne koncentracije sestavin v hranilnem mediju
A-DMEM (Gibco)	50 %
F12 (HAM; Gibco)	50 %
FBS (Gibco)	5 %
Glutamax (Gibco)	4 mM
PenStrep (Gibco)	100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicilin

3.1.6 Označevanje membran celic RT4, T24 in NPU s fluorescentnima barviloma DiI ter DiO

Membrane celic smo označili s fluorescentnima barviloma DiI in DiO (ThermoFisher Scientific), ki spadata med dolgoživeče dialkylkarbocianine. Barvili DiI in DiO sta lipofilni in lateralno difundirata ter obarvata celično membrano, pri čemer ne vplivata na viabilnost, razvoj ali osnovne fiziološke lastnosti celic (ThermoFisher Scientific, 2016).

Celice RT4, T24 in NPU smo najprej odstranili hranilni medij, dodali proteolitičen encim (TrypLE Select, Invitrogen), inkubirali celice pri 37 °C približno 15 minut oziroma dokler

se te niso zaokrožile in odlepile od podlage. Nato smo z dodatkom hranilnega medija v gojitveno stekleničko zaustavili delovanje encima, celice centrifugirali (5 minut, 23 °C, 200 ×g; Eppendorf), jih prešteli s pomočjo hemocitometra pod invertnim mikroskopom (Leica DM IL) in določili viabilnost celic. Potem smo celice zopet centrifugirali (5 minut, 23 °C, 200 ×g; Eppendorf), jih prešteli s pomočjo hemocitometra in resuspendirali v ustreznem volumnu mešanice hranilnega medija, tako da je bila končna koncentracija celic 1×10^6 celic/ml hranilnega medija. Nato smo suspenziji celic dodali barvilo DiI oziroma DiO (v razmerju 2,5 µL barvila DiO oziroma DiI/ml suspenzije celic). Rakave celice T24 in RT4 smo označili z DiI in normalne urotelijske celice z DiO. Celice smo inkubirali pri 37 °C 30 minut in jih vmes večkrat pretresli, da se je barvilo enakomerno porazdelilo. Po inkubaciji smo celice centrifugirali (5 minut, 23 °C, 200 ×g; Eppendorf), jih resuspendirali v hranilnem mediju in jih inkubirali 5 minut na sobni temperaturi (postopek spiranja smo trikrat ponovili).

3.1.7 Vzpostavitev konstruktov celic rakavih urotelijskih celic RT4 na različnih nosilcih iz amnijske membrane

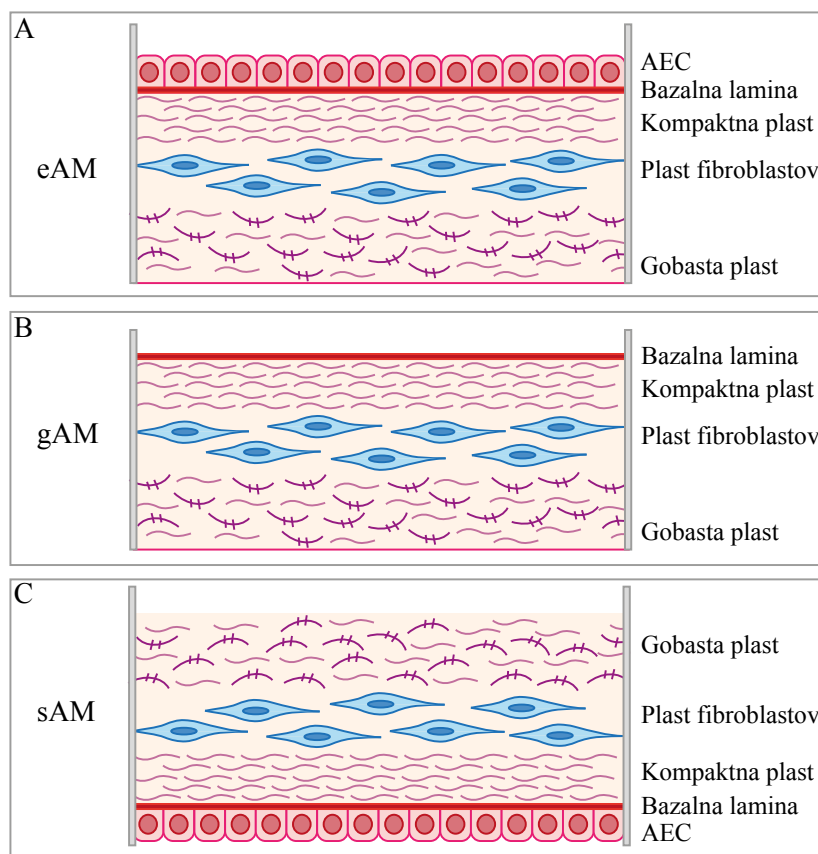
Dovoljenje za uporabo humane AM je odobrila Komisija za medicinsko etiko na seji dne 15. 12. 2009, Klinični center Ljubljana.

AM so bile pridobljene med postopkom carskega reza na Ginekološki kliniki, UKC Ljubljana s privolitvijo porodnice, katere serološki izvidi so bili negativni za viruse hepatitis B in C ter HIV in sifilis. Pridobivanje in priprava AM je potekala v sterilnih razmerah. Takoj po carskem rezu je bila posteljica sprana s fiziološko raztopino, ki je vsebovala mešanico antibiotikov (penicilin, streptomycin, neomicin) in antimikotika (amfotericin B). V sodelovanju z Očesno kliniko in Zavodom za transfuzijsko medicino Republike Slovenije smo AM najprej ločili od horiona in jo z epitelno stranjo navzgor položili na nitrocelulozno membrano. Nato smo jo skupaj z nitroceluloznim papirjem razrezali na kose v velikosti $3 \times 3 \text{ cm}^2$ ali $4 \times 4 \text{ cm}^2$. AM smo shranili v sterilnih stekleničkah na -80 °C v mediju za zamrzovanje – raztopini hranilnega medija MEM (*Modified Eagle's medium*) in glicerola (v razmerju 1:1) ter z dodatkom gentamicina v koncentraciji 25 µg/ml medija za zamrzovanje (Cirman in sod., 2014).

Pred poskusom smo AM odmrznili na sobni temperaturi v sterilnih razmerah laminarija in jih nato skupaj z nitroceluloznim papirjem vzeli iz stekleničke in jih spirali v sterilnem PBS (dvakrat po 5 minut) ter nato še v hranilnem mediju za celice RT4 (dvakrat po 5 minut). AM smo nato razrezali na primerno velike koščke, jih ločili od nitroceluloznega papirja in vpeli v obročaste nosilce premera $1,4 \text{ cm}^2$ oziroma $2,6 \text{ cm}^2$ (Scaffdex, Tempere, Finland) z

epitelno stranjo navzgor (eAM) ali s stromalno stranjo navzgor (sAM), kot je razvidno iz Slike 7.

Golo AM smo pridobili tako, da smo uporabili AM, ki je bila vpeta v nosilce z epitelno stranjo navzgor – na epitelij smo nanесли encim termolizin (*Thermolysin from Bacillus thermoproteolyticus*, Sigma; razredčen s sterilnim PBS v razmerju 1:50) in inkubirali nosilce 22 minut pri 37 °C. Nato smo nosilce spirali s sterilnim PBS in jih inkubirali v sterilnem PBS na stresalniku dvakrat po 15 minut (vmes smo sterilni PBS zamenjali, da smo odstranili debri) ter na koncu deepitelizirano AM sprali s hranilnim medijem za celice RT4. Potem smo na nosilce iz AM nasadili celice RT4 z nasaditveno gostoto 5×10^4 celic/cm².



Slika 7: Shematski prikaz nosilcev iz AM, ki so vpeti v obročasti nosilec. (A) AM vpeta z epitelijem navzgor (eAM), (B) AM, vpeta z bazalno lamino navzgor (gAM), (C) AM, vpeta s stromalno stranjo navzgor (sAM). AEC – amnijske epitelijske celice.

3.1.7.1 Priprava kontrolnih vzorcev

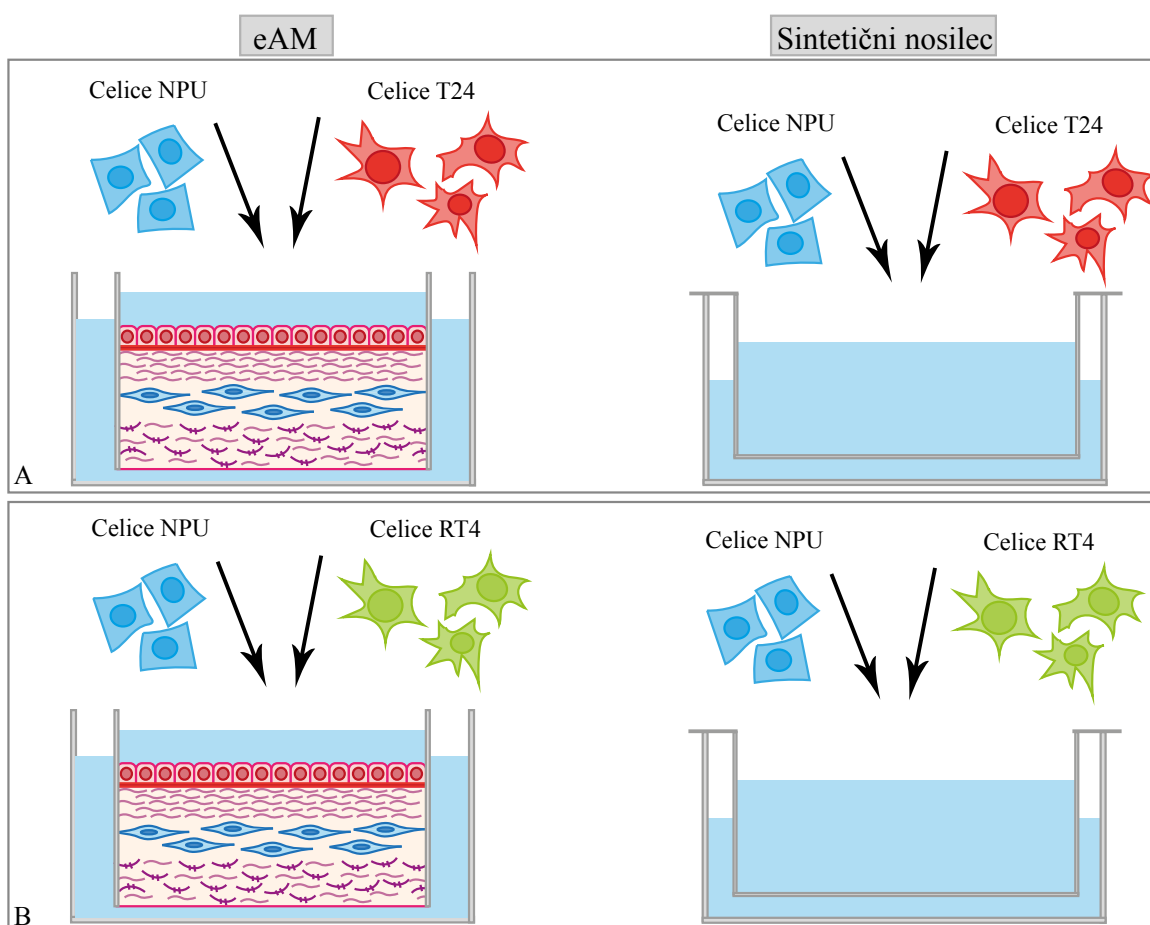
Kontrolne vzorce smo pripravili tako, da smo celice RT4 nasadili na sintetične nosilce (porozne membrane površine $4,2 \text{ cm}^2$, premer por $0,4 \text{ }\mu\text{m}$, BD Falcon) z nasaditveno gostoto $5 \times 10^4 \text{ celic/cm}^2$.

3.1.7.2 Spremljanje rasti celic RT4 na nosilcih iz AM

Celice smo slikali s fluorescenčnim mikroskopom (Nikon Eclipse TE 300) 1., 2., 3., 7., 14. in 21. dan po nasaditvi celic na nosilce iz AM. Vsak nosilec smo slikali na petih naključnih mestih pri 10-kratni povečavi objektiva s fluorescenčnim in fazno-kontrastnim mikroskopom.

3.1.8 Vzpostavitev konstruktov normalnih in rakavih urotelijskih celic na nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu

Nosilce eAM smo pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.1.5, nato smo na nosilcih vzpostavili kokulture rakavih in normalnih urotelijskih celic (Slika 8). Najprej smo pripravili suspenziji celic RT4 in T24, ki smo jih označili z barvilom DiI ter suspenzijo celic NPU, ki smo jo označili z barvilom DiO (po postopku opisanem v poglavju 3.1.3). Potem smo na nosilce hkrati nasadili fluorescentno označene celice NPU z nasaditveno gostoto $1 \times 10^5 \text{ celic/cm}^2$ in celice RT4 oziroma T24 z nasaditveno gostoto $5 \times 10^4 \text{ celic/cm}^2$.



Slika 8: Shematski prikaz konstruktov normalnih in rakavih celic na nosilcih eAM in na sintetičnem nosilcu. (A) Konstrukti celic T24 in NPU na nosilcih eAM in na sintetičnem nosilcu. (B) Konstrukti celic RT4 in NPU na nosilcih eAM in na sintetičnem nosilcu.

3.1.8.1 Priprava kontrolnih vzorcev kokultur normalnih in rakavih urotelijskih celic

Kontrolne vzorce smo pripravili tako, da smo fluorescentno označene celice NPU in RT4 oziroma T24 nasadili na sintetične nosilce (porozne membrane površine $4,2 \text{ cm}^2$, premer por $0,4 \text{ }\mu\text{m}$, BD Falcon), in sicer celice NPU z nasaditveno gostoto $1 \times 10^5 \text{ celic/cm}^2$ in celice RT4 oziroma T24 z nasaditveno gostoto $5 \times 10^4 \text{ celic/cm}^2$.

3.1.8.2 Spremljanje rasti celic NPU in RT4 oziroma T24 na nosilcu iz eAM in na sintetičnem nosilcu

Celice smo slikali s fluorescenčnim mikroskopom (Nikon Eclipse TE 300) 1., 2., 3. in 7. dan po nasaditvi celic na nosilce iz AM. Vsak nosilec smo slikali na petih naključnih mestih pri 10-kratni povečavi objektiva s fluorescenčnim in fazno-kontrastnim mikroskopom.

3.1.9 Priprava preparatov za svetlobno mikroskopijo

3.1.9.1 Priprava parafinskih rezin

Nosilce iz AM z nasajenimi celicami smo najprej fiksirali v 4 % paraformaldehidu preko noči na 4 °C. Nato smo vzorce spirali 90 minut v PBS, pri čemer smo vzorce vsakih 30 minut prenesli v svež PBS. Sledila je dehidracija v naraščajoči vrsti alkoholov: 15 minut v 70 % alkoholu, 15 minut v 90 % alkoholu, dvakrat 15 minut v 100 % alkoholu ter bistrenje v ksilolu. Vzorce smo 15 minut inkubirali v mešanici 100 % etanola in ksilola (v razmerju 2:1), nato v mešanici 100 % in ksilola (v razmerju 1:1) in nato 15 minut v čistem ksilolu na stresalniku. Nato smo vzorce prenesli v parafin, najprej za dve uri, nato pa smo jih prenesli v svež parafin, v katerem smo jih pustili preko noči. Po pripravi parafinskih blokov smo z mikrotomom (Leica RM 2135) narezali parafinske rezine (debeline 5 µm), ki smo jih pritrdili na objektno steklo.

3.1.10 Histološko barvanje celic RT4, T24 in NPU na nosilcih iz amnijske membrane in na sintetičnem nosilcu

3.1.10.1 Barvanje hematoksilin-eozin

Parafinske rezine smo deparafinizirali in hidrirali. Najprej smo jih inkubirali dvakrat po 5 minut v ksilolu, 5 minut v 100 % etanolu, 5 minut v 90 % etanolu, 5 minut v 70 % etanolu in 5 minut v destilirani vodi. Nato smo vzorce barvali v Mayerjevi raztopini hematoksilina 15 sekund (Sigma), sprali z destilirano vodo in spirali eno minuto pod tekočo vodo. Vzorce smo nato 2 minuti inkubirali v eozinu (Merck). Potem smo jih ponovno sprali v destilirani vodi in jih dehidrirali s hitrim spiranjem v 70 % etanolu, 90 % etanolu, dvominutno inkubacijo v 100 % etanolu in 5 do 10-minutno inkubacijo v ksilolu.

3.1.11 Imunofluorescentno označevanje proteinov

3.1.11.1 Imunofluorescentno označevanje E-kadherina, kolagena IV in kolagena VII na parafinskih rezinah

Parafinske rezine smo najprej deparafinizirali tako, da smo jih inkubirali dvakrat po 5 minut v ksilolu, 5 minut v 100 % etanolu, 5 minut v 70 % etanolu in dvakrat po 5 minut v destilirani vodi. Nato smo vzorce inkubirali 10 minut v mešanici 3 % H₂O₂ z metanolom, jih spirali trikrat po 5 minut v PBS in 5 minut v destilirani vodi. Za odmaskiranje antigenov (angl. antigen retrieval) smo parafinske rezine segrevali v citratnem pufru v mikrovalovni pečici (600 W) trikrat po 5 minut. Nato smo jih ohladili na sobni temperaturi in trikrat po 5 minut spirali v PBS. Sledila je enourna inkubacija v blokirnem pufru 3 % BSA v PBS. Nato smo

na vzorce nanесли zajčje primarno protitelo proti kolagenu IV (Invitrogen; redčeno v 1 % BSA v razmerju 1:200) oziroma zajčje primarno protitelo proti kolagenu VII (Invitrogen; redčeno v 1 % BSA v razmerju 1:200) oziroma mišje primarno protitelo proti E-kadherinu (BD Pharmingam; redčeno v 1 % BSA v PBS v razmerju 1:20) in inkubirali preko noči na 4 °C. Naslednji dan smo vzorce sprali trikrat po 5 minut s PBS in jih nato inkubirali 90 minut v zajčjih oziroma mišjih sekundarnih protitelesih (Invitrogen; redčeno v 1 % BSA v PBS v razmerju 1:400). Nato smo parafinske rezine spirali trikrat po 5 minut v PBS, na rezino dodali kapljico Vectashield (Vector Laboratories) s fluorescentnim barvilom DAPI ter jih pokrili s krovnikom.

3.1.11.2 Imunofluorescentno označevanje N-kadherina, E-kadherina in okludina direktno na nosilcih iz amnijske membrane z nasajenimi celicami

Koščke nosilcev iz AM s celicami smo najprej fiksirali 20 minut v na –20 °C ohlajenem etanolu na sobni temperaturi in jih nato spirali trikrat po 5 minut v PBS. Sledila je 45 minutna blokada v 3 % BSA v PBS. Nato smo vzorce inkubirali v primarnih protitelesih preko noči pri 4 °C. Uporabili smo mišja primarna protitelesa proti E-kadherinu (BD Pharmingam; redčena v 1 % BSA v PBS v razmerju 1:20) oziroma zajčja primarna protitelesa proti N-kadherinu (Abcam; redčena v 1 % BSA v PBS v razmerju 1:100) oziroma zajčja primarna protitelesa proti okludinu (Invitrogen; redčena v 1 % BSA v PBS v razmerju 1:30). Naslednji dan smo vzorce spirali trikrat po 5 minut v PBS in jih nato 90 minut inkubirali v sekundarnih protitelesih (Invitrogen; redčena v 1 % BSA v PBS v razmerju 1:400). Sledilo je spiranje trikrat 5 minut v PBS. Nato smo vzorce prenesli na objektna stekelca, nanje dodali kapljico Vectashield (Vector Laboratories) s fluorescentnim barvilom DAPI in jih pokrili s krovnikom.

3.1.12 Analiza fluorescence

3.1.12.1 Analiza imunofluorescence

Imunofluorescenco kolagena IV, kolagena VII in E-kadherina na parafinskih rezinah smo spremljali in slikali s fluorescenčnim mikroskopom znamke Nikon. Parafinske rezine smo slikali pri 10-kratni, 40-kratni in 100-kratni povečavi objektiva pri uporabi ustreznih filtrov. Celice, označene z barvilom DiI so fluorescirale rdeče, jedra, obarvana z barvilom DAPI, so fluorescirala modro, medtem ko so kolagen IV, kolagen VII in E-kadherin zaradi imunooznačevanja fluorescirali zeleno.

Imunofluorescenco E-kadherina in N-kadherina na koščkih nosilcev AM s celicami smo spremljali in slikali s fluorescenčnim mikroskopom znamke AxioImager.Z1 z dodatkom

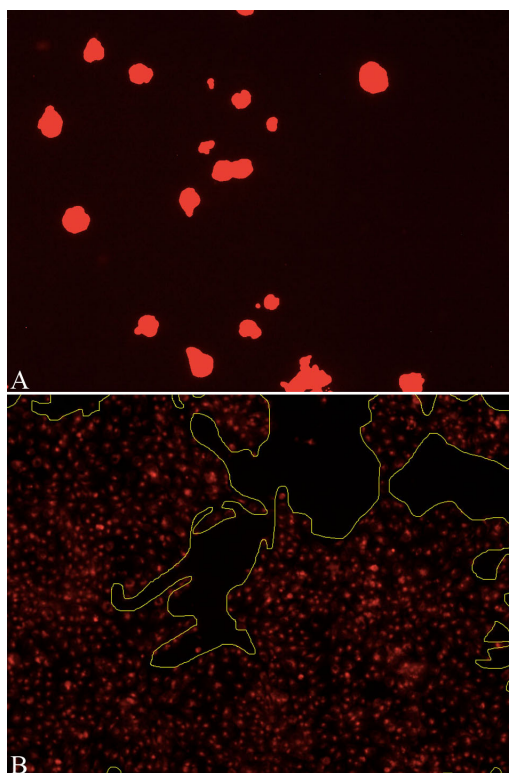
Apotome (Zeiss), s katerim lahko posnamemo več optičnih rezin. Preparate smo slikali pri 20-kratni in 63-kratni povečavi objektiva pri uporabi ustreznih filtrov. Membrane celic, označenih z barvilom DiI, so fluorescirale rdeče, jedra, obarvana z barvilom DAPI, so fluorescirala modro. E-kadherin je zaradi imunooznačevanja fluoresciral zeleno in N-kadherin rdeče.

3.1.12.2 Ugotavljanje odstotka preraščenosti amnijske membrane s celicami RT4, T24 ali NPU

Rast celic smo spremljali s fluorescenčnim mikroskopom (Nikon Eclipse TE 300) s pomočjo fluorescence barvil DiO in DiI, s katerima so bile celice označene. Rast celic smo spremljali 3 tedne (v primeru spremljanja rasti celic RT4 na nosilcih iz AM), in sicer smo konstruite slikali 1., 2., 3., 7., 14. in 21. dan trajanja poskusa pri 10-kratni povečavi objektiva na fluorescenčnem mikroskopu (slikali petkrat na naključnih mestih) in enkrat s fazno-contrastnim mikroskopom. V primeru kokultur smo celice spremljali 7 dni, in sicer smo konstruite slikali 1., 2., 3. in 7. dan trajanja poskusa pri 10-kratni povečavi objektiva na fluorescenčnem mikroskopu (slikali petkrat na naključnih mestih) in enkrat s fazno-contrastnim mikroskopom. Po vsakem slikanju smo celicam zamenjali hranilni medij, da smo odstranili mrtve celice in omogočili optimalne razmere za nadaljnjo rast celic.

Slike fluorescenčne mikroskopije smo analizirali z računalniškim programom ImageJ 1.47t (Wayne Rasband, National Institutes of Health, ZDA). Odstotek preraščenosti AM s celicami smo izmerili na dva načina:

- a. Avtomatski način analize: ko so celice rastle posamezno, smo naravnali mejno vrednost intenzitete rdeče (v primeru označevanja z barvilom DiI) ali zelene (v primeru označevanja z barvilom DiO) barve, s katero smo zajeli vse celice in avtomatsko izmerili površino (Slika 9A);
- b. Ročni način analize: ko so se celice že združevale v otočke, smo posamezne otočke ročno obkrožili in izmerili njihovo površino (Slika 9B).



Slika 9: Analiza prekritosti nosilcev iz AM in sintetičnega nosilca s celicami RT4 v programu ImageJ. A) Avtomatski način analize. B) Ročni način analize.

3.1.13 Statistična analiza rezultatov dinamike rasti celic RT4, T24 in NPU na nosilcih iz AM in na sintetičnem nosilcu

Statistično analizo smo izvedli z računalniškim programom Excel (Microsoft, 2013). Analizirali smo rezultate prekritosti nosilcev iz AM in sintetičnega nosilca s celicami RT4, T24 in NPU ter izračunali povprečno vrednost prekritosti vseh nosilcev za posamezni dan, standardni odklon in standardno napako. S Studentovim T-testom smo preverili ali so razlike v prekritosti nosilcev statistično značilne pri tveganju $p = 0,05$.

3.2 METODE UGOTAVLJANJA PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA AMNIJSKE MEMBRANE

3.2.1 Material, ki smo ga uporabili pri ugotavljanju protimikrobnega delovanja amnijske membrane

V Preglednicah 6 in 7 so navedeni aparati, laboratorijski material in kemikalije, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju protimikrobnega delovanja amnijske membrane na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Preglednica 6: Aparati, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju protimikrobnega delovanja AM.

Aparat	Proizvajalec
Avtoklav A-21 CA	Kambič, Slovenija
Avtomatske pipete Eppendorf	Eppendorf, Nemčija
Centrifuga Biofuge 13	Heraeus, Nemčija
Centrifuga Rotina 380R	Hettich, Nemčija
Elektroporator Electroporator 2510	Eppendorf, Nemčija
Inkubacijski stresalnik Innova 2300 Platform–shaker	New Brunswick Scientific, ZDA
Mešalnik Russell Hobbs Kitchen Mix&Go blender 21350-56	Spectrum brands, ZDA
Mešalo vorteks EV–100	Tehtnica, Jugoslavija
Namizna centrifuga Eppendorf 5424	Eppendorf, Nemčija
Plinski gorilnik	Tlos, Hrvaška
Spektrofotometer UV-1800	Shimadzu, Japonska
Tehtnica ET 1111	Tehtnica, Jugoslavija
Termoblok	Marijan Krokter s.p.
Vrtinčni stresalnik RC-TK	Infos HT, Švica

Preglednica 7: Laboratorijski material in kemikalije, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju protimikrobnega delovanja AM.

Laboratorijski material in kemikalije	Proizvajalec
0,1 cm elektroporacijske kivete	Bio-Rad, ZDA
Agar	Formedium, Velika Britanija
Bacto-kvasni ekstrakt	BD Sciences, ZDA
Bacto-tripton	BD Sciences, ZDA
Baza TRIS	Sigma-Aldrich, ZDA
CaCl ₂	Kemika, Hrvaška
EDTA	Bio-Rad, ZDA
Etanol	ECP, Slovenija
Fenol	Merck, Nemčija

se nadaljuje.

Nadaljevanje Preglednice 7: Laboratorijski material in kemikalije, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju protimikrobnega delovanja AM.

Laboratorijski material in kemikalije	Proizvajalec
Gentamicin	Sigma-Aldrich, ZDA
Glicerol	Polichimica S.R.L., Italija
Glukoza	Kemika, Hrvaška
Gojišče Luria Bertani	Formedium, Velika Britanija
Gojišče Mueller-Hinton	Formedium, Velika Britanija
KCl	Merck, Nemčija
KH ₂ PO ₄	Merck, Nemčija
Kloroform	Merck, Nemčija
Ledocetna kislina	Sigma-Aldrich, ZDA
MgSO ₄	Merck, Nemčija
Na ₂ HPO ₄	Merck, Nemčija
NaCl	Merck, Nemčija
NaOH	Sigma Life Sciences, ZDA
Natrijev dodecilsulfat	Carl Roth, Nemčija
Natrijev klorid	Merck, Nemčija
Tiamin	Merck, Nemčija
Tris-HCl	Carl Roth, Nemčija

3.2.2 Bakterijski sevi

V Preglednici 8 so navedeni bakterijski sevi *E. coli*, ki smo jih uporabili pri delu.

Preglednica 8: Uporabljeni bakterijski sevi *E. coli* in njihov genotip oziroma značilnost.

Bakterijski sev	Genotip / značilnost
DH5α	F– Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK–, mK+) <i>phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1</i>
TOP10	F– <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> / pMW2:Amp Gen
DL88	divji tip – UPEC (klinični sev, izoliran iz urina bolnika s cistitisom)
DL90	divji tip – UPEC (klinični sev, izoliran iz urina bolnika s cistitisom)
DL94	divji tip – UPEC (klinični sev, izoliran iz urina bolnika s cistitisom)
DL101	divji tip – UPEC (klinični sev, izoliran iz urina bolnika s cistitisom)
DL102	divji tip – UPEC (klinični sev, izoliran iz urina bolnika s cistitisom)

3.2.3 Gojišča za bakterije

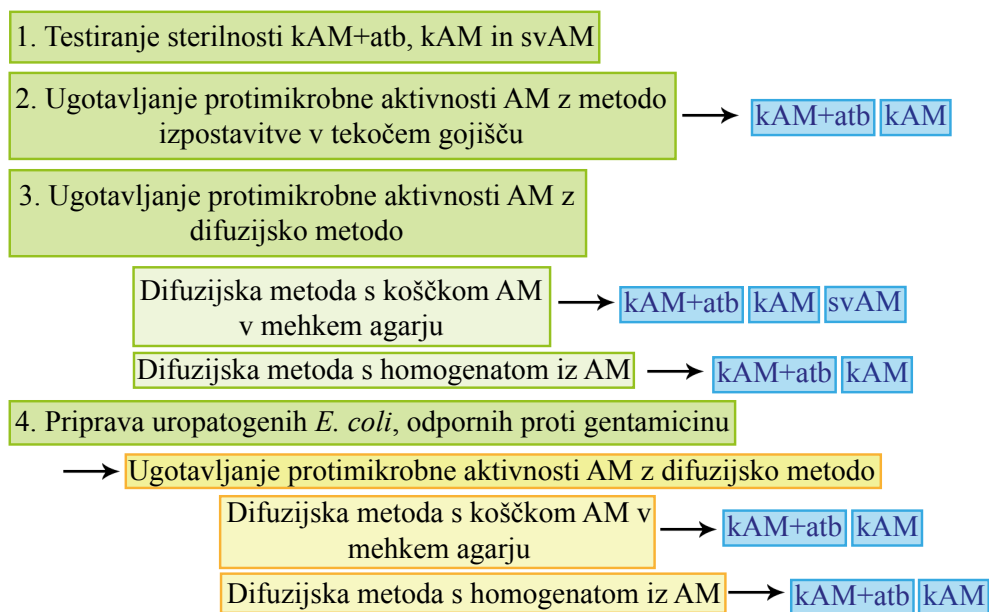
Vsa gojišča za bakterije smo pripravili tako, da smo najprej zatehtali ustrezne količino gojišča (Preglednica 9) in dodali ustrezen volumen destilirane vode. Vsa gojišča smo pred uporabo avtoklavirali v avtoklavu A-21 CA (Kambič) pri tlaku 1,1 bar in temperaturi

121 °C 15 minut in jih nato vlili v petrijevke. Po potrebi smo termostatiranim (55 °C) gojiščem dodali gentamicin (15 µg/ml ali 25 µg/ml).

Preglednica 9: Uporabljena gojišča za bakterije.

Metoda	Uporabljena gojišča za bakterije	Za pripravo 1 L gojišča smo potrebovali:
Metoda izpostavitve v tekočem gojišču	Tekoče gojišče Luria Bertani (LB)	25 g gojišča LB
Metoda prelivanja z mehkim agarjem	Mehki agar Mueller-Hinton	21 g gojišča Mueller-Hinton, 6 g agarja
	Trdni agar Mueller-Hinton	21 g gojišča Mueller-Hinton, 15 g agarja
Difuzijska metoda s koščkom AM	Trdni agar Mueller-Hinton	21 g gojišča Mueller-Hinton, 15 g agarja
Difuzijska metoda s homogenatom AM	Mehki agar Mueller-Hinton	21 g gojišča Mueller-Hinton, 6 g agarja
	Trdni agar Mueller-Hinton	21 g gojišča Mueller-Hinton, 15 g agarja
Določanje minimalne inhibitorne koncentracije za gentamicin	Tekoče gojišče LB	25 g gojišča LB
Priprava UPEC, odpornih proti gentamicinu	Trdno minimalno gojišče M9	100 ml soli M9 (12,8 g Na ₂ HPO ₄ , 3,0 g KH ₂ PO ₄ , 0,5 g NaCl, 1 g NH ₄ Cl, 478 ml destilirane vode), 20 ml 20 % raztopine glukoze, 2 ml 1 M raztopine MgSO ₄ , 0,1 ml 1 M raztopine CaCl ₂ , 0,1 ml raztopine tiamina (0,5 % w/v raztopina)
	Tekoče gojišče SOC	2 g bacto-triptona, 0,5 g bacto-kvasnega ekstrakta, 1 ml 1 M NaCl, 0,25 ml 1 M KCl, 1 ml 2 M založne raztopine magnezijevih Mg ²⁺ ionov, 1 ml 2 M glukoze.
	Trdni agar LB	25 g gojišča LB, 15 g agarja

3.2.4 Shema poteka dela



Slika 10: Shematski prikaz poteka ugotavljanja protimikrobnega delovanja AM.

3.2.5 Gojenje bakterij in priprava inokuluma

Vsi uporabljeni sevi so bili predhodno shranjeni v zamrzovalni skrinji pri -80°C . Seve smo s cepilno zanko aseptično nacepili na agar LB in inkubirali 24 h pri 37°C . Po inkubaciji smo eno kolonijo s cepilno zanko prenesli v tekoče gojišče LB in inkubirali preko noči pri 37°C na stresalniku (180 vrtljajev/minuto; New Brunswick Scientific).

3.2.6 Priprava uropatogenih *E. coli*, odpornih proti gentamicinu

3.2.6.1 Izolacija plazmidne DNA z alkalno lizo

V 10 ml tekočega gojišča LB z gentamicinom (15 $\mu\text{g/ml}$ oziroma 25 $\mu\text{g/ml}$) smo nacepili eno kolonijo seva *E. coli* Top10, ki vsebuje plazmid z odpornostjo proti gentamicinu. Kulturo smo inkubirali preko noči pri 37°C s stresanjem (180 vrtljajev/minuto; New Brunswick Scientific). Naslednji dan smo v 500 ml tekočega gojišča LB z gentamicinom prenesli 1 ml prekonočne kulture *E. coli* Top10, nato smo kulturo inkubirali pri 37°C s stresanjem (180 vrtljajev/minuto; New Brunswick Scientific), dokler ta ni dosegla logaritemske faze (optična gostota pri 600 nm je znašala 0,4). Nato smo kulturo eno minuto centrifugirali pri 14.000 vrtljajih/minuto; Eppendorf), odlili supernatant, pelet resuspendirali v pufru za resuspendiranje (raztopina I; Preglednica 5), nato dodali lizni pufer (raztopina II; Preglednica 5) in inkubirali na ledu 5 minut. Liziranim celicam smo dodali ledeno mrzel

puffer za nevtralizacijo (raztopina III; Preglednica 5) in inkubirali še 5 minut na ledu. Sledilo je 10-minutno centrifugiranje pri 4 °C pri 13.000 vrtljajih/minuto (Eppendorf). Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali enak volumen ekstrakcijske zmesi fenola, kloroforma in izoamilalkohola (25:24:1) ter dobro premešali. Nato smo centrifugirali 5 minut pri 14.000 vrtljajih/minuto (Eppendorf) in prenesli zgornjo fazo v novo mikrocentrifugirko. DNA smo oborili z dodatkom 96 % etanola. Sledilo je 10-minutno centrifugiranje pri 4 °C pri 12.000 vrtljajih/minuto (Eppendorf), potem smo odlili supernatant in pelet rahlo sprali s 70 % etanolom. Pelet smo posušili na zraku in ga nato resuspendirali v 25 µL pufra TE (Preglednica 10) z RNazo.

Preglednica 10: Raztopine za izolacijo plazmidne DNA.

Raztopina	Kemijska sestava
Raztopina I	50 mM glukoza, 25 mM Tris HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0)
Raztopina II	200 mM NaOH, 1 % natrijev dodecilsulfat
Raztopina III	5 M kalijev acetat (pH 5,5)
Pufer TE	10 mM Tris HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 100 µg/ml RNaza A

3.2.6.2 Priprava elektrokompetentnih celic *E. coli* in elektroporacija

Elektrokompetentne celice UPEC DL88 in UPEC DL90 smo pripravili tako, da smo 1 ml prekonočne kulture inokulirali v 100 ml tekočega gojišča LB in inkubirali s stresanjem (180 vrtljajev /minuto; New Brunswick Scientific) do $OD_{600}=0,5-0,6$. Kulturo smo ohlajali na ledu 15 minut in jo nato razdelili v dve 50-mililitrski centrifugirki. Sledilo je 20-minutno centrifugiranje pri 5000 ×g pri 4 °C. Nato smo pelet resuspendirali v 1 ml ohlajene sterilne destilirane vode in dopolnili s sterilno destilirano vodo do 45 ml in vorteksirali, da smo odstranili gojišče ter nato centrifugirali 20-minut pri 5000 ×g pri 4 °C (Hettich). To smo ponovili dvakrat. Nato smo pelet resuspendirali v 1 ml 10 % ohlajenega glicerola in nato dodali glicerol do 45 ml ter centrifugirali 20 minut pri 5000 ×g pri 4 °C (Hettich). Pelet smo nato resuspendirali v 400 µl 10 % glicerola, pripravili alikvote in celice shranili pri –80 °C.

Plazmid z odpornostjo proti gentamicinu iz *E. coli* Top10 smo vstavili v UPEC DL88 in UPEC DL90 z elektroporacijo. Najprej smo elektrokompetentnim celicam (40 µl) dodali 2 µl plazmidne DNA in inkubirali 2 minuti na ledu. Mešanico smo nato prenesli v predhodno ohlajeno elektroporacijsko kiveto (Bio-Rad), ki smo jo v elektroporatorju (Eppendorf) izpostavili elektroporaciji pri napetosti 1700 V in časovni konstanti 5 ms. Takoj po elektroporaciji smo celicam dodali 1 ml tekočega gojišča SOC in mešanico prenesli v novo sterilno mikrocentrifugirko ter jo inkubirali pri 37 °C 60 minut s stresanjem. Potem smo kulturo nacepili na trdna gojišča LB z gentamicinom (15 µg/ml oz. 25 µg/ml), ki smo jih inkubirali preko noči pri 37 °C.

3.2.7 Priprava amnijske membrane

3.2.7.1 Krioshranjena amnijska membrana, ki je tekom priprave in shranjevanja prišla v stik z antibiotiki in antimikotikom

V poskusih smo uporabili krioshranjevano AM, ki je bila takoj po porodu sprana s fiziološko raztopino z mešanico antibiotikov (penicilin, streptomycin, neomicin) in antimikotika (amfotericin B). Krioshranjevana AM je bila shranjena pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v raztopini hranilnega medija MEM (*Modified Eagle's Medium*) in glicerola (v razmerju 1:1) ter z dodatkom gentamicina ($25\text{ }\mu\text{g/ml}$). Gre torej za krioshranjevano AM, ki je tekom priprave in shranjevanja prišla v stik z antibiotiki in antimikotikom (kAM+atb). Po odmrznitvi na sobni temperaturi smo kAM+atb skupaj z nitroceluloznim papirjem vzeli iz stekleničke in jo spirali v sterilnem PBS (trikrat po 5 minut) in jo nato razrezali na koščke v velikosti $1 \times 1\text{ cm}^2$.

3.2.7.2 Krioshranjena amnijska membrana, ki tekom priprave in shranjevanja ni prišla v stik z antibiotiki

V poskusih smo uporabili tudi AM, ki je bila takoj po porodu sprana le s sterilnim PBS ter jo shranili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ le v sterilnem PBS (t.i. krioshranjevana AM, ki tekom priprave in shranjevanja ni prišla v stik z antibiotiki in antimikotikom (kAM). kAM smo odmrznili na sobni temperaturi, nato smo jo skupaj z nitroceluloznim papirjem vzeli iz stekleničke in jo spirali v sterilnem PBS (trikrat po 5 minut) in jo nato razrezali na koščke v velikosti $1 \times 1\text{ cm}^2$.

3.2.7.3 Sveža amnijska membrana, ki tekom priprave in shranjevanja ni prišla v stik z antibiotiki

Da bi testirali vpliv krioshranjevanja na protimikrobni učinek AM, smo uporabili tudi svežo AM. Svežo AM so takoj po porodu spirali samo s sterilnim PBS in jo do uporabe shranili pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ le v sterilnem PBS – sveža AM tekom priprave ni prišla v stik z antibiotiki in antimikotikom (svAM). svAM smo spirali v sterilnem PBS (trikrat po 5 minut) in jo nato razrezali na koščke v velikosti $1 \times 1\text{ cm}^2$.

3.2.7.4 Priprava homogenata iz amnijske membrane

Homogenat smo pripravili tako, da smo kAM+atb odmrznili na sobni temperaturi, jo spirali v sterilnem PBS dvakrat po 5 minut in v hranilnem mediju MEM (*Modified Eagle's Medium*) dvakrat po 5 minut. Nato smo jo razrezali na manjše koščke ($0,5\text{ cm} \times 0,5\text{ cm}^2$),

dodali sterilen PBS (štirikratni volumen količine AM) in jo homogenizirali v mešalniku (Russell Hobbs Kitchen Mix&Go blender 21350-56, 300 W) pol minute. Homogenat smo shranili v zamrzovalni skrinji pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Homogenat iz kAM smo pripravili tako, da smo AM takoj po porodu spirali s sterilnim PBS, jo razrezali na manjše koščke ($0,5\text{ cm} \times 0,5\text{ cm}^2$) in jo homogenizirali v mešalniku (Russell Hobbs Kitchen Mix&Go blender 21350-56, 300 W) pol minute. Homogenat smo shranili v mikrocentrifugirkah pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.8 Testiranje sterilnosti amnijske membrane

Sterilnost AM smo testirali tako, da smo nanесли košček ($1 \times 1\text{ cm}^2$) kAM+atb, kAM oziroma svAM na sterilen trdni agar Mueller-Hinton in agarne plošče inkubirali 24 ur pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.9 Ugotavljanje protimikrobnega učinka amnijske membrane z metodo izpostavitve v tekočem gojišču

Pripravili smo sterilno gojišče LB v epruvetah (10 ml) in v vsako epruveto aseptično prenesli 1 košček kAM+atb ali kAM ($1 \times 1\text{ cm}^2$). Nato smo gojišče inokulirali z izbrano koncentracijo bakterij *E. coli* DH5 α oziroma UPEC DL90 ($10^2 / 10^3 / 10^7 / 10^8\text{ CFU/ml}$) in epruvete inkubirali pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 24 ur, brez stresanja. Po inkubaciji smo vsem vzorcem s spektrofotometrom izmerili optično gostoto pri 600 nm in določili koncentracijo bakterij v vzorcu. Kontrolne vzorce smo pripravili tako, da smo sterilno gojišče LB (10 ml) brez AM inokulirali z ustrezno koncentracijo bakterij *E. coli* DH5 α oziroma UPEC DL90 ($10^2 / 10^3 / 10^7 / 10^8\text{ CFU/ml}$).

3.2.10 Ugotavljanje protimikrobnega učinka amnijske membrane z difuzijsko metodo

3.2.10.1 Difuzijska metoda s koščkom amnijske membrane v mehkem agarju

Pripravili smo sterilen trdni agar Mueller-Hinton in na petrijevke najprej aseptično nanесли košček kAM+atb, kAM ali svAM ($1 \times 1\text{ cm}^2$). Potem smo mehki agar Mueller-Hinton raztopili s kuhanjem (10 minut pri $100\text{ }^{\circ}\text{C}$) in ga ohladili na primerno temperaturo ($48\text{ }^{\circ}\text{C}$) v termobloku (Krokter). Nato smo inokulirali 4 ml mehkega agarja Mueller-Hinton z ustrezno koncentracijo bakterij (100 μl prekonočne kulture) in ga počasi razlili po trdnem agarju Mueller-Hinton z AM. Agarne plošče smo nato inkubirali pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 24 ur.

3.2.10.2 Difuzijska metoda s koščkom amnijske membrane na trdnem agarju

Pripravili smo sterilen trdni agar Mueller-Hinton in na gojišče nanesti 100 µL bakterijske kulture, ki smo jo razmazali z uporabo sterilnih kroglic. Nato smo na agarno ploščo položili košček kAM+atb ($1 \times 1 \text{ cm}^2$) in ploščo inkubirali pri 37 °C 24 ur. Da bi preverili učinek spiranja v PBS na protimikrobno delovanje AM, smo uporabili AM, ki smo jo na agarno ploščo prenesli direktno iz gojišča za zamrzovanje (brez spiranja v PBS) in AM, ki smo jo spirali 5 oziroma 15 minut v PBS.

3.2.10.3 Difuzijska metoda s homogenatom iz amnijske membrane

Mehki agar Mueller-Hinton smo najprej raztopili s kuhanjem (10 minut pri 100 °C) in ga ohladili na primerno temperaturo (48 °C) v termobloku (Krokter). Nato smo inokulirali 4 ml mehkega agarja Mueller-Hinton z ustrezno količino bakterij (100 µL prekonočne kulture) in ga počasi razlili po trdnem agarju Mueller-Hinton. Po približno 15 minutah smo na ploščo nanesti po 5 µl oziroma po 10 µl homogenata iz kAM+atb ali kAM. Agarne plošče smo nato inkubirali pri 37 °C 24 ur.

3.2.11 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije za gentamicin

Pripravili smo tekoče gojišče LB z različnimi koncentracijami gentamicina (0,78 µg/ml, 1,56 µg/ml, 3,12 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,50 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml) in v epruvete z 10 ml gojišča LB z gentamicinom nacepili 100 µl izbrane prekonočne kulture. Epruvete smo inkubirali na stresalniku (180 vrtljajev/minuto; New Brunswick Scientific) 24 ur. Po inkubaciji smo ovrednotili, katera je minimalna inhibitorna koncentracija gentamicina za inhibicijo posamezne bakterijske kulture.

3.2.12 Statistična analiza testiranja protimikrobnega učinka amnijske membrane z metodo izpostavitve v tekočem gojišču

Statistično analizo smo izvedli z računalniškim programom Excel (Microsoft, 2013). Analizirali smo rezultate testiranja protimikrobnega učinka AM z metodo izpostavitve v tekočem gojišču in izračunali povprečno število bakterij v gojišču, standardni odklon in standardno napako. S Studentovim T-testom smo preverili ali so razlike v protimikrobnem učinku različnih AM statistično značilne pri tveganju $p = 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 PROTIRAKAVO DELOVANJE AMNIJSKE MEMBRANE

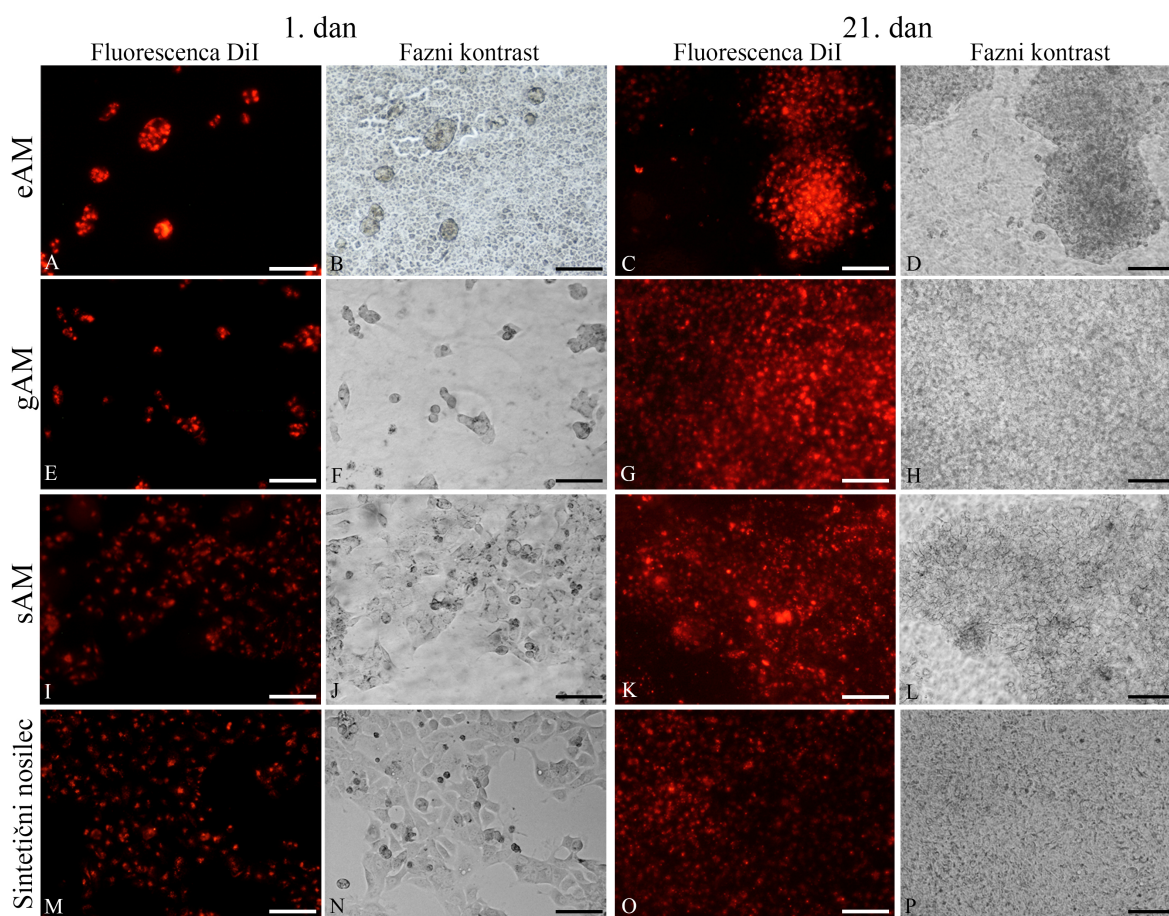
4.1.1 Vzpostavitev konstruktov celic RT4 na različnih nosilcih iz amnijske membrane in na sintetičnem nosilcu

V poskusih smo uporabljali krioshranjevano AM, ki je bila shranjena v mediju za zamrzovanje (50 % MEM (Modified Eagle Medium, Gibco), 50 % glicerol, 25 µg/ml gentamicin) na -80 °C in je tekom priprave ter shranjevanja prišla v stik z antibiotiki ter antimikotikom (kAM+atb). AM je po odmrznitvi ohranila ustrezno histološko strukturo.

Rakave celice RT4 smo nasadili na (1.) epitelij AM (eAM), na (2.) bazalno lamino AM, t.i. golo AM (gAM) ali na (3.) vezivno tkivo (stromo) AM (sAM). Glede na to, na katero strukturo AM smo nasadili rakave celice RT4, smo poimenovali tudi tri nosilce iz AM (eAM, gAM in sAM). Za kontrolne vzorce smo rakave celice RT4 nasadili na sintetične nosilce. Rast celic RT4 na nosilcih iz AM in na sintetičnih nosilcih smo spremljali 3 tedne s fluorescenčno, faznokontrastno in klasično svetlobno mikroskopijo.

4.1.2 Fluorescentno označevanje membran celic RT4 s fluorescentnim barvilom DiI

Celice RT4, označene s fluorescentnim barvilo DiI, se po izgledu, hitrosti rasti ali drugih fizioloških lastnostih niso razlikovale od neoznačenih celic (rezultati niso prikazani). Barvilo je zelo obstojno, saj se je fluorescenca ohranila skozi celoten 3-tedenski poskus (Slika 11).

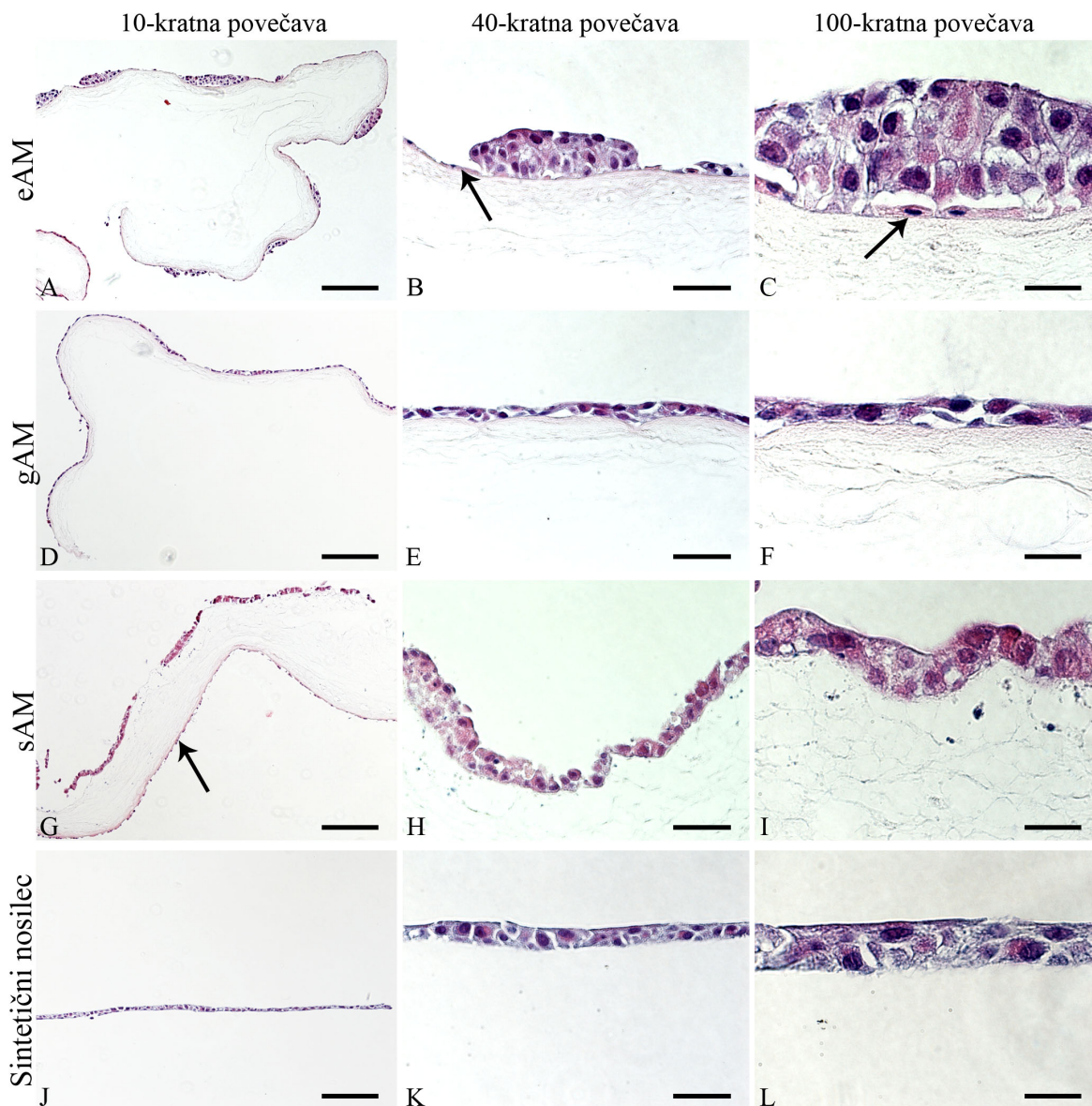


Slika 11: Fluorescenčna in faznokontrastna mikroskopija celic RT4 (označenih z barvilom DiI) na nosilcih iz AM in na sintetičnem nosilcu 1. in 21. dan poskusa. (A, B) Fluorescenčna in faznokontrastna mikroskopija celic RT4 na nosilcu eAM prvi dan oziroma (C, D) 21. dan poskusa. (E, F) Fluorescenčna in faznokontrastna mikroskopija celic RT4 na nosilcu gAM prvi dan oziroma (G, H) 21. dan poskusa. (I, J) Fluorescenčna in faznokontrastna mikroskopija celic RT4 na nosilcu sAM prvi dan oziroma (K, L) 21. dan poskusa. (M, N) Fluorescenčna in faznokontrastna mikroskopija celic RT4 na sintetičnem nosilcu prvi dan oziroma (O, P) 21. dan poskusa. Merilca: 100 μ m.

4.1.3 Histološka analiza konstruktov celic RT4 na različnih nosilcih iz amnijske membrane in na sintetičnem nosilcu

Histološka analiza parafinskih rezin je pokazala, da so celice RT4 rastle na nosilcu eAM v obliki posameznih papilomov, ki so bili zgrajeni iz treh do petih plasti celic. Papilomi so bili posamezni in so preraščali manj kot polovico nosilca eAM. Celice RT4, rastoče na nosilcu eAM, so bile poligonalnih in kubičnih oblik (Slika 12A-C, Slika 13A) in med seboj dobro povezane. Rakave celice so se na nosilcu eAM pritrdile na bazalno lamino, kjer so bile AEC odstranjene, le izjemoma so se pritrdile tudi na AEC. Na gAM so bile celice RT4 kubične ali ploščate oblike in so rastle v eni do dveh plasteh (Slika 12D-F, Slika 13B). Na sAM so bile celice kubične oblike in so rastle v eni do treh plasteh ter so bile med sabo dobro

povezane (Slika 12G-I, Slika 13C). Celice RT4, rastoče na sintetičnem nosilcu so tvorile dvo- do triplasten epitelij (Slika 12J-L, Slika 13D).



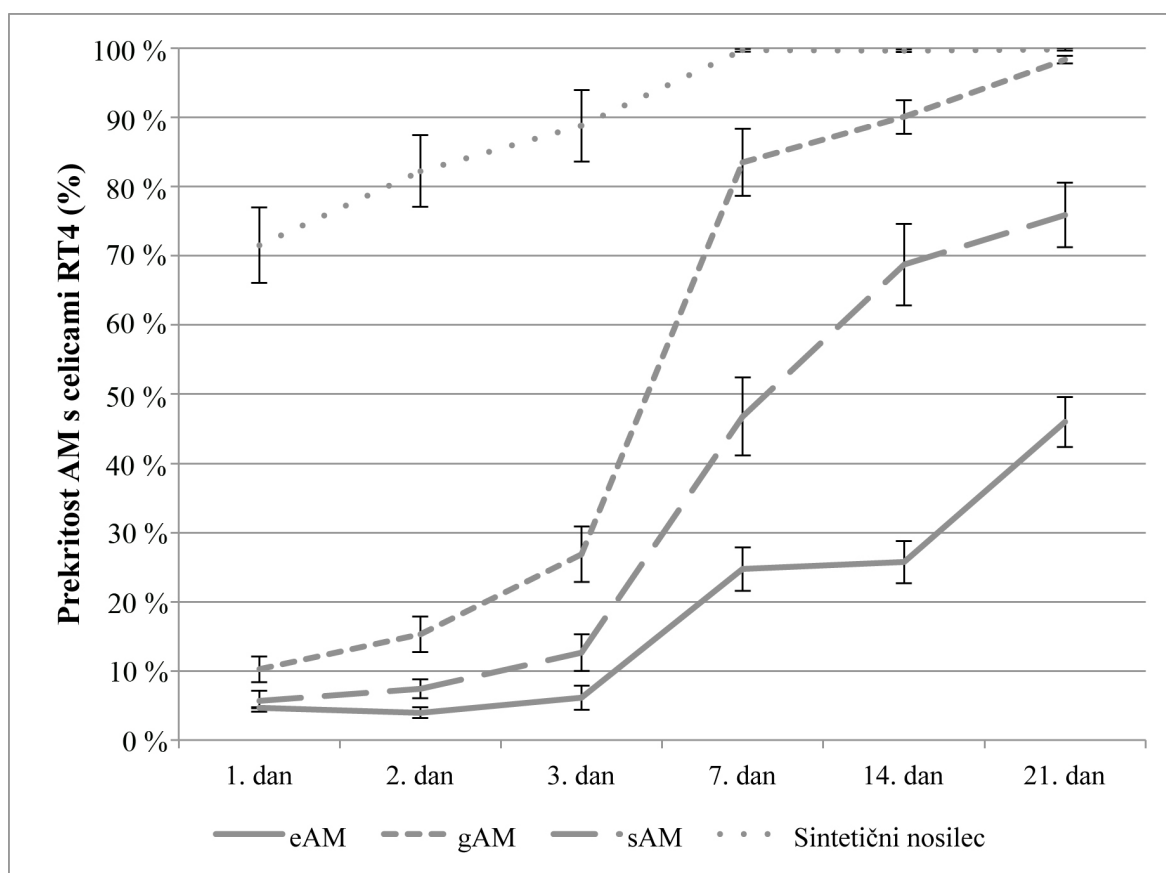
Slika 12: Parafinske rezine celic RT4 na nosilcih iz AM in na sintetičnem nosilcu, barvane s hematoksilinom in eozinom. (A-C) Celice RT4 na eAM. (D-F) Celice RT4 na gAM. (G-I) Celice RT4 na sAM. (J-L) Celice RT4 na sintetičnem nosilcu. Puščica – AEC. Merilca: (A, D, G, J) 200 μ m, (B, E, H, K) 50 μ m, (C, F, I, L) 20 μ m.

4.1.4 Dinamika rasti celic RT4 na nosilcih iz amnijske membrane in na sintetičnem nosilcu

Rast rakavih celic RT4 smo spremljali 3 tedne s fluorescenčno in faznokontrastno mikroskopijo. Rezultati kažejo, da rast rakavih celic RT4 najbolj zavira nosilec eAM.

Odstotek preraščenosti nosilcev iz AM in sintetičnega nosilca s celicami RT4, preračunan kot povprečje vseh meritev (vseh nosilcev in vseh dni skupaj) za posamezen nosilec, je za eAM 18,52 %, za gAM 54,04 %, za sAM 36,18 % in za sintetični nosilec 90,29 %.

Na Sliki 13 in v Prilogi A so podani rezultati spremljanja preraščenosti nosilcev iz AM in sintetičnega nosilca s celicami RT4, in sicer za 1., 2., 3., 7., 14. in 21. dan poskusa. Rezultati so podani v obliki odstotka preraščenosti nosilcev s celicami RT4 in standardne napake. Med rastjo celic RT4 na nosilcih iz AM in rastjo na sintetičnem nosilcu je statistično značilna razlika ($p < 0,001$). Statistična analiza je predstavljena v prilogi B.

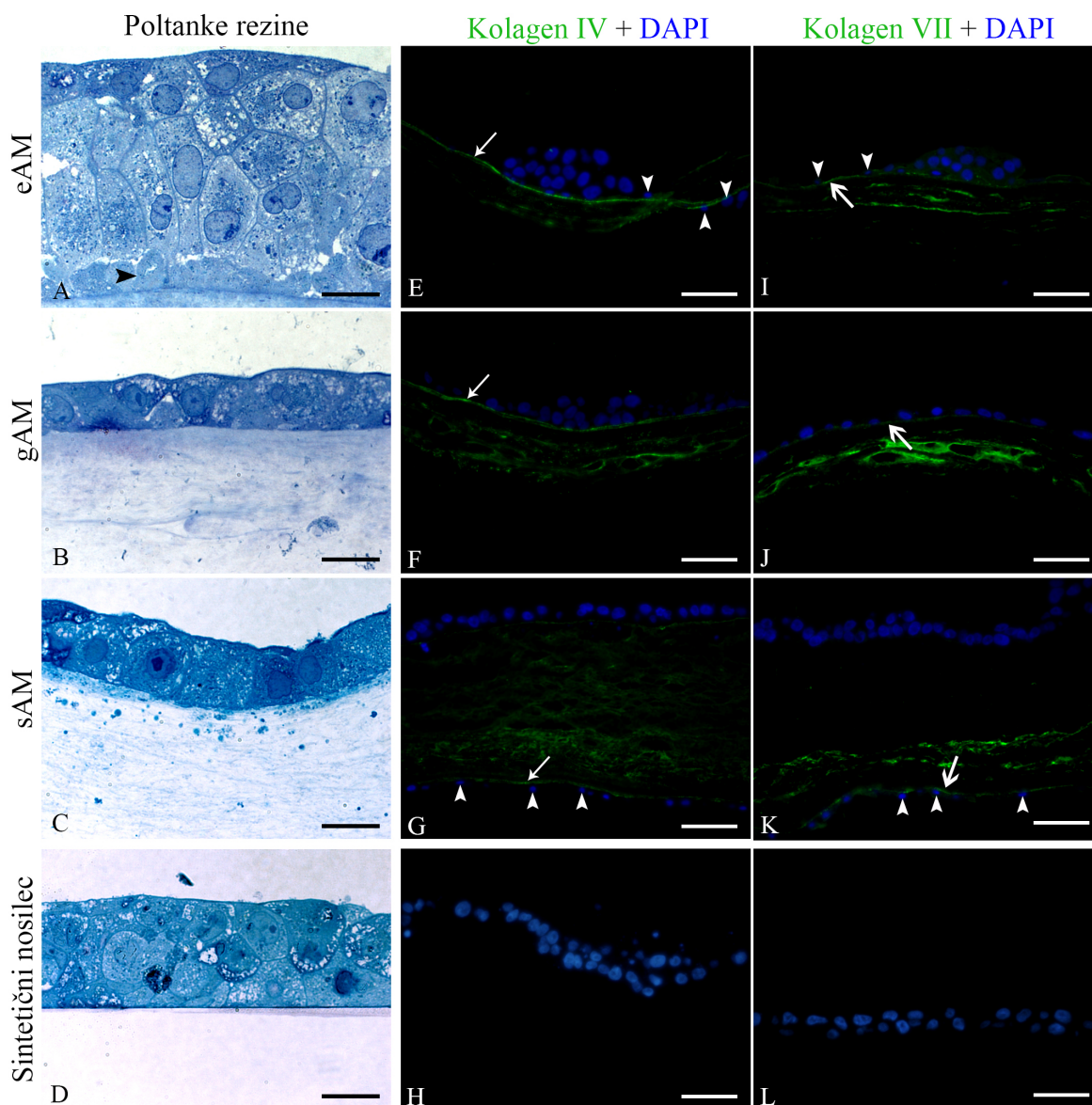


Slika 13: Primerjava dinamike rasti celic RT4 na nosilcih iz AM in na sintetičnem nosilcu v 3 tednih trajanja poskusa. Rezultati so podani v obliki odstotka prekritosti nosilca iz AM s celicami RT4 na izbrani dan poskusa in pripadajočimi standardnimi napakami. Razlike med rastjo celic RT4 na nosilcih iz AM in sintetičnem nosilcem so statistično značilne ($p < 0,05$).

4.1.5 Proteinska sestava bazalne lamine v konstruktih celic RT4 na nosilcih iz amnijske membrane

4.1.5.1 Imunofluorescenca kolagena IV in kolagena VII

Z imunofluorescenco kolagena IV in kolagena VII smo dokazali, da je bazalna lamina amnijske membrane ostala pri vseh nosilcih iz AM intaktna. Kolagen IV (Slika 14E-H) in kolagen VII (Slika 14I-L) sta se izražala v kontinuirani liniji v področju bazalne lamine na vseh treh nosilcih. Poltanke rezine obenem dokazujejo, da rakave celice RT4 tudi niso migrirale skozi bazalno lamino v nižje ležeče vezivno tkivo AM (Slika 14A-D). Rezultati imunooznačevanja kolagena IV in kolagena VII na sintetičnem nosilcu so negativni, saj smo v tem primeru na sintetične nosilce nasadili samo celice RT4 in bazalna lamina ni prisotna oziroma se niti ni na novo sintetizirala (Slika 14H, 14L).

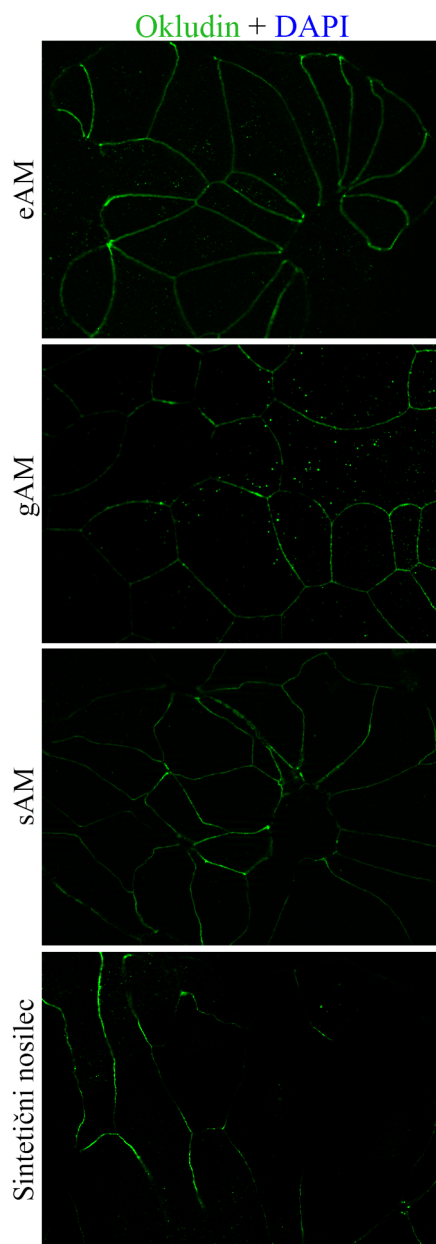


Slika 14: Celice RT4 na nosilcih iz AM in na sintetičnem nosilcu. (A-D) Poltanke rezine konstruktov celic RT4 na nosilcih iz AM in na sintetičnem nosilcu, barvane s toluidinskim modrilom. (A) Na eAM v področju hiperplastične papilomske rasti. (E-H) Imunofluorescenca kolagena IV na parafinskih rezinah. (I-L) Imunofluorescenca kolagena VII na parafinskih rezinah. Kolagen IV oz. kolagen VII – puščica in zelena barva, jedra – modra barva (DAPI), AEC – glave puščic. Merilca: (A-D) 20 μ m, (E-L) 50 μ m.

4.1.6 Vpliv amnijske membrane na izražanje stičnih proteinov celic RT4

4.1.6.1 Imunofluorescenca okludina

Okludin je protein tesnih stikov in je značilen za normalne urotelijske celice. Celice RT4, rastoče na nosilcih iz AM, so izražale okludin apikalno-lateralno v zveznih linijah med sosednjimi celicami (Slika 15A-C). Izražanje okludina v celicah RT4, rastočih na sintetičnih nosilcih, je bilo šibkejš, saj je le določen delež celic RT4 izražal okludin (Slika 15D).

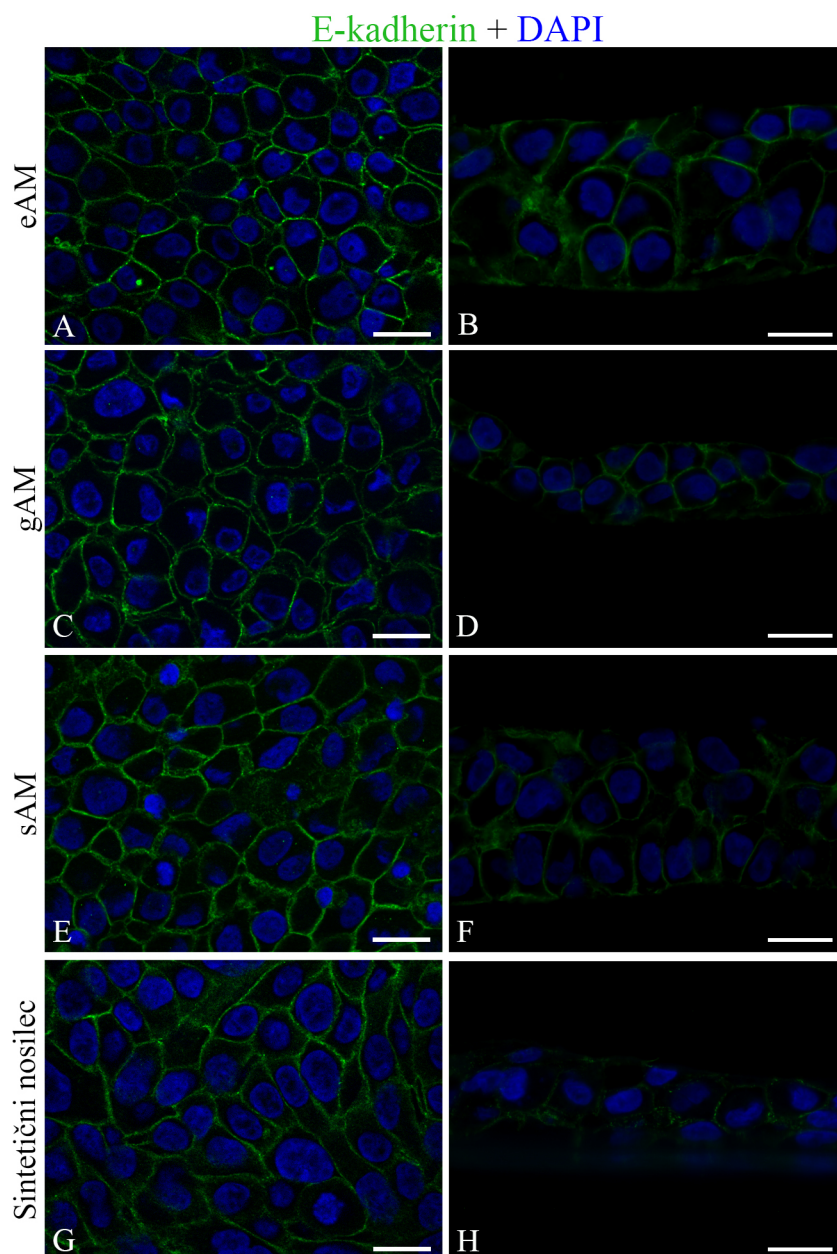


Slika 15: Imunofluorescenca okludina v celicah RT4 pri rasti na nosilcih (A) eAM, (B) gAM, (C) sAM in na (D) sintetičnem nosilcu. Okludin – zelena barva. Merilca: 20 μ m.

4.1.6.2 Imunofluorescenca E-kadherina

E-kadherin je protein adherentnih stikov in je značilen za normalne urotelijske celice. Izražanje E-kadherina v celicah RT4 se je razlikovalo glede na tip nosilca, ki smo ga uporabili. V apikalnem pogledu vidimo, da so pri rasti na nosilcih iz AM celice RT4 izražale E-kadherin v kontinuiranih linijah, lateralno na mejah med sosednjimi celicami (Slika 16A-F). Pri rasti na sintetičnem nosilcu so celice RT4 izražale E-kadherin sicer še vedno v bolj ali manj kontinuiranih linijah (Slika 16G, H), a je bilo izražanje E-kadherina pri rasti na

sintetičnem nosilcu šibkejšje v primerjavi z izražanjem v celicah RT4, rastočih na nosilcih iz AM. To je še posebej razvidno iz slik imunooznačevanja E-kadherina na parafinskih rezinah v prečnem prerezu (Slika 16B, 16D, 16F, 16H).

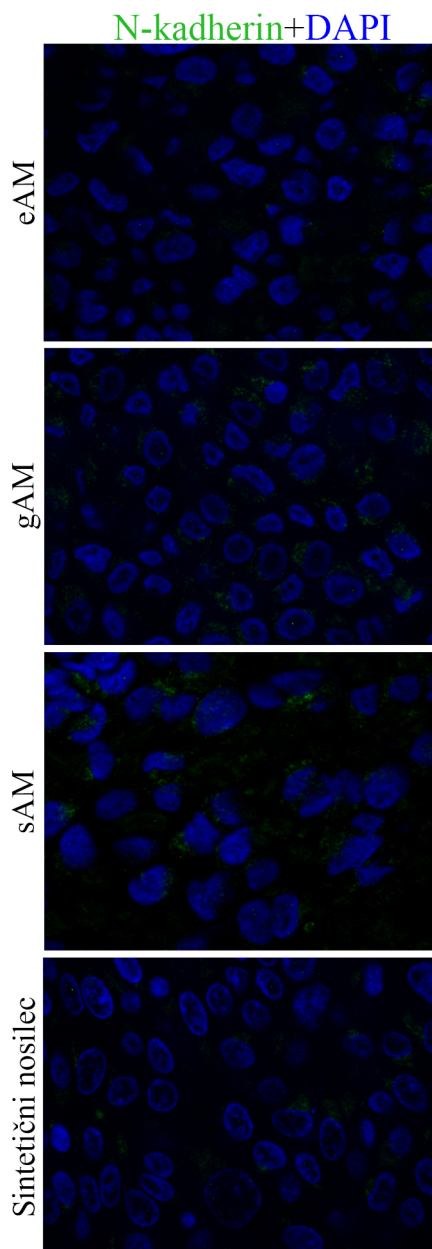


Slika 16: Imunofluorescenca E-kadherina v celicah RT4 pri rasti na nosilcih (A) eAM, (B) gAM, (C) sAM in na (D) sintetičnem nosilcu. E-kadherin – zelena barva, jedra – modra barva (DAPI). Merilca: 20 μ m.

4.1.6.3 Imunofluorescenca N-kadherina

N-kadherin je mezenhimski označevalec, protein adherentnih stikov, ki je značilen za maligne rakave urotelijske celice. Celice RT4 ga niso izražale niti pri rasti na sintetičnem

nosilcu (Slika 17D), niti pri rasti na nosilcih iz AM (Slika 17A-C), kar potrjuje neinvazivno naravo celic RT4.



Slika 17: Imunofluorescenca N-kadherina v celicah RT4 pri rasti na nosilcih (A) eAM, (B) gAM, (C) sAM in na (D) sintetičnem nosilcu. N-kadherin – zelena barva, jedra – modra barva (DAPI). Merilca: 20 μ m.

4.1.7 Vzpostavitev konstruktov kokultur rakavih in normalnih urotelijskih celic na nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu

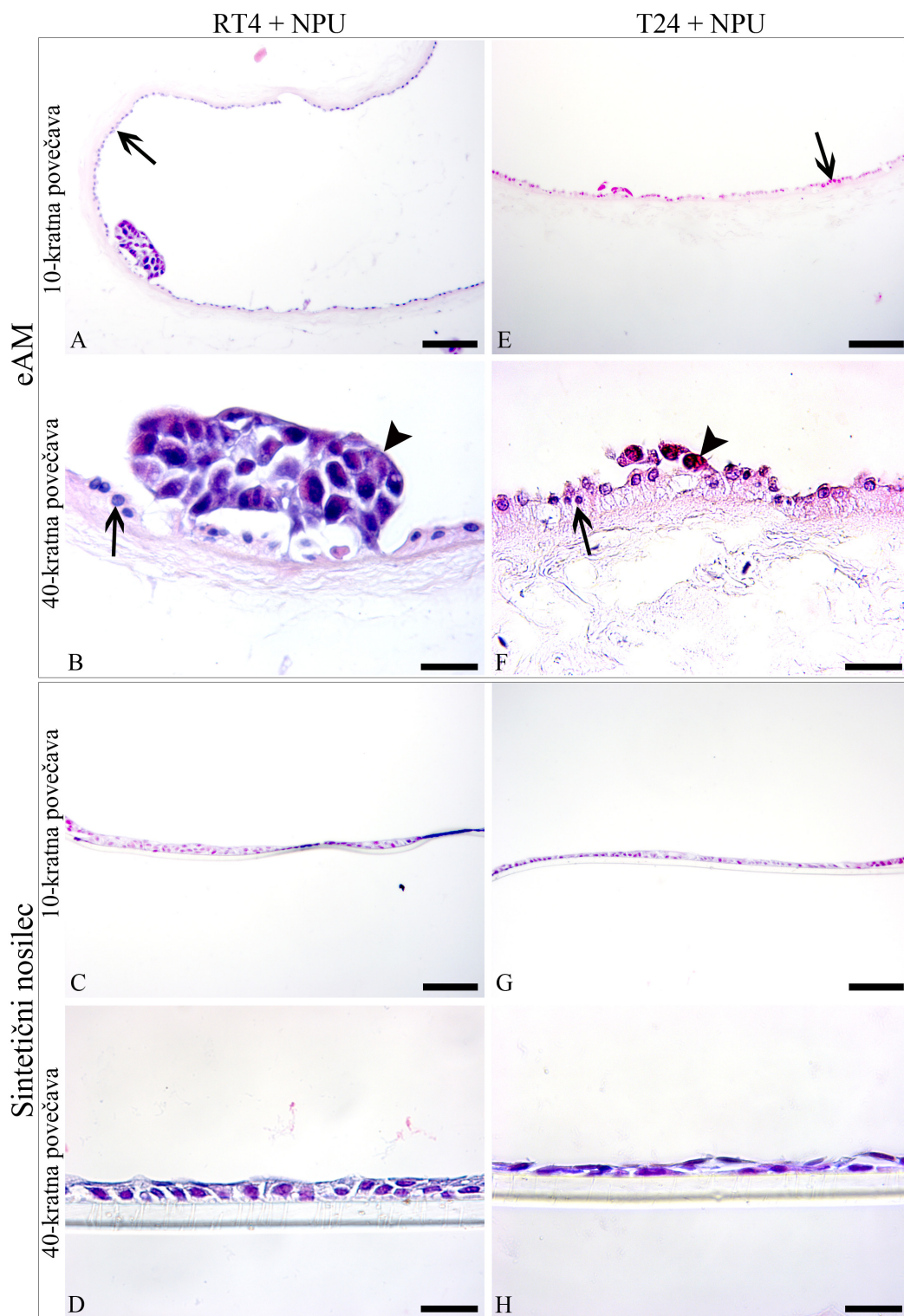
Z namenom proučevanja vpliva AM na dinamiko rasti rakavih in normalnih urotelijskih celic v kokulturi, smo vzpostavili konstrukte kokultur rakavih in normalnih urotelijskih celic na

nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu. Rakave celice RT4, ki izvirajo iz urotelijskega papiloma oziroma rakave celice T24, ki izvirajo iz urotelijskega karcinoma in normalne prašičje urotelijske celice (celice NPU) smo nasadili na epitelij AM (eAM). Nosilec eAM smo izbrali na podlagi prejšnjih poskusov, kjer se je izkazalo, da med nosilci iz AM, eAM najboljše zavira rast rakavih celic RT4 in T24. Za kontrolni vzorec smo rakave celice RT4 oziroma T24 in celice NPU nasadili na sintetični nosilec. Rast celic smo spremljali 7 dni.

Celic T24, RT4 in NPU z uporabo histološkega barvanja ni bilo mogoče ločiti med sabo, zato bo pri nadaljenjem delu potrebno identificirati ustrezne celične markerje, na podlagi katerih bomo lahko ločili posamezne celice med sabo (npr. imunooznačevanje E-kadherina in N-kadherina v primeru kokulture celic T24 in NPU, kjer celice T24 izražajo le N-kadherin in ne izražajo E-kadherina, medtem ko za celice NPU drži ravno obratno).

Na nosilcu eAM s kokulturo celic RT4 in NPU, so celice rastle v obliki posameznih papilomov, ki so bili zgrajeni iz štiri do osem plasti celic. Bile so poligonalne oblike, med njimi so vidni medcelični prostori (Slika 18A, 18B). Na nosilcu eAM s kokulturo celic T24 in NPU, so celice na nosilcu rastle v obliki posameznih celic ali celičnih skupkov. Bile so poligonalne oblike (Slika 18E, 18F). Rakave celice so na nosilcu eAM rastle na mestih, kjer so bile AEC odstranjene, le izjemoma so se pritrdile tudi na AEC.

Na sintetičnem nosilcu s kokulturo celic RT4 in NPU (Slika 18C, 18D), so celice rastle v eni do treh plasteh, bile so kubične oblike. Na sintetičnem nosilcu s kokulturo celic T24 in NPU (Slika 18G, 18H), so celice rastle v eni do treh plasteh, bile so ploščate oblike.

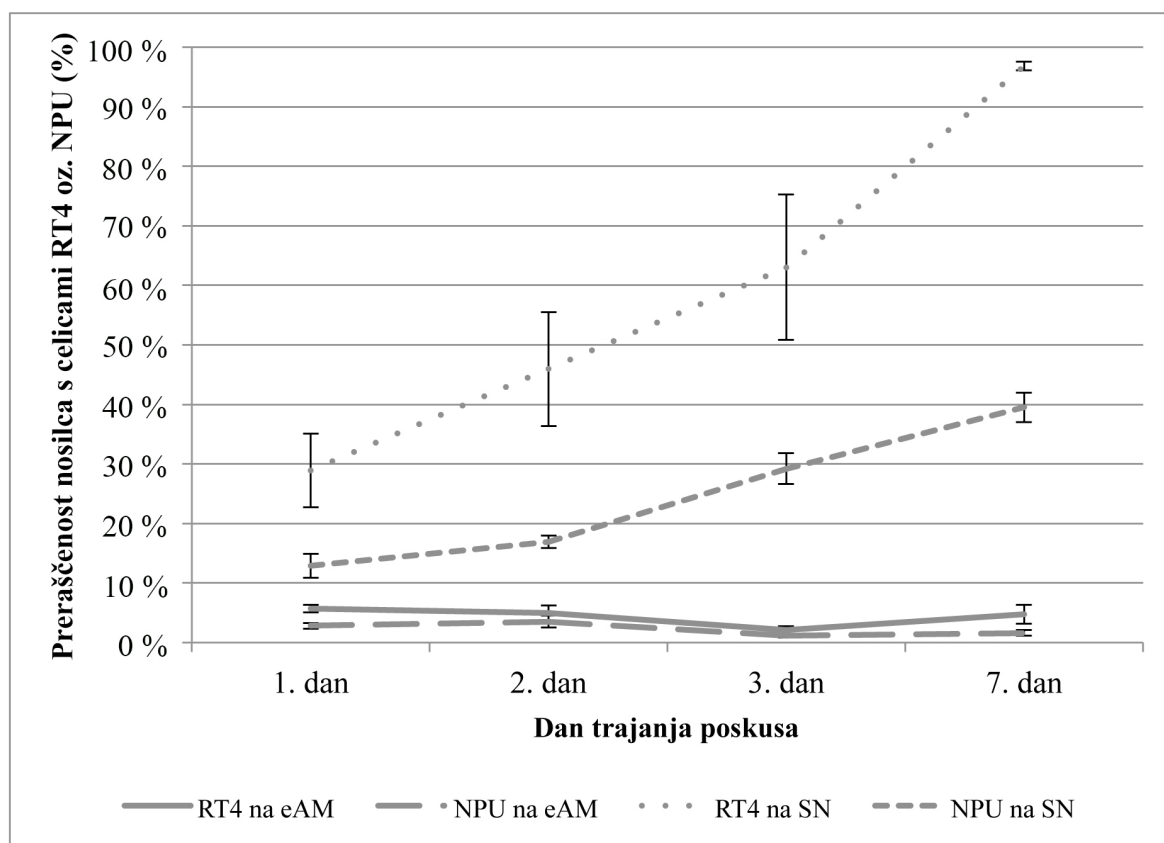


Slika 18: Parafinske rezine kokultur rakavih in normalnih urotelijskih celic po 7 dneh gojenja na nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu, barvane s hematoksilinom in eozinom. (A, B) Kokultura celic RT4 in NPU na eAM. (C, D) Kokultura celic RT4 in NPU na sintetičnem nosilcu. (E, F) Kokultura celic T24 in NPU na eAM. (G, H) Kokultura celic T24 in NPU na sintetičnem nosilcu. Puščice – AEC; glave puščic – rakave celice. Merilca (A, C, E, G) 50 μ m, (B, D, F, H) 20 μ m.

4.1.7.1 Dinamika rasti kokulture normalnih in rakavih urotelijskih celic na nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu

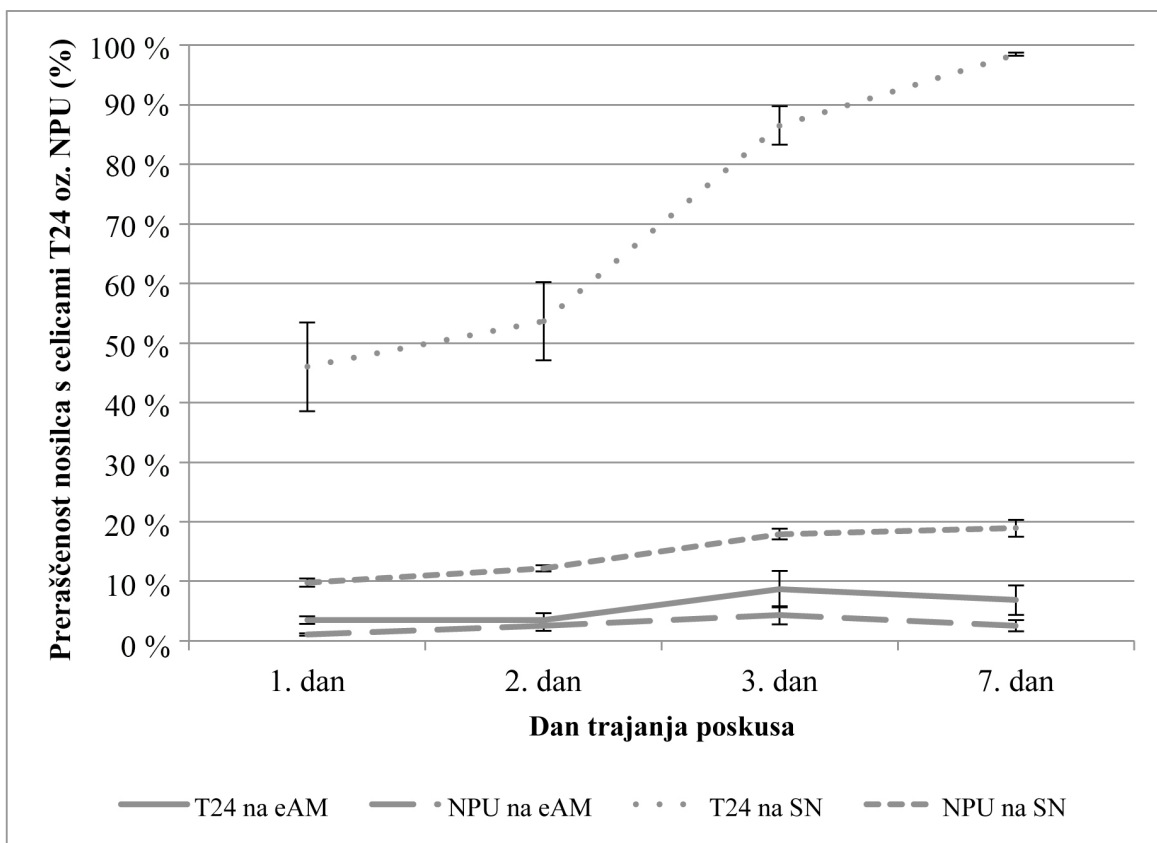
Rast kokulture rakavih in normalnih celic smo spremljali 7 dni. V Slikah 19 in 20 ter v Prilogi C so podani rezultati spremljanja preraščenosti nosilcev iz AM in sintetičnega nosilca s celicami RT4 oziroma T24 in NPU, in sicer za 1., 2., 3. in 7. dan poskusa. Rezultati so podani v obliki odstotka preraščenosti nosilcev s celicami RT4, T24 in NPU ter standardne napake. Razlika med rastjo celic RT4 oziroma T24 in NPU na nosilcu iz eAM v primerjavi z rastjo na sintetičnem nosilcu je statistično značilna ($p < 0,001$). Statistična analiza je predstavljena v prilogi D.

Odstotek preraščenosti nosilca eAM in sintetičnega nosilca s celicami RT4 in NPU, preračunan kot povprečje vseh meritev (vseh nosilcev za vse dni skupaj) za posamezen nosilec, je 4,38 % za RT4 na eAM, 2,29 % za NPU na eAM, 58,70 % za RT4 na sintetičnem nosilcu in 24,65 % za NPU na sintetičnem nosilcu.



Slika 19: Primerjava rasti celic RT4 in NPU v kokulturi na nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu. Rezultati so podani v obliki odstotka preraščenosti nosilca eAM ali sintetičnega nosilca s celicami RT4 ali NPU ter s pripadajočimi standardnimi napakami.

Odstotek preraščenosti nosilca eAM in sintetičnega nosilca s celicami T24 in NPU, preračunan kot povprečje vseh meritev (vseh nosilcev za vse dni skupaj) za posamezen nosilec, je 5,62 % za T24 na eAM, 2,61 % za NPU eAM, 71,17 % za na sintetičnem nosilcu in 14,68 % za NPU na sintetičnem nosilcu. Rast celic RT4 in T24 je v kokulturi signifikantno slabša, kot če so rastle v monokulturi na sintetičnem nosilcu (Železnik, 2014). Ti rezultati dokazujejo inhibitorni učinek eAM na rast celic NPU, T24 in RT4.

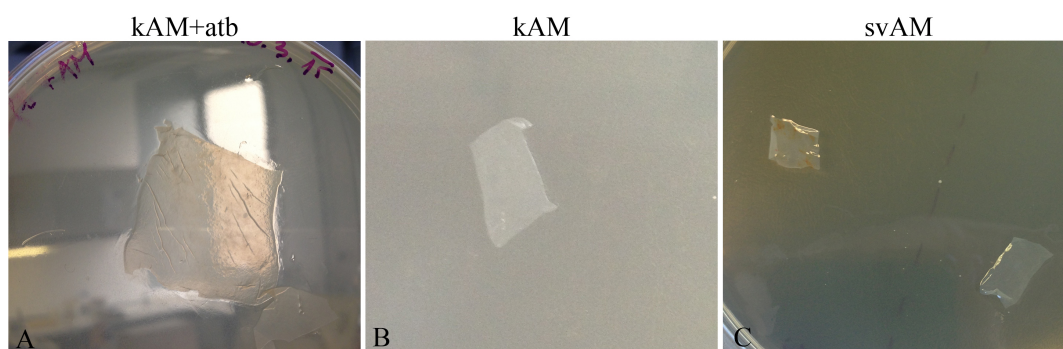


Slika 20: Primerjava rasti celic T24 in NPU v kokulturi na nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu. Rezultati so podani v obliki odstotka preraščenosti nosilca eAM ali sintetičnega nosilca s celicami T24 ali NPU ter s pripadajočimi standardnimi napakami.

4.2 PROTIMIKROBNO DELOVANJE AMNIJSKE MEMBRANE

4.2.1 Ugotavljanje sterilnosti amnijske membrane

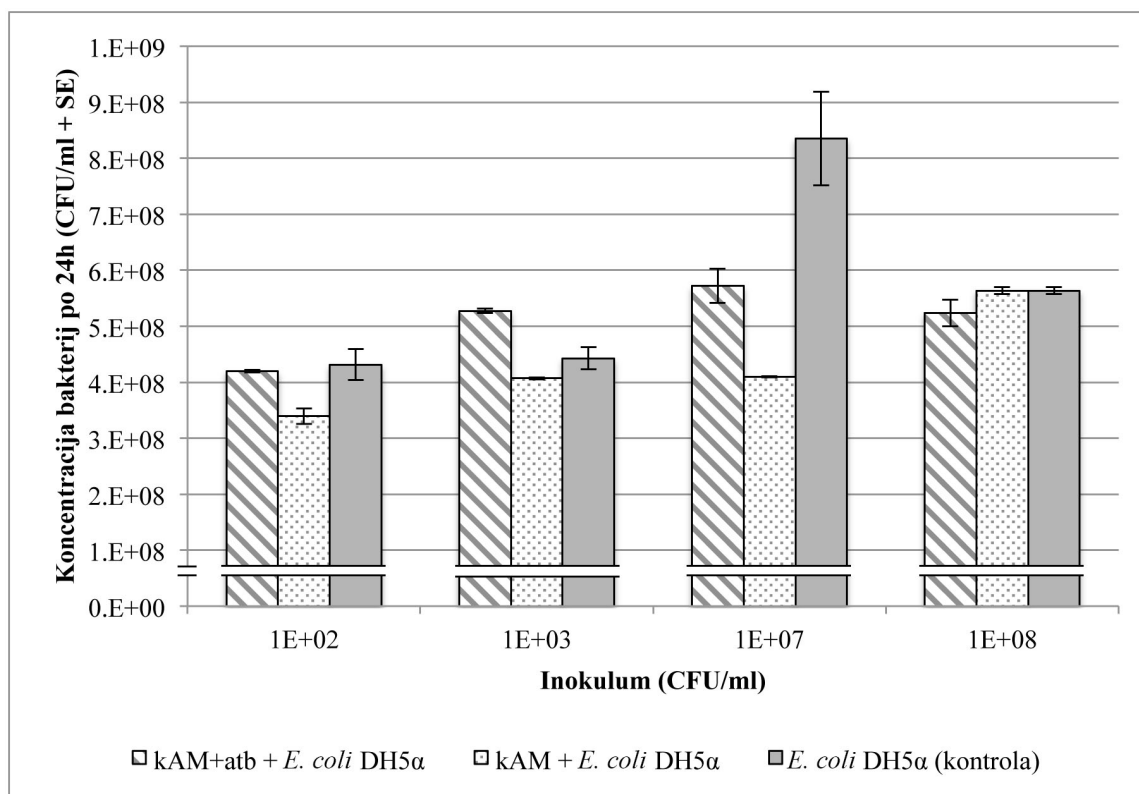
Preverili smo sterilnost krioshranjevalne AM, ki je tekom priprave in shranjevanja prišla v stik z antibiotiki in antimikotikom (kAM+atb) in krioshranjevanje AM (kAM) ter sveže AM (svAM), ki tekom priprave in shranjevanja nista prišli v stik z antibiotiki in antimikotikom. Pokazali smo, da je bila AM po odmrzovanju in spiranju v vseh treh primerih sterilna (Slika 21).



Slika 21: Test sterilnosti (A) kAM+atb, (B) kAM in (C) svAM.

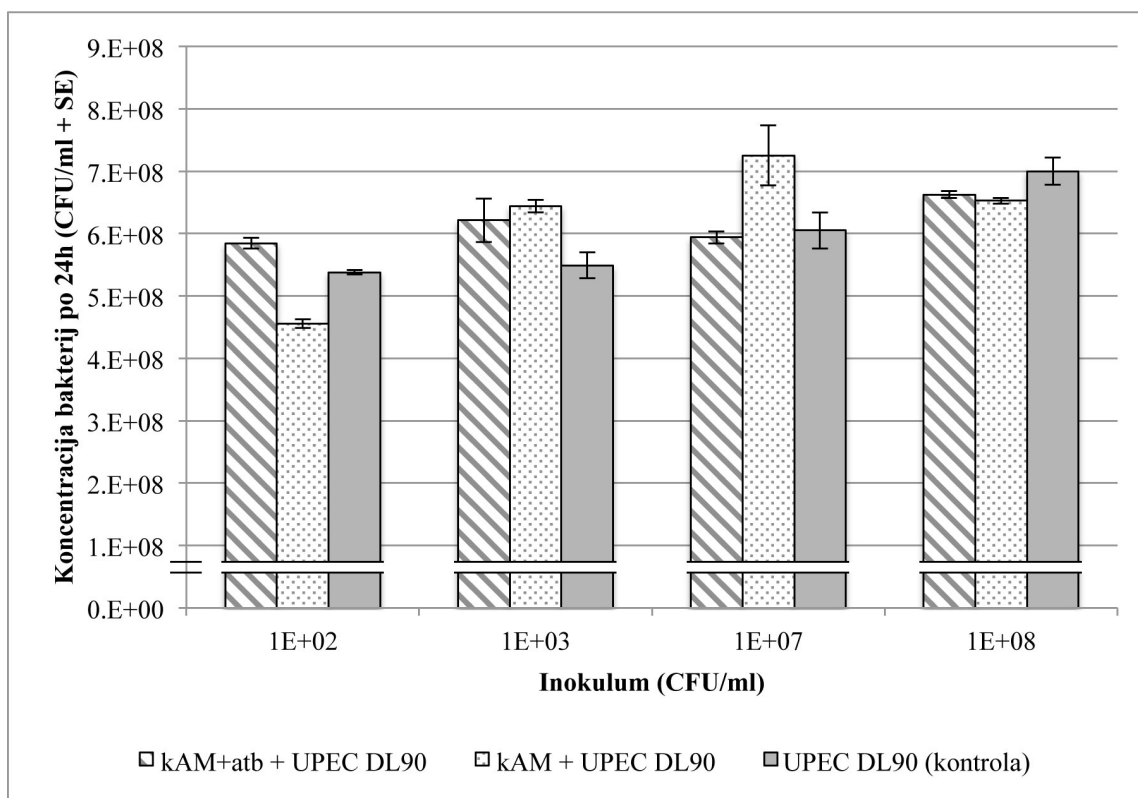
4.2.2 Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti amnijske membrane z metodo izpostavitve v tekočem gojišču

Najprej smo testirali učinek AM na rast laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α v tekočem gojišču LB. Po 24-urni inkubaciji ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji bakterij med testnimi vzorci, kjer je bila prisotna AM in kontrolnimi vzorci brez AM, ne glede na količino inokuluma bakterij ($p > 0,05$). Prav tako ni bilo statistično značilnih razlik med koncentracijo bakterij v prisotnosti kAM+atb ali kAM ($p > 0,05$) (Slika 22). Statistična analiza je predstavljena v prilogi B.



Slika 22: Rast *E. coli* DH5 α v tekočem gojišču LB s kAM+atb, kAM in brez AM. Razlike med vzorci niso statistično značilne ($p > 0,05$).

Nato smo testirali učinek AM na rast UPEC DL90 in ugotovili, da tudi v tem primeru ni bilo statistično značilnih razlik med testnimi vzorci, kjer so bile bakterije izpostavljene AM in kontrolnimi vzorci brez AM ($p > 0,05$). Prav tako ni bilo razlik glede na količino inokuluma bakterij. Razlike med med testnimi vzorci s kAM+atb in kAM so bile statistično neznailne ($p > 0,05$) (Slika 23). Statistična analiza je predstavljena v prilogi B.



Slika 23: Rast UPEC DL90 v tekočem gojišču LB s kAM+atb, kAM in brez AM. Razlike med vzorci niso statistično značilne ($p > 0,05$).

4.2.3 Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti amnijske membrane z difuzijsko metodo s koščkom AM v mehkem agarju

4.2.3.1 Krioshranjevana amnijska membrana, ki je tekom priprave in shranjevanja prišla v stik z antibiotiki

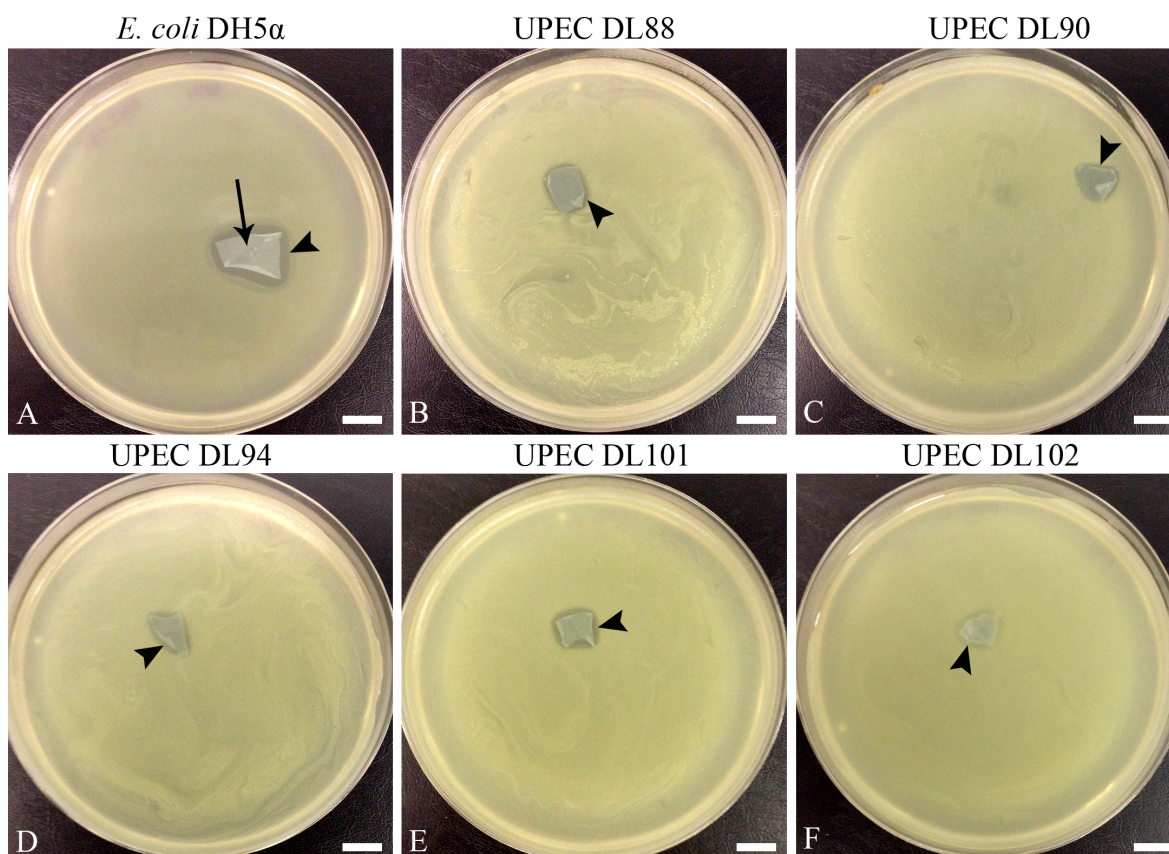
V poskusih smo uporabili kAM+atb, ki je tekom priprave prišla v stik z antibiotiki (penicilin, streptomycin, neomicin) in antimikotikom (amfotericin B) ter je bila shranjena pri -80°C v mediju za zamrzovanje (50 % glicerol, 50 % MEM (Modified Eagle Medium) z antibiotikom (gentamicin, 25 $\mu\text{g/ml}$). Na sterilni trdni agar Mueller-Hinton smo najprej aseptično nanesti košček kAM+atb, potem smo mehki agar Mueller-Hinton inokulirali z ustrežno

koncentracijo bakterij, ga razlili po trdnem agarju Mueller-Hinton z AM in agarne plošče inkubirali pri 37 °C 24 ur.

Rezultati so pokazali, da je kAM+atb v različni meri zavirala rast bakterij. V primeru uporabe laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α je bila vidna jasna cona inhibicije (Slika 24A), medtem ko je bila v primeru divjih sevov UPEC rast ovirana le neposredno na koščku AM (Slika 24B-F; Preglednica 11).

Preglednica 11: Vpliv kAM+atb na rast laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α in divjih sevov UPEC. (++) Ni bakterijske rasti na koščku AM, vidna je jasna cona inhibicije okrog koščka AM; (+) Ni bakterijske rasti na koščku AM; (–) Bakterijska rast ni ovirana.

Bakterijski sev	Obseg inhibicije rasti
<i>E. coli</i> DH5 α	++
UPEC DL88	+
UPEC DL90	+
UPEC DL94	+
UPEC DL101	+
UPEC DL102	+/-



Slika 24: Testiranje protimikrobnega učinka kAM+atb na (A) laboratorijski sev *E. coli* DH5 α in na (B-F) divje seve UPEC z difuzijsko metodo s koščkom AM v mehkem agarju. kAM+atb zavira rast laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α in divjih sevov UPEC. Puščica – košček kAM+atb, glave puščic – inhibicijska cona (nepreraščena cona okrog koščka kAM+atb). Merilce: 10 mm.

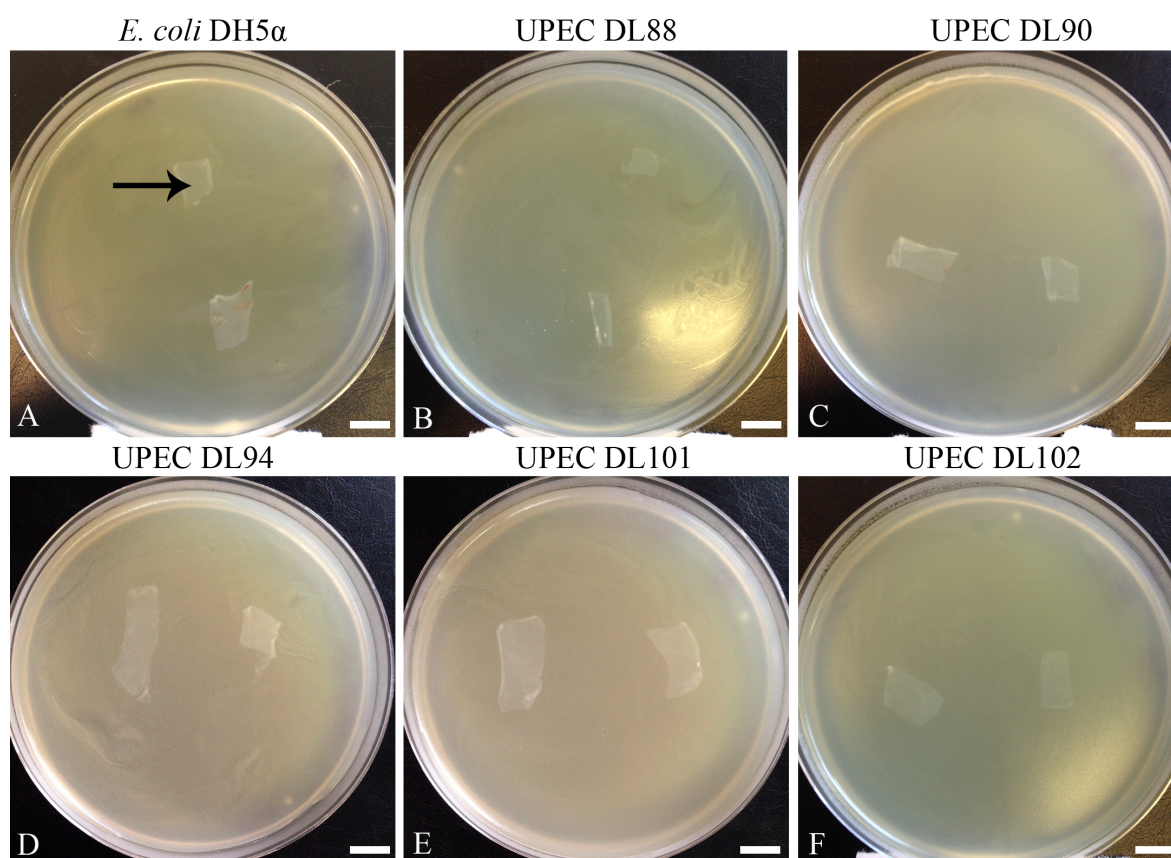
4.2.3.2 Krioshranjevana amnijska membrana, ki tekom priprave in shranjevanja ni prišla v stik z antibiotiki

V poskusih smo uporabili kAM, ki je bila shranjena pri -80°C v sterilnem PBS in tekom priprave ter shranjevanja ni prišla v stik z antibiotiki ter antimikotikom. Na sterilni trdni agar Mueller-Hinton smo najprej aseptično nanesti košček kAM, potem smo mehki agar Mueller-Hinton inokulirali z ustrežno koncentracijo bakterij, ga razlili po trdnem agarju Mueller-Hinton z AM in agarne plošče inkubirali pri 37°C 24 ur.

Rezultati so pokazali, da kAM ni zavirala rasti testiranih bakterijskih sevov. Za razliko od kAM+atb (Slika 24), v primeru kAM ni bilo inhibicije rasti niti v primeru laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α (Slika 25A) niti v primeru divjih sevov UPEC (Slika 25B-F; Preglednica 12).

Preglednica 12: Vpliv kAM na rast laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α in divjih sevov UPEC. (–) Bakterijska rast ni ovirana.

Bakterijski sev	Obseg inhibicije rasti
<i>E. coli</i> DH5 α	–
UPEC DL88	–
UPEC DL90	–
UPEC DL94	–
UPEC DL101	–
UPEC DL102	–



Slika 25: Testiranje protimikrobnega učinka kAM na (A) laboratorijski sev *E. coli* DH5 α in na (B-F) divje seve UPEC z difuzijsko metodo s koščkom AM v mehkem agarju. kAM ne zavira rasti laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α ali divjih sevov UPEC. Puščica – košček kAM. Merilce: 10 mm.

4.2.3.3 Sveža amnijska membrana, ki tekom priprave in shranjevanja ni prišla v stik z antibiotiki

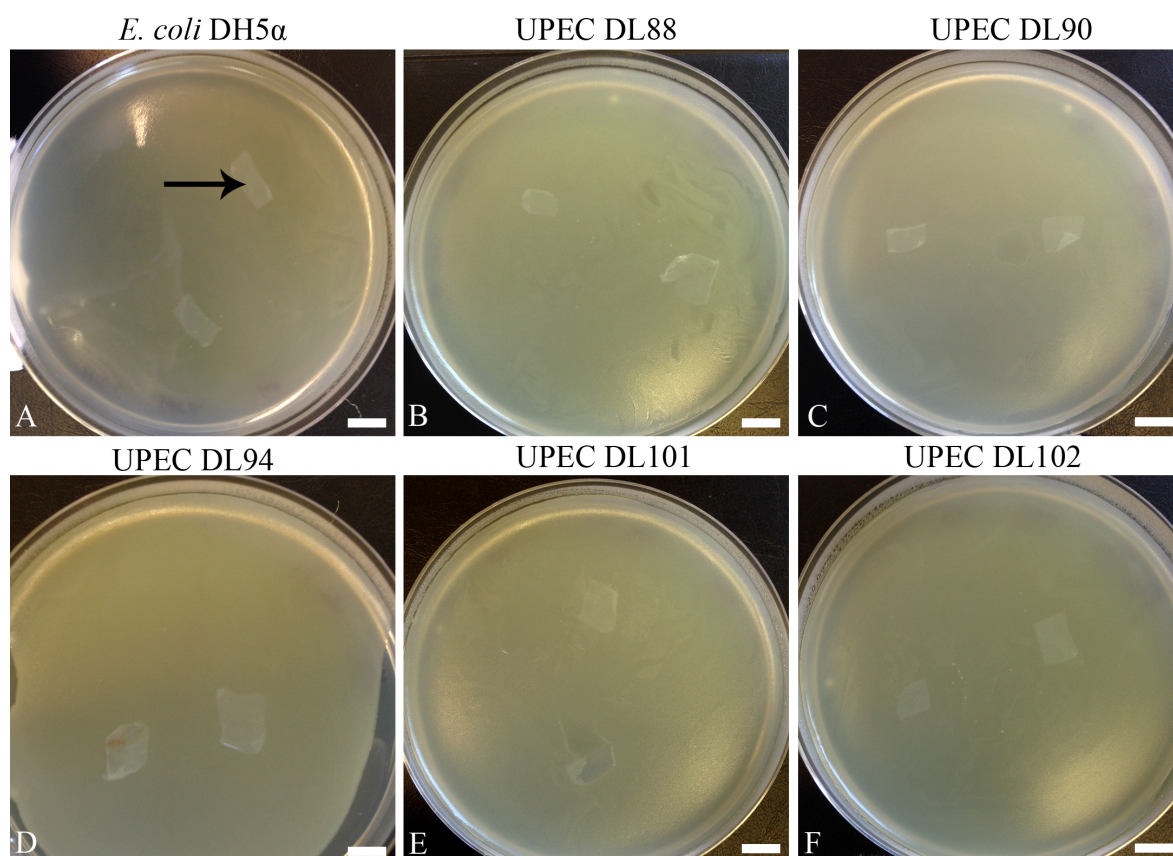
Da bi preverili, ali postopek krioshranjevanja spremeni učinek AM, smo testirali tudi protimikrobni učinek svAM. SvAM je bila shranjena pri 4 °C v sterilnem PBS in tekom priprave ter shranjevanja AM ni prišla v stik z antibiotiki in antimikotikom. Na sterilen trdni

agar Mueller-Hinton smo najprej aseptično nanesti košček svAM, potem smo mehki agar Mueller-Hinton inokulirali z ustrezno koncentracijo bakterij, ga razlili po trdnem agarju Mueller-Hinton z AM in agarne plošče inkubirali pri 37 °C 24 ur.

Rezultati kažejo, da svAM nima zaviralnega učinka niti v primeru laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α (Slika 26A) niti v primeru divjih sevov UPEC (Slika 26B-F; Preglednica 13).

Preglednica 13: Vpliv svAM na rast laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α in divjih sevov UPEC. (–) Bakterijska rast ni ovirana.

Bakterijski sev	Obseg inhibicije rasti
<i>E. coli</i> DH5 α	–
UPEC DL88	–
UPEC DL90	–
UPEC DL94	–
UPEC DL101	–
UPEC DL102	–



Slika 26: Testiranje protimikrobnega učinka svAM na (A) laboratorijski sev *E. coli* DH5 α in na (B-F) divje seve UPEC z difuzijsko metodo s koščkom AM v mehkem agarju. svAM ne zavira rasti laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α ali divjih sevov UPEC. Puščica – košček svAM. Merilce: 10 mm.

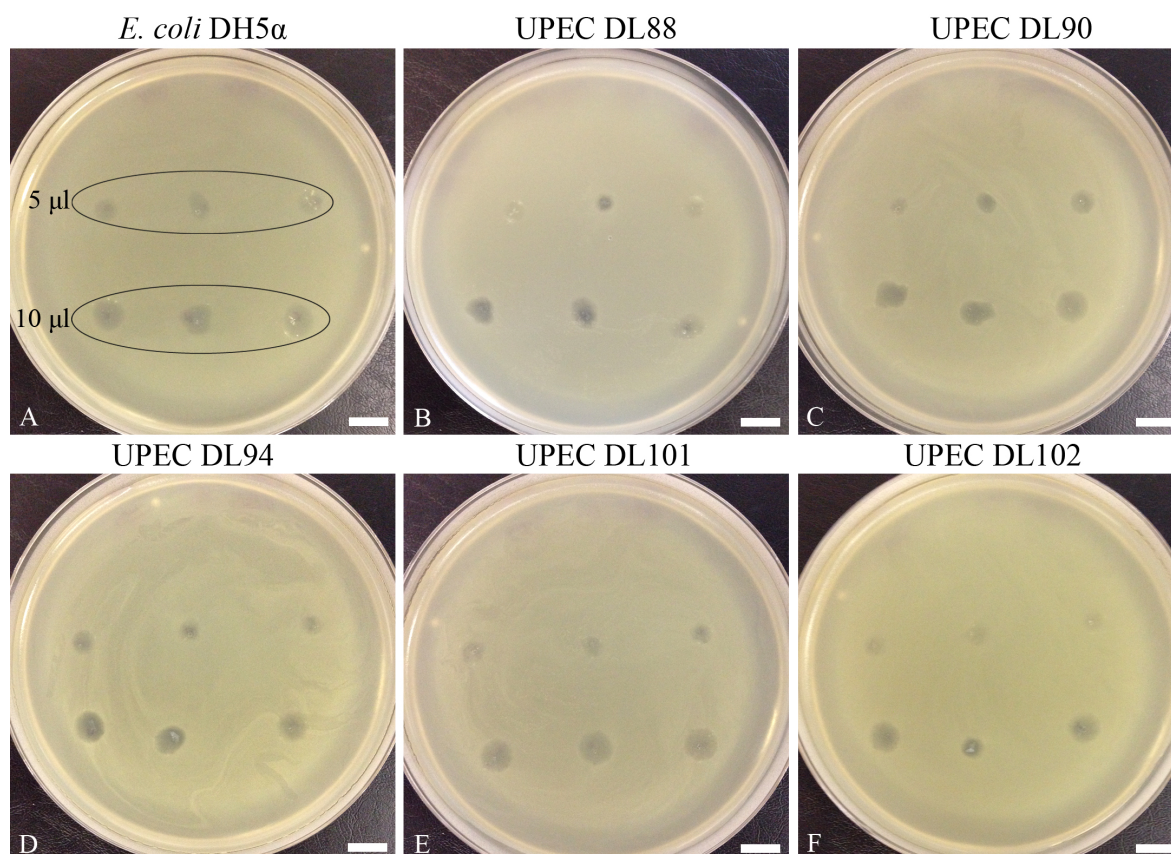
4.2.4 Difuzijska metoda s homogenatom iz amnijske membrane

Z difuzijsko metodo s homogenatom iz AM smo ugotovili, da homogenat iz kAM+atb v določeni meri zavira rast bakterij (v primeru laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α so bile vidne cone inhibicije, medtem ko smo pri divjih sevih UPEC opazili zavirano rast le na mestu nanosa homogenata; Preglednica 14; Slika 27).

Rezultati kažejo, da je protimikrobni učinek odvisen od količine nanešenega homogenata. V poskusih smo uporabili 5 oziroma 10 μ l homogenata iz kAM+atb, ki smo ga nanesli na mehki agar Mueller-Hinton, ki je bil inokuliran z bakterijami. V obeh primerih je bila rast bakterij ovirana. Iz rezultatov je razvidno, da je bila cona inhibicije večja v primeru nanosa 10 μ l homogenata iz kAM+atb (Preglednica 14; Slika 27). Med posameznimi ponovitvami pri nanosu 5 ali 10 μ l homogenata iz kAM+atb lahko v določenih primerih opazimo razlike v obsegu inhibicije, kar je verjetno lahko posledica manjših razlik v sestavi homogenata. To je razvidno v primeru vpliva homogenata iz kAM+atb na rast UPEC DL88, kjer je prišlo do razlik v obsegu inhibicije rasti med posameznimi ponovitvami (Preglednica 14; Slika 27B).

Preglednica 14: Vpliv homogenata iz kAM+atb na rast (A) laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α in (B-F) divjih sevov UPEC. (++) Jasna inhibicijska cona okrog mesta nanosa homogenata iz kAM+atb; (+) Zmanjšana rast na mestu nanosa homogenata iz kAM+atb; (–) Bakterijska rast ni ovirana.

Bakterijski sev	Obseg inhibicije rasti	
	5 μ l homogenata kAM+atb	10 μ l homogenata kAM+atb
<i>E. coli</i> DH5 α	+	++
UPEC DL88	– / +	++ / +
UPEC DL90	+	++
UPEC DL94	+	++
UPEC DL101	+	++
UPEC DL102	+	++

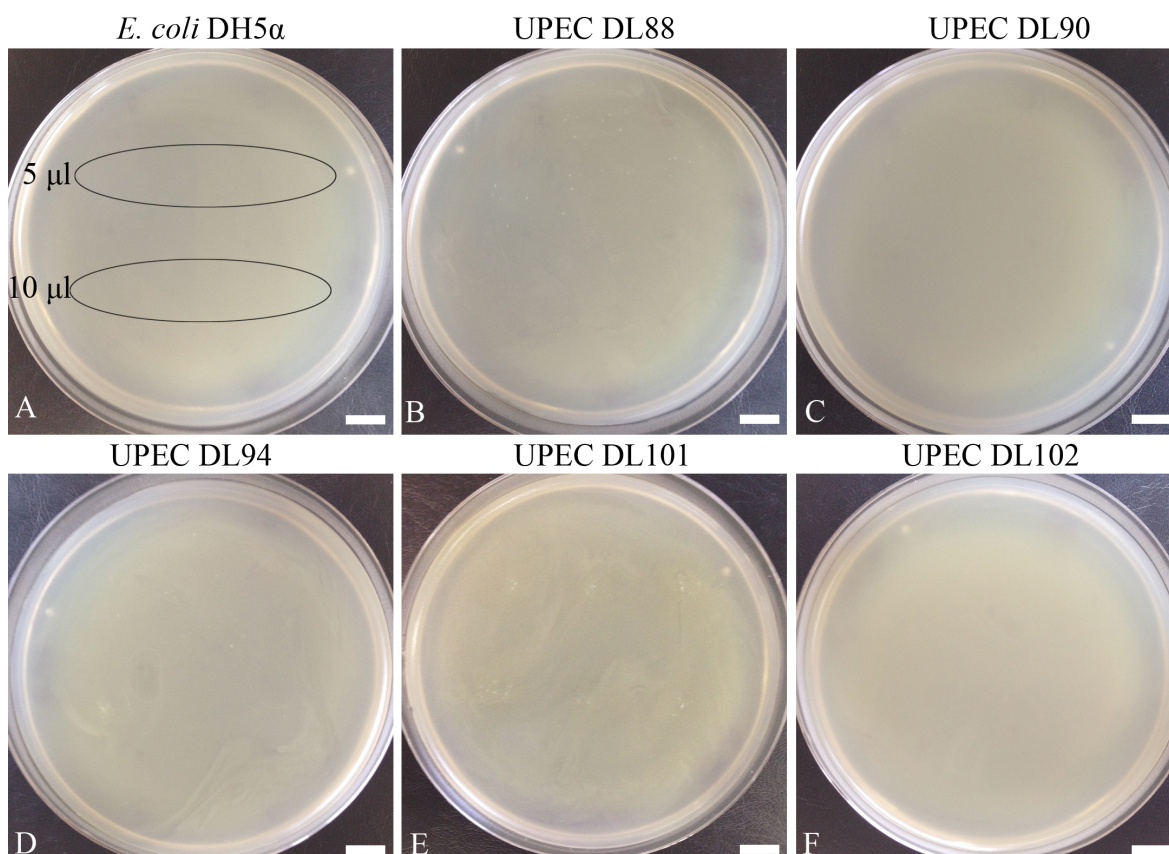


Slika 27: Testiranje protimikrobnega učinka homogenata iz kAM+atb na (A) laboratorijski sev *E. coli* DH5α in na (B-F) divje seve UPEC. Oznaka 5 μl – mesta nanosa 5 μl homogenata iz kAM+atb, oznaka 10 μl – mesta nanosa 10 μl homogenata iz kAM+atb. Merilce: 10 mm.

V primeru uporabe homogenata iz kAM rast bakterij ni bila ovirana, kar zopet kaže na to, da je inhibicija bakterijske rasti v primeru kAM+atb posledica antibiotikov, s katerimi je prišla AM v stik tekom priprave in shranjevanja AM (Preglednica 15; Slika 28).

Preglednica 15: Vpliv homogenata iz kAM na rast (A) laboratorijskega seva *E. coli* DH5α in (B-F) divjih sevov UPEC. (–) Bakterijska rast ni ovirana.

Bakterijski sev	Obseg inhibicije rasti	
	5 μl homogenata kAM	10 μl homogenata kAM
<i>E. coli</i> DH5α	–	–
UPEC DL88	–	–
UPEC DL90	–	–
UPEC DL94	–	–
UPEC DL101	–	–
UPEC DL102	–	–

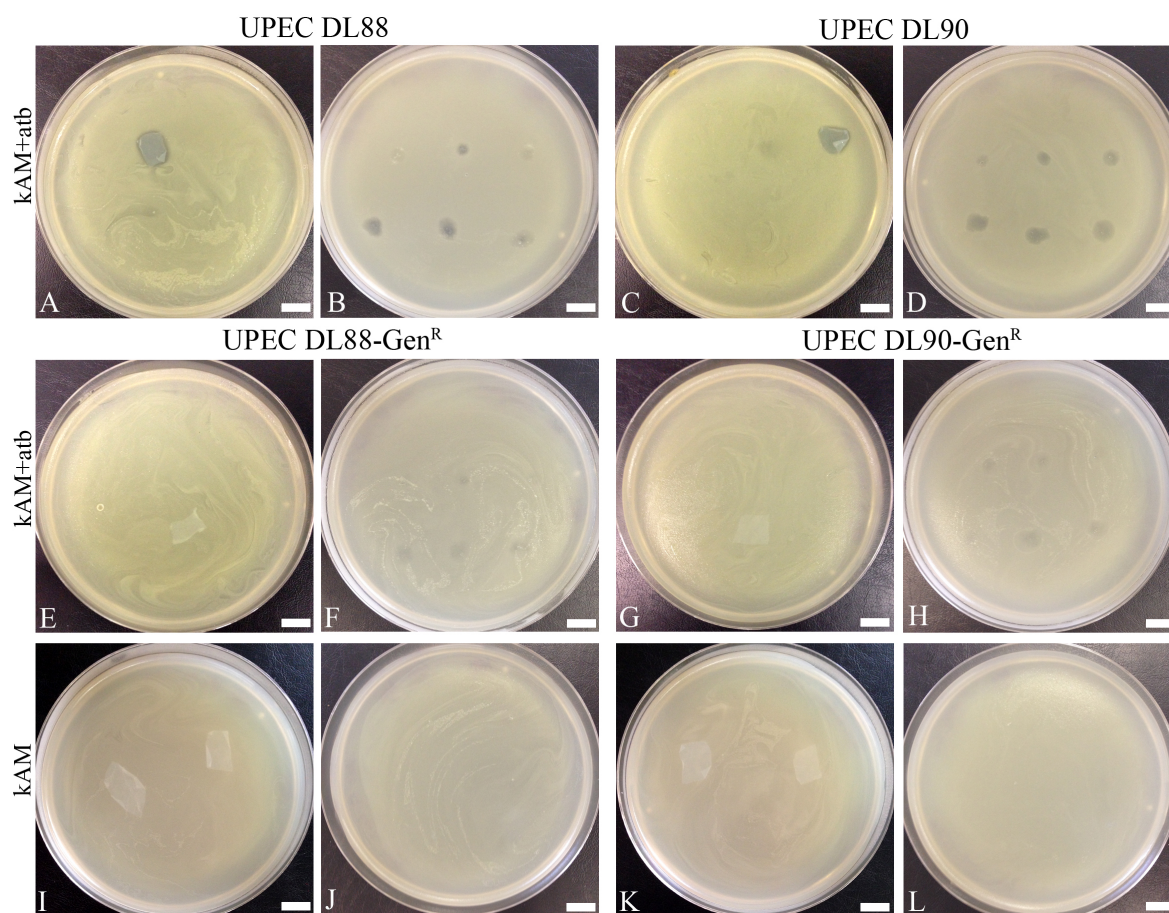


Slika 28: Testiranje protimikrobnega učinka homogenata iz kAM na (A) laboratorijski sev *E. coli* DH5α in na (B-F) divje seve UPEC. Oznaka 5 µl – mesta nanosa 5 µl homogenata iz AM, oznaka 10 µl – mesta nanosa 10 µl homogenata iz AM. Merilce: 10 mm.

4.2.5 Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti amnijske membrane proti uropatogeni *E. coli*, odporni proti gentamicinu

Da bi dokazali, da je protimikrobni učinek krioshranjevanje AM posledica prisotnosti antibiotika v mediju za zamrzovanje, smo pripravili mutante divjih sevov UPEC, ki so bile odporne proti gentamicinu (UPEC DL88-Gen^R, UPEC DL90-Gen^R).

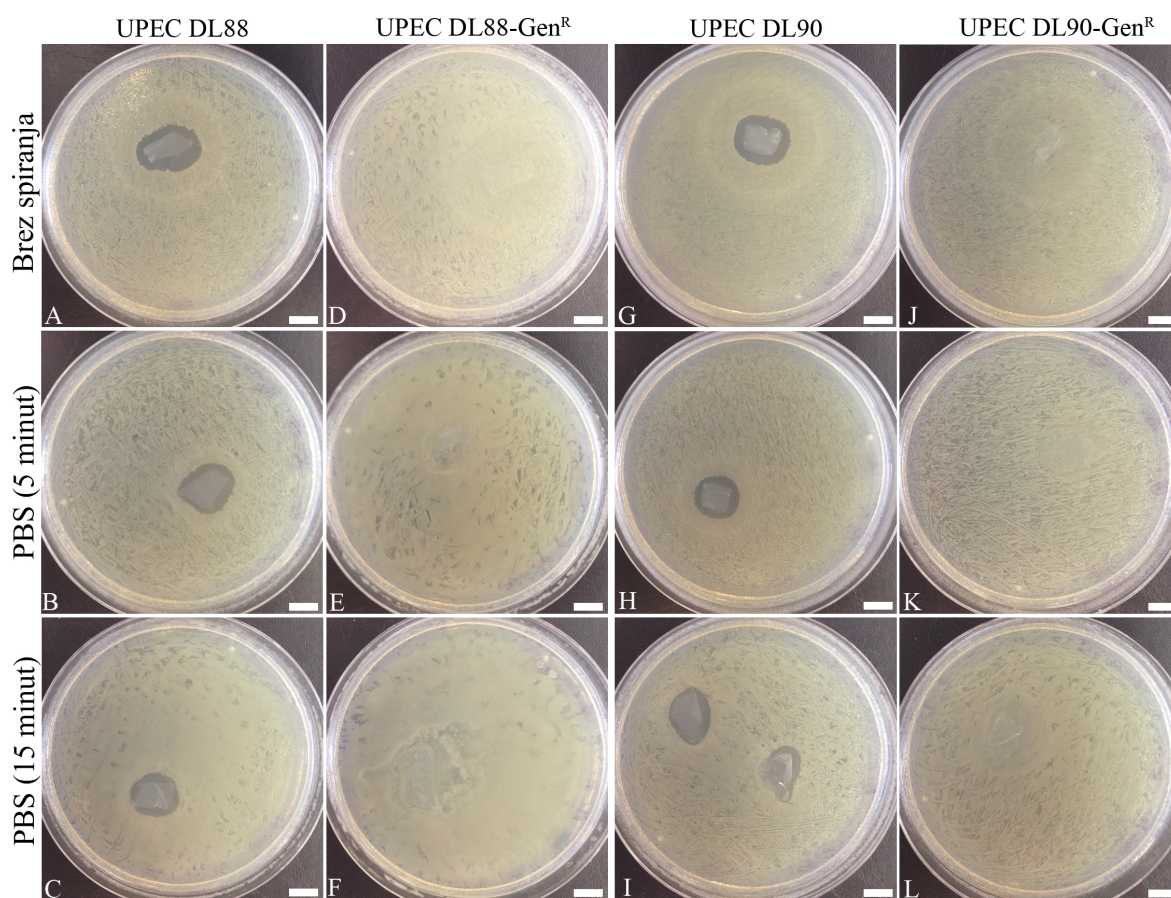
Rezultati kažejo, da kAM+atb ni imela zaviralnega učinka na rast UPEC DL88-Gen^R in UPEC DL90-Gen^R, niti v obliki koščkov niti v obliki homogenata. To je primerljivo z rezultati rasti bakterij v prisotnosti kAM, kjer kAM prav tako ni imela zaviralnega učinka na rast divjih sevov UPEC, niti v obliki koščkov, niti v obliki homogenata (Slika 29).



Slika 29: Testiranje protimikrobnega učinka kAM+atb in kAM ter njunih homogenatov na divja seva UPEC DL88 in UPEC DL90 ter na mutante istih sevov, ki imajo gentamicinsko rezistenco. (A, E, I) Testiranje učinka koščka kAM+atb in kAM na rast UPEC DL88. (B, F, J) Testiranje učinka homogenata iz kAM+atb in homogenata iz kAM na rast UPEC DL88. (C, G, K) Testiranje učinka koščka kAM+atb in kAM na rast UPEC DL90. (D, H, L) Testiranje učinka homogenata iz kAM+atb in homogenata iz kAM na rast UPEC DL90. Merilce: 10 mm.

4.2.5.1 Ugotavljanje vpliva spiranja amnijske membrane na protimikrobno aktivnost amnijske membrane

Da bi ugotovili, ali čas spiranja s PBS vpliva na protimikrobni učinek kAM+atb, smo preverili protimikrobni učinek AM takoj po odmrzovanju (brez spiranja), po 5 minutah in 15 minutah spiranja s PBS. Rezultati kažejo, da se s podaljševanjem časa spiranja AM cona inhibicije zmanjšuje v primeru divjih sevov UPEC DL88 in UPEC DL90, medtem ko čas spiranja kAM+atb s PBS ne vpliva na rast mutant, odpornih proti gentamicinu (UPEC DL88-Gen^R, UPEC DL90-Gen^R) (Slika 30).



Slika 30: Testiranje protimikrobnega učinka koščka kAM+atb na divja seva UPEC DL88 in UPEC DL90 ter na njune mutante z gentamicinsko odpornostjo, z difuzijsko metodo s koščkom AM. (A, D, G, J) Testiranje učinka koščka kAM+atb (brez spiranja) na rast divjih tipov UPEC DL88 in UPEC DL90 ter njunih mutant, odpornih proti gentamicinu. (B, E, H, K) Testiranje učinka koščka kAM+atb (po 5 minutah spiranja v PBS) na rast divjih tipov UPEC DL88 in UPEC DL90 ter njunih mutant, odpornih proti gentamicinu. (C, F, I, L) Testiranje učinka koščka kAM+atb (po 15 minutah spiranja v PBS) na rast divjih tipov UPEC DL88 in UPEC DL90 ter njunih mutant, odpornih proti gentamicinu. Merilce: 10 mm.

4.2.6 Ugotavljanje minimalnih inhibitornih koncentracij različnih sevov *E. coli* proti gentamicinu

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za gentamicin so se med uporabljenimi sevi razlikovale, in sicer je imel od vseh testiranih sevov laboratorijski sev *E. coli* DH5 α najnižjo MIK za gentamicin (3,1 μ g/ml), medtem ko je MIK divjih tipov UPEC variiral od 12,5 do 25 μ g/ml. MIK za gentamicin v primeru divjih tipov *E. coli*, odpornih proti gentamicinu, je bil višji od 50 μ g/ml (Preglednica 16).

Preglednica 16: MIK za gentamicin za vse testirane seve.

Sev	Minimalna inhibitorna koncentracija za gentamicin (µg/ml)
<i>E. coli</i> DH5α	3,1
UPEC DL88	25
UPEC DL90	12,5
UPEC DL94	25
UPEC DL101	12,5
UPEC DL102	12,5
UPEC DL88-Gen ^R	> 50
UPEC DL90-Gen ^R	> 50

5 RAZPRAVA

5.1 VPLIV AMNIJSKE MEMBRANE NA ZAVIRANJE RASTI RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC

Najpogostejši poseg pri zdravljenju invazivnega raka sečnega mehurja in tudi v primeru obsežnih, ponavljajočih se in na terapijo neodzivnih neinvazivnih tumorjev, je cistektomija (Onkološki inštitut, 2016). Pri delni ali popolni cistektomiji odstranijo del sečnega mehurja ali celoten organ in ga nadomestijo z uporabo črevesnih segmentov (enterocistoplastika). Ker se črevesje strukturno in funkcionalno razlikuje od sečnega mehurja, pogosto pride do zapletov (Dragin Jerman in sod., 2015). Strokovnjaki na področju regenerativne medicine zato iščejo možnosti za rekonstrukcijo sečnega mehurja, in sicer z uporabo *in vitro* pripravljenih presadkov, ki bi zmanjšali število pooperativnih zapletov in hospitalizacij, izboljšali kakovost življenja bolnikov ter zmanjšali stroške zdravljenja (Adamowicz in sod., 2013; Orabi in sod., 2013; Siegel in sod., 2011). AM je ustrezen nosilec za uporabo v tkivnem inženirstvu sečnega mehurja, saj spodbuja proliferacijo in diferenciacijo normalnih urotelijskih celic ter omogoča razvoj urotelija z lastnostmi, primerljivimi z nativnim urotelijem (Dragin Jerman, 2013).

5.1.1 Vzpostavitev konstruktov rakavih urotelijskih celic RT4 na nosilcih iz amnijske membrane in na sintetičnem nosilcu

Pri izbiri primerne nosilca za tkivno inženirstvo je ključna njegova biološka skladnost in razgradljivost, in sicer nosilec ne sme povzročiti toksičnega, karcinogenega, imunološkega odziva ali poškodbe v živem ali kakšnem drugem tkivu (Baguneid in sod., 2006). Mehanske lastnosti dobrega nosilca vključujejo permeabilnost, stabilnost, elastičnost, fleksibilnost, plastičnost in sposobnost resorpcije (Yang in sod., 2001). Za uporabo v tkivnem inženirstvu je pomembno, da nosilci vsebujejo tudi zunajcelični matriks, ki pomembno vpliva na adhezijo in rast celic ter sodeluje pri medcelični komunikaciji. Kot nosilec smo uporabili AM, ki ima poleg ustreznih mehanskih lastnosti tudi protivnetne lastnosti, ne povzroča brazgotinjenja in fibroze ter je nizko imunogena (Niknejad in sod., 2008).

Z metodo tkivnega inženirstva smo v magistrski nalogi uspešno vzpostavili konstrukte rakavih urotelijskih celic RT4, ki izhajajo iz urotelijskega papiloma sečnega mehurja, na nosilcih eAM, gAM in sAM. Rezultati kažejo, da pri rasti celic RT4 na nosilcih iz AM prihaja do razlik v dinamiki in načinu rasti ter izražanju medceličnih stikov v primerjavi z rastjo celic RT4 na sintetičnem nosilcu. Rast celic RT4 najbolj zavira nosilec eAM, kjer so celice RT4 v 21 dneh prerastle le 46 % nosilca. Zaradi amnijskih epitelijskih celic (AEC) so se rakave celice RT4 težko pritrdile na podlago oz. so se lahko pritrdile tam, kjer so bile

AEC odluščene oziroma le izjemoma tudi na AEC. Pri nosilcu sAM je bila preraščenost po 21 dneh poskusa 76 %, medtem ko so celice na nosilcu gAM prerastle 98 % površine. Celice RT4 so na sintetičnem nosilcu že po 7 dneh poskusa dosegle 100 % preraščenost. AM ne le vpliva na dinamiko rasti rakavih urotelijskih celic, ampak tudi na način rasti. Celice na nosilcu eAM so rastle v obliki posameznih papilomov, na gAM kot eno- do dvoplastni epitelij, na sAM kot eno- do triplastni epitelij. Na sintetičnem nosilcu so celice RT4 rastle v dvo- do triplastnem epiteliju. Med celicami RT4, ki so rastle na nosilcih iz AM, so bili medcelični prostori manjši kot med celicami na sintetičnem nosilcu. Manjši medcelični prostori so značilni za normalne urotelijske celice (Alberts in sod., 2014). Prejšnje študije (Železnik, 2014) kažejo, da mišično invazivne rakave urotelijske celice pri rasti na AM spremenijo fenotip in postanejo bolj podobne normalnim urotelijskim celicam, zato bi bilo tudi v tem primeru potrebno v nadaljevanju proučiti ultrastrukturo celic RT4, rastočih na AM.

5.1.1.1 AEC igrajo ključno vlogo pri zaviranju rasti rakavih urotelijskih celic RT4

Rezultati kažejo, da je prisotnost AEC ključna za zaviranje rasti rakavih urotelijskih celic, saj do največje inhibicije rasti celic RT4 prihaja v primerih, ko smo celice RT4 nasadili na nosilce iz AM, kjer so bile prisotne AEC (eAM, sAM). To potrjujejo tudi rezultati vpliva AM na rast invazivnih rakavih celic T24 (Železnik, 2014), kjer je bila prav tako rast celic na nosilcih iz AM z AEC najbolj zavirana (eAM, sAM). Nikjenad in sod. (2013) poročajo, da so AEC ključni element pri protirakavemu delovanju AM. Poleg tega tudi Hao in sod. (2000) navajajo, da se protiangiogeni dejavniki (npr. trombospondin-1, receptor antagonista interlevkin-1, tkivni inhibitorji metaloproteinaz – TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4) nahajajo predvsem v epitelijah AM (AEC). Ravno razvoj žilja do novih rakavih celic in uničenje telesnih imunoloških pregrad, ki preprečujejo invazijo tumorjev, sta ključna dogodka pri rasti tumorjev in metastaziranju in zato naj bi AM zaradi protiangiogenih in imunoregulatornih lastnosti delovala protirakavo (Niknejad in sod., 2013).

Poleg tega, da AEC izločajo dejavnike, ki zavirajo rast rakavih celic, delujejo tudi kot mehanska prepreka, saj se rakave celice RT4 večinoma pritrdijo na AM na mestih, kjer so AEC odstranjene oziroma le izjemoma tudi na AEC.

5.1.1.2 Amnijska membrana vpliva na izražanje proteinov medceličnih stikov

Sposobnost tvorbe in ohranjanje tkivnih pregrad je ključna lastnost vseh večceličnih organizmov. To je še posebej pomembno v primeru sečnega mehurja, ki shranjuje urin, brez nereguliranega pretoka toksinov, ionov ter vode preko epitelija (urotelija) v krvni obtok (Acharya in sod., 2004). Za nepropustnost urotelija so ključni predvsem tesni stiki, ki jih

sestavljajo različni klavdini, okludin in tricelulin (Anderson in van Itallie, 1995; Lasič in sod., 2015).

Celice RT4 izhajajo iz urotelijskega papiloma sečnega mehurja in spadajo v tumorski razred I. To pomeni, da imajo te celice še vedno nekatere lastnosti normalnih celic in so dobro diferencirane (Park in sod., 1997). Navedeno potrjujejo tudi naši rezultati, saj celice RT4 pri rasti na nosilcih iz AM in na sintetičnem nosilcu ne izražajo proteina N-kadherina, ki je mezenhimski označevalec in je značilen za invazivne rakave celice, medtem ko izražajo adherentni protein E-kadherin ter tesnostični protein okludin. Oba sta značilna za normalne urotelijske celice. Do razlik med rastjo celic RT4 na nosilcih iz AM in na sintetičnem nosilcu prihaja v intenziteti izražanja proteinov normalnih urotelijskih celic (E-kadherin, okludin), saj naši rezultati kažejo, da pri rasti celic RT4 na nosilcih iz AM prihaja do izražanja E-kadherina v neprekinjenih kontinuiranih linijah (in močnejši fluorescenci), kot pri rasti na sintetičnem nosilcu. Večji delež celic RT4, rastočih na nosilcih iz AM, izraža okludin v primerjavi s celicami RT4, rastočimi na sintetičnem nosilcu. Na podlagi tega sklepamo, da pri rasti celične linije RT4 na nosilcih iz AM pride do izražanja fenotipa, ki je bolj podoben normalnim urotelijskim celicam. Tovrsten vpliv AM smo pokazali tudi na konstruktih invazivnih rakavih urotelijskih celic T24, izhajajočih iz urotelijskega karcinoma sečnega mehurja, na nosilcih iz AM. Celice T24 so pričele izražati E-kadherin in okludin, zmanjšale so izražanje N-kadherina in postale so pravilnejših oblik (Železnik, 2014).

5.1.2 Vzpostavitev konstruktov normalnih in rakavih urotelijskih celic na nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu

V tumorjih poleg rakavih celic najdemo tudi celice imunskega sistema, endotelijske celice, fibroblaste in druge celice. Raziskovalci ugotavljajo, da komunikacija in druge interakcije med navedenimi celicami pomembno prispevajo k razvoju in progresiji raka (Brucher in Jamall, 2014; Ungefroren in sod., 2011). S tega vidika se kaže pomen uporabe kokultur pri študiju zgodnjih faz razvoja raka, saj monokulture ne posnemajo kompleksnosti tumorskega mikrookolja, medtem ko kokulture omogočajo opazovanje medceličnih interakcij (Miki in sod., 2012; Jaganathan in sod., 2014).

Dragin Jerman in sod. (2013) poročajo, da je AM ustrezen nosilec za normalne urotelijske celice, ker omogoča proliferacijo celic in spodbuja njihovo diferenciacijo ter tvorbo normalnega urotelija. Njihova raziskava je pokazala, da nosilci iz AM omogočajo razvoj s tkivnim inženirstvom pridobljenega urotelija, ki ima molekularne in ultrastrukturne lastnosti primerljive z nativnim urotelijem. Rezultati rasti rakavih urotelijskih celic RT4 in T24 na različnih nosilcih iz AM kažejo, da nosilec eAM najbolj zavira njihovo rast, saj so celice RT4 v 3 tednih dosegle le 46 % preraščenost nosilca in celice T24 le 38 % preraščenost

nosilca (Železnik, 2014). Na podlagi tega smo se odločili, da za nadaljnje raziskave uporabimo nosilec eAM. S tkivnim inženirstvom smo vzpostavili kokulture normalnih in rakavih urotelijskih celic na nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu.

Rezultati so pokazali, da v primeru obeh kokultur (NPU in RT4 ter NPU in T24) prihaja do razlik v načinu in dinamiki rasti med celicami, rastočimi na eAM in celicami, rastočimi na sintetičnem nosilcu. Nosilec eAM močno zavira rast celic RT4 in T24 v kokulturi z NPU, saj pride pri rasti kokulture na eAM do več kot 90 % zmanjšanja rasti rakavih celic v primerjavi z rastjo kokulture na sintetičnem nosilcu. Dinamika rasti je različna tudi, ko primerjamo rast rakavih celic v monokulturi ali v kokulturi z NPU na nosilcu eAM. Celice RT4, rastoče na eAM, prekrijejo 46 % nosilca, medtem ko celice RT4, rastoče v kokulturi z NPU na eAM prekrijejo le 5 % nosilca. Celice T24, rastoče na eAM, prekrijejo 38 % nosilca (Železnik, 2014), medtem ko celice T24, rastoče v kokulturi z NPU na eAM prekrijejo le 7 % nosilca. Predvidevamo, da ima pri zaviranju rasti rakavih celic v kokulturi z NPU pomembno vlogo tudi medcelična komunikacija med rakavimi in normalnimi urotelijskimi celicami.

Nosilec eAM vpliva tudi na rast NPU. Celice NPU so pri rasti v kokulturi s celicami RT4 na eAM prekrile 2 % nosilca, medtem ko so v kokulturi s celicami RT4 na sintetičnem nosilcu prekrile 40 % nosilca. Celice NPU v kokulturi s celicami T24 so na eAM prekrile 2,5 % nosilca in 19 % sintetičnega nosilca. Pritrditev rakavih celic in celic NPU na nosilec eAM so ovirale AEC, saj so se celice lahko pritrdile le tam, kjer so bile AEC odstranjene oziroma le izjemoma tudi na AEC. Celice NPU so se sicer lažje pritrdile na nosilec kot rakave celice, saj imajo normalne urotelijske celice podobne adherentne stične proteine kot AEC (npr. E-kadherin) in zato lahko tvorijo homodimerne povezave z njimi (Niessen in Gumbiner, 2002; Pečina-Šlaus, 2003). Sodeč po rezultatih Dragin Jerman in sod. (2013) sklepamo, da bi za ustrezno oceno vpliva AM na rast in diferenciacijo celic NPU morali rast kokultur spremljati vsaj 3 tedne. Njihovi rezultati kažejo, da NPU na eAM najprej tvorijo majhne otočke celic, nato se sčasoma AEC odluščijo in potem se celice NPU razrastejo po bazalni lamini in tvorijo urotelij.

5.1.3 Rakave urotelijske celice ne prehajajo skozi bazalno lamino amnijske membrane

Bazalna lamina leži pod epitelijskimi celicami in ločuje epitelij od strome. Da bi rakave celice lahko tvorile zasevke, morajo biti sposobne invazije v sosednja tkiva in krvni obtok, kar pa zahteva razgradnjo bazalne lamine in tudi reorganizacijo okoliških tkiv. Rakave celice pogosto proizvajajo večje količine receptorjev za proteine in polisaharide, ki sestavljajo bazalno lamino (npr. kolagene, proteoglikane, glikozaminoglikane) in izločajo encime, ki

razgrajujejo te gradnike bazalne lamine (Alberts in sod., 2016). Gildea in sod. (2000) ter Zhao in sod. (2014) poročajo, da celična linija T24 izraža metaloproteinaze, s katerimi lahko razgradi komponente zunajceličnega matriksa in preide v nižje ležeča tkiva. Celična linija RT4 ni invazivna in ne prehaja skozi bazalno lamino (ATCC, 2016, Chen in sod., 2006).

Naši rezultati so pokazali, da AM onemogoča prehajanje invazivnih rakavih celic T24 skozi bazalno lamino tako v monokulturi (Železnik, 2014), kot tudi v kokulturi z normalnimi urotelijskimi celicami. Kot pričakovano, tudi celična linija RT4 ni prehajala skozi bazalno lamino. Preprečevanje prehoda rakavih celic skozi bazalno lamino in posledičnega metastaziranja je ključno, saj medtem ko kar 96 % bolnikov z neinvazivnimi oblikami raka sečnega mehurja preživi 5 let od postavitve diagnoze, to obdobje preživi le 30 – 50 % bolnikov z invazivno obliko raka sečnega mehurja (American Society of Clinical Oncology, 2016; Park in sod., 2014).

Mehanizem protirakavega delovanja AM še ni jasen. Magatti in sod. (2012) navajajo, da je antiproliferativni učinek mezenhimskih stromalnih celic iz AM povezan z ustavitvijo celičnega cikla rakavih celic v fazi G₀/G₁, kar kaže na možnost, da celice iz AM zmanjšajo izražanje genov, povezanih z napredovanjem celičnega cikla, npr. ciklinov in od ciklina odvisnih kinaz. Niknejad in sod. (2013) navajajo, da AM sproži apoptozo rakavih celic, in sicer menijo, da je proženje apoptoze, inhibicija angiogeneze in zaustavitev celičnega cikla posledica inhibicije proteina toplotnega šoka 90 (angl. heat shock protein 90, HSP90). HSP90 je od adenozin trifosfata (ATP)-odvisen molekularni šaperon, ki zaščiti rakave celice tako, da inhibira zaustavitve celičnega cikla in apoptozo ter spodbuja angiogenezo (Niknejad in sod., 2013, Trepel in sod., 2010).

Na podlagi naših rezultatov in rezultatov Dragin Jerman in sod. (2013) menimo, da bi lahko uporabili AM z AEC (torej nosilca eAM in sAM) pri operativnem zdravljenju raka na sečnem mehurju, in sicer kot vsadek po odstranitvi večfokalnih urotelijskih tumorjev. Sklepamo, da bi v tem primeru AM preprečila prehod rakavih urotelijskih celic v nižje ležeča tkiva, zavirala rast še ne odstranjenih rakavih celic, zmanjšala njihovo invazivnost in spodbujala rast ter diferenciacijo normalnih urotelijskih celic. Glede na to, da po odstranitvi papilarnih tumorjev pogosto pride do ponovnega pojava tumorjev sklepamo, da bi uporaba AM zmanjšala možnost pooperativnih zapletov, ponovnega razvoja raka in pripomogla k hitrejši ozdravitvi bolnika.

Pred klinično uporabo AM bo potrebno izvesti nadaljnje raziskave, ki bodo ovrednotile ustreznost uporabe nosilcev iz AM z AEC (z vidika zaviranja rasti rakavih celic in spodbujanja rasti ter diferenciacije normalnih urotelijskih celic) ter druge raziskave (npr.

prenos po Westernu, RT PCR ipd.), ki bodo dodatno pojasnile način delovanja AM na zaviranje rasti rakavih urotelijskih celic in spodbujanje rasti normalnih urotelijskih celic.

5.2 VPLIV AMNIJSKE MEMBRANE NA ZAVIRANJE RASTI UROPATOGENE BAKTERIJE *E. coli*

UPEC je eden izmed najpogostejših povzročiteljev okužb urinarnega trakta. V zadnjih letih številne študije poročajo o pojavu sevov, odpornih proti antibiotikom (Ali in sod., 2016). Ravno zaradi razvoja odpornosti UPEC proti antibiotikom in pogostega ponavljanja vnetij urinarnega trakta se kaže potreba po uvedbi alternativnih načinov zdravljenja tovrstnih okužb. Cilj te naloge je bil tudi ugotoviti, ali AM zavira rast UPEC.

5.2.1 kAM+atb in kAM nimata protimikrobnega učinka na uropatogeno *E. coli* v tekočem gojišču

Najprej smo testirali učinek kAM+atb in kAM na rast laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α in divjega tipa UPEC DL90 v tekočem gojišču. Rezultati kažejo, da niti kAM+atb niti kAM nimata protimikrobnega učinka na rast testiranih organizmov. Ne glede na velikost inokuluma bakterij ali vrsto bakterij (laboratorijski ali divji tip *E. coli*) nismo dokazali statistično značilnih razlik med kontrolnimi in testnimi vzorci. Predvidevamo, da AM nima protimikrobnega učinka *ex vivo* ali da vsebuje določeno količino dejavnikov, ki zavirajo rast bakterij, a se ti v pogojih *in vitro*, npr. v tekočem gojišču (10 ml) razredčijo do te mere, da ne zavirajo rasti bakterij. Tudi Kjaergaard in sod. (2001) poročajo, da v primeru uporabe tekočega gojišča niso opazili inhibitornih učinkov AM. Tudi zato smo pri nadaljnjih analizah uporabili trdna gojišča.

5.2.2 kAM in svAM nimata protimikrobnega učinka na uropatogeno *E. coli* na trdnem gojišču

V poskusih smo uporabili svAM in kAM, ki tekom priprave in shranjevanja nista prišli v stik z antibiotiki in antimikotiki, pri čemer smo protimikrobni učinek testirali z difuzijsko metodo s koščkom AM in homogenatom iz AM. Rezultati so pokazali, da niti svAM niti kAM ne ovirata rasti divjih sevov UPEC na trdnem gojišču, saj v nobenem primeru nismo opazili inhibicije ali zmanjšane rasti bakterij. Na podlagi tega sklepamo, da AM ne izloča protimikrobnih snovi, ki bi zavirali rast UPEC.

5.2.3 kAM+atb, ki tekom priprave in shranjevanja pride v stik z antibiotiki, zavira rast uropatogene *E. coli* na trdnem gojišču

V poskusih smo uporabili kAM+atb, ki je prišla tekom priprave AM v stik z antibiotiki (penicilin, streptomycin, neomicin) in antimikotikom (amfotericin B). Shranjena je bila v mediju za zamrzovanje, ki je vseboval antibiotik gentamicin (25 µg/ml). Tako pripravljena kAM+atb zavira rast bakterij na trdnem gojišču. V primeru laboratorijskega seva *E. coli* DH5α je bila po 24-urni inkubaciji jasno vidna inhibicijska cona, medtem ko je bila v primeru divjih sevov UPEC rast bakterij ovirana le neposredno pod koščkom AM. O podobnih rezultatih so poročali tudi Talmi in sod. (1991), ki pa so za razlago dobljenih rezultatov navedli domnevo, da je protimikrobni učinek AM predvsem posledica močne pritrditve AM na površino agarne plošče in na mikroorganizme. Glede na to, da smo ovirano rast opazili v le primeru uporabe kAM+atb, ne pa v primeru uporabe svAM in kAM, menimo, da protimikrobni učinek AM ni bil posledica močne adhezije AM na agarno ploščo, kot navajajo Talmi in sod. (1991), ampak, da je ovirana rast posledica uporabe antibiotikov tekom shranjevanja AM. Poleg tega smo enak rezultat pokazali tudi z difuzijsko metodo s homogenatom.

Za potrditev, da lahko protimikrobni učinek kAM+atb pripišemo zgolj delovanju gentamicina, ki je sestavina medija za zamrzovanje AM, smo pripravili mutante divjih sevov UPEC, ki so odporne proti gentamicinu. Rezultati na teh sevih kažejo, da niti kAM+atb niti kAM nimata zaviralnega učinka na rast mutant, odpornih proti gentamicinu, kar dodatno potrjuje, da je protimikrobno delovanje krioshranjevanja AM posledica antibiotika, s katerim pride kAM+atb v stik med krioshranjevanjem. kAM+atb pride v stik z antibiotiki sicer tudi tekom priprave AM, vendar glede na to, da pri mutantah, odpornih proti gentamicinu nismo opazili zmanjšane rasti, menimo, da lahko protimikrobni učinek pripišemo zgolj gentamicinu, ki je sestavina medija za zamrzovanje AM. Med pripravo AM se ta spira s PBS, ki vsebuje antibiotike (penicilin, streptomycin, neomicin) maksimalno nekaj minut, medtem ko je kAM+atb prepojena s medijem za krioshranjevanje, ki vsebuje antibiotik gentamicin, ves čas krioshranjevanja. Mencucci in sod. (2006) poročajo, da je za privzem antibiotika v AM dovolj že 15 – 30 minut inkubacije v antibiotiku in da so zaznali protimikrobno aktivnost tudi več dni po dodatku antibiotika v AM. Predvidevamo, da se antibiotik močno inkorporira v stromo AM, saj je kAM+atb navkljub 20 – 30 minutnem spiranju v sterilnem PBS še vedno učinkoval protimikrobno na laboratorijski sev *E. coli* DH5α in divje tipe UPEC. Poleg tega so naši rezultati pokazali, da je obseg protimikrobnega učinka odvisen od časa spiranja kAM+atb v PBS po odmrzovanju.

Testirali smo tudi minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) uporabljenih bakterij proti gentamicinu, in sicer je laboratorijski sev *E. coli* DH5α najbolj dovzeten za gentamicin

(MIK=3,1 µg/ml), medtem ko so divji sevi UPEC za gentamicin manj dovzetni (MIK=12,5-25 µg/ml). V gojišču za zamrzovanje AM je koncentracija gentamicina 25 µg/ml. Ti rezultati sovpadajo z rezultati testiranja protimikrobnega učinka krioshranjevanje AM, kjer je bil največji učinek opazen v primeru *E. coli* DH5α, medtem ko je bil učinek v primeru divjih sevov UPEC minimalen, saj je MIK teh bakterij blizu izhodni koncentraciji gentamicina (25 µg/ml) v gojišču za shranjevanje, medtem ko je bila končna koncentracija antibiotika v AM zaradi spiranja v PBS po odmrzovanju nižja.

Mnogi raziskovalci (Kjaergaard in sod., 2001; Parthasarathy in sod., 2014; Talmi in sod., 1991; Tehrani in sod., 2013; Wang in sod., 2012) poročajo o protimikrobnem učinku amnijske membrane na različne vrste bakterij (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*...) in gliv (*Blastomyces albicans*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans*), vendar so si njihovi rezultati pogosto kontradiktorni, saj pri istih bakterijskih vrstah pokažejo različen učinek AM (ali pomanjkanje le-tega). Glede na to, da smo protimikrobni učinek AM dokazali le pri uporabi kAM+atb in ne pri uporabi svAM ter kAM, ki tekom priprave in shranjevanja ne prideta v stik z antibiotiki, sklepamo, da lahko protimikrobni učinek AM *in vitro* pripišemo antibiotiku, ki je sestavina medija za zamrzovanje, in se navkljub spiranju AM v PBS po odmrzovanju, ohrani v AM.

Idejo o uporabi AM kot sistema za dostavo zdravil so prvi predstavili Kim in sod. (2001). Prve uspešne *in vitro* rezultate uporabe AM kot nosilke antibiotikov so pokazali Mencucci in sod. (2006). Ti so ugotovili, da AM omogoča hiter privzem antibiotika, poleg tega pa so protimikrobno aktivnost z antibiotikom tretiranih AM opazili celo več dni po tretiranju. Na podlagi naših rezultatov sklepamo, da bi lahko AM uporabili kot nosilec za lokalno aplikacijo antibiotikov v primeru operativnega odstranjevanja večfokalnih tumorjev sečnega mehurja, kjer bi uporaba AM zavirala rast rakavih urotelijskih celic in zmanjšala možnost ponovnega pojava tumorjev, dodani antibiotiki v AM pa bi omogočili natančno dostavo antibiotika na mesto poškodbe in s tem zmanjšali možnost pooperativnih zapletov.

6 SKLEPI

- Vzpostavili smo konstrukte rakavih urotelijskih celic RT4 na treh različnih nosilcih iz AM (eAM, gAM in sAM).
- Vzpostavili smo kokulture normalnih urotelijskih celic in rakavih urotelijskih celic RT4, ki izvirajo iz humanega urotelijskega papiloma oziroma celic T24, ki izvirajo iz humanega urotelijskega karcinoma sečnega mehurja, na nosilcu eAM.
- AM vpliva na dinamiko in način rasti rakavih urotelijskih celic RT4, in sicer njihovo rast najbolj zavira nosilec eAM.
- Rakave urotelijske celice RT4 in T24 ne prehajajo skozi bazalno lamino AM.
- Prisotnost amnijskih epitelijskih celic (AEC) na nosilcu iz AM je ključna za zaviranje rasti rakavih urotelijskih celic.
- Rakave urotelijske celice RT4, ki rastejo na nosilcih iz AM, spremenijo fenotip. AM spodbuja izražanje E-kadherina in okludina, ki sta značilna za normalne epitelijske celice. Izražanje E-kadherina in okludina je močnejše pri rakavih urotelijskih celicah RT4, ki rastejo na nosilcu iz AM kot na sintetičnem nosilcu.
- kAM in kAM+atb nimata protimikrobnega učinka na laboratorijski sev *E. coli* DH5 α in na divje seve UPEC v tekočem gojišču; kAM in svAM nimata protimikrobnega učinka na laboratorijski sev *E. coli* DH5 α in na divje seve UPEC na trdnem gojišču.
- kAM+atb zavira rast laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α in divjih sevov UPEC na trdnem gojišču, kar je posledica prisotnosti gentamicina v mediju za zamrzovanje kAM+atb.
- Protimikrobno vlogo gentamicina v kAM (kAM+atb) smo potrdili s pripravo mutant UPEC (seva DL88 in DL90), ki so bile odporne proti gentamicinu.

7 POVZETEK

Amnijska membrana (AM) je ekstraembrionalna ovojnica, ki obdaja z amnijsko tekočino napolnjeno amnijsko votlino. Zaradi svojih lastnosti, kot so nizka imunogenost, pospeševanje epitelizacije, preprečevanje brazgotinjenja tkiva in primernih mehanskih lastnosti, je AM primerna za uporabo v regenerativni medicini.

Leta 2013 so v Sloveniji zabeležili 344 novih primerov raka sečnega mehurja. Ob začetni diagnozi večina rakavih obolenj sečnega mehurja spada med mišično neinvazivne. Mišično neinvazivni rak sečnega mehurja zdravijo s transuretralno resekcijo (delna ali popolna odstranitev tumorja skozi sečnico), medtem ko v primeru invazivnega raka sečnega mehurja ali obsežnih, ponavljajočih se neinvazivnih tumorjev ali tumorjev, neodzivnih na terapijo, opravijo cistektomijo (odstranitev dela sečnega mehurja ali celotnega organa). Da bi povečali preživetje in kakovost življenja bolnikov z rakom sečnega mehurja, se je pojavila potreba po novih metodah zdravljenja in ena izmed teh je tudi tkivno inženirstvo kot oblika regenerativne medicine.

Okužbe urinarnega trakta so med najpogostejšimi bakterijskimi okužbami pri človeku. Največ teh okužb povzroči uropatogena bakterija *Escherichia coli* (UPEC). Okužbe urinarnega trakta so pogoste predvsem pri ženskah, starejših in otrocih pred puberteto. Bolnike s simptomatsko okužbo običajno zdravijo z antibiotiki, vendar zdravljenje postaja vedno težje zaradi pojava mikroorganizmov, odpornih proti antibiotikom.

V nalogi smo: i) proučevali vpliv AM na rast rakavih urotelijskih celic, in sicer celic RT4, ki izvirajo iz humanega urotelijskega papiloma in celic T24, ki izvirajo iz humanega urotelijskega karcinoma, ii) vzpostavili kokulture normalnih in rakavih urotelijskih celic na AM ter iii) proučevali vpliv AM na rast uropatogene bakterije *Escherichia coli* (UPEC).

Rakave urotelijske celice RT4 smo nasadili na epitelij AM (eAM), na bazalno lamino AM (t.i. gola AM – gAM) ali na vezivno tkivo (stromo) AM (sAM). Konstrukte smo gojili tri tedne in v tem času spremljali dinamiko rasti rakavih celic RT4, nato pa smo z imunooznačevanjem ovrednotili izražanje stičnih proteinov (N-kadherina, E-kadherina, okludina) in intaktnost bazalne lamine (preko kolagenov IV ter VII). Ugotovili smo, da vsi trije nosilci iz AM vplivajo na rast rakavih celic RT4, in sicer njihovo rast najbolj zavira nosilec eAM, kjer celice RT4 v treh tednih prerastejo le 46 % nosilca. Celice RT4, rastoče na sAM, prerastejo v treh tednih 76 % nosilca in celice RT4, rastoče na gAM 98 % nosilca, medtem ko celice RT4 na sintetičnem nosilcu dosežejo konfluentnost že po sedmih dneh. Rakave urotelijske celice RT4, rastoče na AM, ne prehajajo skozi bazalno lamino. Poleg tega povečajo izražanje E-kadherina (protein adherentnih stikov) in okludina (protein tesnih

stikov), ki sta značilna za normalne urotelijske celice. Njihovo neinvazivno naravo smo potrdili z imunooznačevanjem N-kadherina, ki je mezenhimski označevalec rakavih celic in pokazali, da ga celice RT4 ne izražajo. Predvidevamo, da imajo pri zaviranju rasti rakavih urotelijskih celic ključno vlogo amnijske epiteljske celice (AEC). Na nosilcu eAM smo vzpostavili kokulture normalnih in rakavih urotelijskih celic RT4 ali T24, ki smo jih gojili 1 teden in v tem času spremljali dinamiko rasti normalnih in rakavih urotelijskih celic. Rast rakavih urotelijskih celic v kokulturi z normalnimi urotelijskimi celicami je bila na nosilcu eAM po 1 tednu gojenja za več kot 90 % manjša od rasti rakavih urotelijskih celic v kokulturi z normalnimi urotelijskimi celicami na sintetičnem nosilcu.

Testirali smo tudi vpliv AM na rast laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α in divjih tipov UPEC v tekočem in na trdnem gojišču. V poskusih smo uporabili krioshranjevano AM (kAM) in svežo AM (svAM), ki tekom priprave in shranjevanja nista prišli v stik z antibiotiki in antimikotikom. Uporabili smo tudi krioshranjevano AM, ki je tekom priprave prišla v stik z mešanico antibiotikov (penicilin, streptomycin, neomicin) in antimikotikom (amfotericin B), shranjena pa je bila v mediju za zamrzovanje, ki je vseboval gentamicin (kAM+atb). Ugotovili smo, da kAM in kAM+atb ne zavirata rasti laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α ali divjih tipov UPEC v tekočem gojišču. Nato smo testirali učinek kAM, svAM in kAM+atb na rast laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α in divjih tipov UPEC z difuzijsko metodo s koščkom AM ali homogenatom iz AM na trdnem gojišču. Ugotovili smo, da kAM in svAM ne zavirata rasti laboratorijskega seva *E. coli* DH5 α in divjih tipov UPEC, medtem ko kAM+atb zavira rast navedenih bakterij na trdnem gojišču. Pripravili smo mutante divjih sevov UPEC, ki so odporne proti gentamicinu (UPEC DL88-Gen^R, UPEC DL90-Gen^R), tako da smo izolirali plazmidno DNA, ki je nosila zapis za odpornost proti gentamicinu in nato plazmidno DNA z elektroporacijo vstavili v UPEC DL88 in UPEC DL90. Ugotovili smo, da kAM+atb ne zavira rasti UPEC DL88-Gen^R in UPEC DL90-Gen^R na trdnem gojišču. Na podlagi naših rezultatov sklepamo, da sama AM ne deluje protimikrobno in da je protimikrobni učinek kAM+atb posledica prisotnosti gentamicina v mediju za zamrzovanje, v katerem je kAM+atb shranjena.

Menimo, da bi AM, tretirano z antibiotiki, lahko uporabili kot obliž po operativni odstranitvi urotelijskih papilomov, saj bi AM inhibirala rast rakavih celic ter zmanjšala potencialno možnost recidivov in pooperativnih mikrobni okužb.

8 VIRI

- Aagaard K., Ma J., Antony K. M., Ganu R., Petrosino J., Versalovic, J. 2014. The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*, 6: 237-265.
- 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. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 287, 2: 305-318.
- Adamowicz J., Kowalczyk T., Drewa T. 2013. Tissue engineering of urinary bladder - current state of art and future perspectives. *Central European Journal of Urology*, 66, 2: 202-206.
- Akashi T., Miyagi T., Ando N., Suzuki Y., Nemoto T., Eishi Y., Nakamura K., Shirasawa T., Osa N., Tanaka N., Burgeson, R. E. 1999. Synthesis of basement membrane by gastrointestinal cancer cell lines. *Journal of Pathology*, 187: 223-228.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. 2015. *Molecular biology of the cell*. 6th ed. New York, Garland Science: 1341 str.
- Ali I., Kumar N., Ahmed S., Dasti J.I. 2014. Antibiotic resistance in uropathogenic *E. coli* strains isolated from non-hospitalized patients in Pakistan. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8, 9: DC01-DC04.
- Ali I., Rafaque Z., Ahmed S., Malik S., Dasti J.I. 2016. Prevalence of multi-drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* in Potohar region of Pakistan. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6, 1: 60-66.
- Anderson J.M., Van Itallie C.M. 1995. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *American Journal of Physiology*, 269, 4 Pt 1: G467-475.
- Anton-Culver H., Lee-Feldstein A., Taylor T. H. 1993. The association of bladder cancer risk with ethnicity, gender, and smoking. *Annals of Epidemiology*, 3, 4: 429-433.
- Apodaca G. 2004. The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic*, 5, 3: 117-128.
- ASCO. 2016. Practice and Research. Alexandria, American Society of Clinical Oncology: 7 str.
<http://www.asco.org> (april, 2016).
- ATCC. 2014. Products. Wezel, LGC Standards: 2 str.
<http://www.lgcstandards-atcc.org/> (april, 2016).
- Azuara-Blanco A., Pillai C.T., Dua H.S. 1999. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *British Journal of Ophthalmology*, 83, 4: 399-402.
- Babjuk M., Bohle A., Burger M., Comp  rat E., Kaasinen E., Palou J., Roupret M., van Rhijn B.W.G., Shariat S., Sylvester R., Zigeuner R. 2015. Guidelines on non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1 and CIS). *European Urology* 64, 2013: 639-635.

- Baguneid M.S., Seifalian A.M., Salacinski H.J., Murray D., Hamilton G., Walker M.G. 2006. Tissue engineering of blood vessels. *British Journal of Surgery*, 93, 3: 282-290.
- Bergfeld S.A., DeClerck Y.A. 2010. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Reviews*, 29: 249-261.
- Bhowmick N.A., Neilson E.G., Moses H.L. 2004. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432, 7015: 332-337.
- Birder L., Andersson K. E. 2013. Urothelial signaling. *Physiological Reviews*, 93, 2: 653-680.
- Bower J.M., Eto D.S., Mulvey M.A. 2005. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic*, 6, 1: 18-31.
- Bradford P.A. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 4: 933-951.
- Bray F., Ren J.S., Masuyer E., Ferlay J. 2013. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *International Journal of Cancer*, 132, 5: 1133-1145.
- Brucher B.L., Jamall I.S. 2014. Cell-cell communication in the tumor microenvironment, carcinogenesis and anticancer treatment. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34, 2: 213-243.
- Cairns R.A., Harris I.S., Mak T.W. 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11: 85-95.
- Campisi J. 2012. Aging, cellular senescence and cancer. *Annual Review of Physiology*, 75: 685-705.
- Cancer Research UK. 2016. Bladder cancer. London, Cancer Research UK: 6 str. <http://www.cancerresearchuk.org/> (april, 2016).
- Cantley L.C., Neel B G. 1999. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 8: 4240-4245.
- Casey M.L., MacDonald P.C. 1997. Keratinocyte growth factor expression in the mesenchymal cells of human amnion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82, 10: 3319-3323.
- Castillo-Martin M., Domingo-Domenech J., Karni-Schmidt O., Matos T., Cordon-Cardo C. 2010. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urologic Oncology*, 28, 4: 401-408.
- Cesare A.J., Reddel R.R. 2010. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nature Reviews Genetics*, 1, 5: 319-30.
- Chen C.L., Sung J., Cohen M., Chowdhury W.H., Sachs M.D., Li Y., Lakshmanan Y., Yung B.Y.M., Lupold S.E., Rodriguez R. 2006. Valproic acid inhibits invasiveness in

- bladder cancer but not in prostate cancer cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319: 533-542.
- Chen C.P., Chen Y.Y., Huang J.P., Wu Y.H. 2014. The effect of conditioned medium derived from human placental multipotent mesenchymal stromal cells on neutrophils: possible implications for placental infection. *Molecular Human Reproduction Journal*, 20: 1117-1125.
- Chen Y.H., Ko W.C., Hsueh P.R. 2013. Emerging resistance problems and future perspectives in pharmacotherapy for complicated urinary tract infections. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 14, 5: 587-596.
- Cheng L., Darson M., Cheville J.C., Neumann R.M., Zincke H., Nehra A., Bostwick D.G. 1999. Urothelial papilloma of the bladder. *Clinical and Biologic Implications Cancer*, 86: 2098-2101.
- Cheng N., Chytil A., Shyr Y., Joly A., Moses H.L. 2008. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Molecular Cancer Research*, 6, 10: 1521-1533.
- Cho I., Blaser M.J. 2012. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 13, 4: 260-270.
- Christofori G., Semb H. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends in Biochemical Sciences*, 24: 73-76.
- Cirman T., Beltram M., Schollmayer P., Rožman P., Erdani Kreft M. 2014. Amniotic membrane properties and current practice of amniotic membrane use in ophthalmology in Slovenia. *Cell and Tissue Banking*, 15, 2: 177-192.
- Coffelt S.B., Lewis C.E., Naldini L., Brown J.M., Ferrara N., De Palma M. 2010. Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors. *American Journal of Pathology*, 176: 1564-1576.
- Conway P.H., Cnaan A., Zaoutis T., Henry B.V., Grundmeier R.W., Keren R. 2007. Recurrent urinary tract infections in children: risk factors and association with prophylactic antimicrobials. *Jama*, 298, 2: 179-186.
- Cordon-Cardo C. 2008. Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 218: 154-165.
- Dahm P., Gschwend J.E. 2003. Malignant non-urothelial neoplasms of the urinary bladder. *European Urology*, 44: 672-681.
- Dobruch J., Daneshmand S., Fisch M., Lotan Y., Noon A.P., Resnick M.J., Shariat S.F., Zlotta A.R., Boorjian S.A. 2016. Gender and bladder cancer: a collaborative review of etiology, biology and outcomes. *European Urology*, 69: 300-310.
- Donders R., Vanheusden M., Bogie J.F., Ravanidis S., Thewissen K., Stinissen P., Gyselaers W., Hendriks J.A., Hellings N. 2015. Human Wharton's jelly-derived stem cells

- display immunomodulatory properties and transiently improve rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Transplantation*, 24: 2077-2098.
- Dong Q., Nelson D.E., Toh E., Diao L., Gao X., Fortenberry J.D., Van der Pol B. 2011. The microbial communities in male first catch urine are highly similar to those in paired urethral swab specimens. *PLoS One*, 6, 5: e19709, doi:10.1371/journal.pone.0019709: 14 str.
- Downward J. 1998. Ras signalling and apoptosis. *Current Opinion in Genetics and Development*, 8: 49-54.
- Dragin Jerman U., Erdani Kreft M. 2012. Amnijska membrana v tkivnem inženirstvu in regenerativni medicini. *Zdravniški vestnik*, 79: 707-715.
- Dragin Jerman U., Erdani Kreft M., Veranič P. 2015. Epithelial-mesenchymal interactions in urinary bladder and small intestine and how to apply them in tissue engineering. *Tissue Engineering, Part B Reviews*, 21, 6: 521-530.
- Dragin Jerman U., Veranič P., Erdani Kreft M. 2013. Amniotic membrane scaffolds enable the development of tissue-engineered urothelium with molecular and ultrastructural properties comparable to that of native urothelium. *Tissue Engineering Part C Methods*, 20, 4: 317-327.
- Dua H.S., Gomes J.A., King A.J., Maharajan V.S. 2004. The amniotic membrane in ophthalmology. *Survey of Ophthalmology*, 49: 51-77.
- Dyson N., Howley P.M., Munger K., Harlow E. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243, 4893: 934-937.
- Engeland A., Andersen A., Haldorsen T., Tretli S. 1996. Smoking habits and risk of cancers other than lung cancer: 28 years' follow-up of 26,000 Norwegian men and women. *Cancer Causes Control*, 7, 5: 497-506.
- Erdani Kreft M., Di Giandomenico D., Beznoussenko G.V., Resnik N., Mironov A.A., Jezernik K. 2010. Golgi apparatus fragmentation as a mechanism responsible for uniform delivery of uroplakins to the apikal plasma membrane of uroepithelial cells. *Biology of the cell*, 102, 11: 593-607.
- Erdani Kreft M., Dragin U. 2010. Amnijska membrana v tkivnem inženirstvu in regenerativni medicini. *Zdravniški Vestnik*, 79: 707-715.
- Erdani Kreft M., Hudoklin S., Sterle M. 2005. Establishment and characterization of primary and subsequent subcultures of normal mouse urothelial cells. *Folia Biologica*, 51, 5: 126-32.
- Erman A., Veranič P., Pšeničnik M., Jezernik K. 2006. Superficial cell differentiation during embryonic and postnatal development of mouse urothelium. *Tissue and Cell*, 38, 5: 293-301.

- Eto D.S., Jones T.A., Sundsbak J.L., Mulvey M.A. 2007. Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. PLoS Pathogens, 3, 7: e100, doi:10.1371/journal.ppat.0030100: 13 str.
- Evan G., Littlewood T. 1998. A matter of life and cell death. Science, 281, 5381: 1317-1322.
- Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M, Forman D., Bray F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International Journal of Cancer, 136, 5: 359-386.
- Ferlay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J., Rosso S., Coebergh J.W.W., Comber H., Forman D., Bray F. 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. European Journal of Cancer, 49: 1374-1403.
- Fernandez-Medarde A., Santos E. 2011. Ras in cancer and developmental diseases. Genes Cancer, 2, 3: 344-358.
- Fisher J.F., Kavanagh K., Sobel J.D., Kauffman C.A., Newman C. A. 2011. *Candida* urinary tract infection: pathogenesis. Clinical Infectious Diseases, 52, 6: S437-S451.
- Flores-Mireles A.L., Walker J.N., Caparon M., Hultgren S.J. 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nature Reviews Microbiology, 13, 5: 269-284.
- Fouts D.E., Pieper R., Szpakowski S., Pohl H., Knoblach S., Suh M.J., Huang S.T., Ljungberg I., Sprague B.M, Lucas S.K, Torralba M., Nelson K.E., Groah S. L. 2012. Integrated next-generation sequencing of 16S rDNA and metaproteomics differentiate the healthy urine microbiome from asymptomatic bacteriuria in neuropathic bladder associated with spinal cord injury. Journal of Translational Medicine, 10: 174-184.
- Foxman, B. 2002. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. American Journal of Medicine, 113 Suppl. 1A: 5s-13s.
- Foxman, B. 2003. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. Disease-a-Month, 49, 2: 53-70.
- Foxman, B. 2014. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. Infectious Disease Clinics of North America, 28, 1: 1-13.
- Fukuda K., Chikama T., Nakamura M., Nishida T. 1999. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. Cornea, 18, 1: 73-79.
- Fynan T.M., Reiss M. 1993. Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis. Critical Reviews in Oncology, 4, 5: 493-540.
- Garau J. 2008. Other antimicrobials of interest in the era of extended-spectrum beta-lactamases: fosfomycin, nitrofurantoin and tigecycline. Clinical Microbiology and Infection, 14, Suppl. 1: 198-202.

- Gildea J.J., Golden W.L., Harding M.A., Theodorescu D. 2000. Genetic and phenotypic changes associated with the acquisition of tumorigenicity in human bladder cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 27, 3: 252-263.
- Goebell P. J., Knowles M. A. 2010. Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium. *Urologic Oncology*, 28: 409-428.
- Goers L., Freemont P., Polizzi K.M. 2014. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *Journal of Royal Science Interface*, 11, 96: 201-214.
- Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. 2010. Immunity, inflammation and cancer. *Cell*, 140: 883-899.
- Gupta K., Bhadelia N. 2014. Management of urinary tract infections from multidrug-resistant organisms. *Infectious Disease Clinics of North America*, 28, 1: 49-59.
- Haefliger J.A., Tissieres P., Tawadros T., Formenton A., Beny J.L., Nicod P., Frey P., Meda P. 2002. Connexins 43 and 26 are differentially increased after rat bladder outlet obstruction. *Experimental Cell Research*, 274, 2: 216-225.
- Hanahan D., Folkman J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86, 3: 353-364.
- Hanahan D., Weinberg R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.
- Hanahan D., Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674.
- Hannan T.J., Totsika M., Mansfield K.J., Moore K.H., Schembri M.A., Hultgren S.J. 2012. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 3: 616-648.
- Hao Y., Ma D.H., Hwang D.G., Kim W.S., Zhang F. 2000. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*, 19, 3: 348-352.
- Hardee M.E., Dewhirst M.W., Agarwal N., Sorg B.S. 2009. Novel imaging provides new insights into mechanisms of oxygen transport in tumors. *Current Molecular Medicine*, 9: 435-441.
- Harrington R.D., Hooton T.M. 2000. Urinary tract infection risk factors and gender. *Journal of Gender Specific Medicine*, 3, 8: 27-34.
- Harris C.C. 1996. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *Journal of the National Cancer Institute*, 88, 20: 1442-1455.
- Heney N.M., Ahmed S., Flanagan M.J., Frable W., Corder M.P., Hafermann M.D., Hawkins I.R. 1983. Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *Journal of Urology*, 130, 6: 1083-1086.

- Hicks R.M. 1965. The fine structure of the transitional epithelium of rat ureter. *Journal of Cell Biology*, 26, 1: 25-48.
- Hicks R.M. 1975. The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 50, 2: 215-246.
- Hilt E.E., McKinley K., Pearce M.M., Rosenfeld A.B., Zilliox M.J., Mueller E.R., Brubaker L., Gai X., Wolfe A.J., Schreckenberger P.C. 2014. Urine is not sterile: use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder. *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 3: 871-876.
- Hooton T.M. 2012. Clinical practice. Uncomplicated urinary tract infection. *New England Journal of Medicine*, 366, 11: 1028-1037.
- Hooton T.M., Stamm W.E. 1997. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infectious Disease Clinic of North America*, 11, 3: 551-581.
- Hossler F.E., Monson F.C. 1995. Microvasculature of the rabbit urinary bladder. *Anatomical Record*, 243, 4: 438-448.
- Hsiao Y.C., Lee H.W., Chen Y.T., Young T.H., Yang T.L. 2011. The impact of compositional topography of amniotic membrane scaffold on tissue morphogenesis of salivary gland. *Biomaterials*, 32: 4424-4432.
- Hudoklin S., Jezernik K., Neumuller J., Pavelka M., Romih R. 2012. Electron tomography of fusiform vesicles and their organization in urothelial cells. *PLoS One*, 7, 3, doi: 10.1371/journal.pone.0032935: 8 str.
- Hudson M.A., McReynolds L.M. 1997. Urokinase and the urokinase receptor: association with *in vitro* invasiveness of human bladder cancer cell lines. *Journal of National Cancer Institute*, 89, 10: 709-717.
- Ilancheran S., Michalska A., Peh G., Wallace E.M., Pera M., Manuelpillai U. 2007. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biology of Reproduction*, 77: 577-588.
- Jacobsen S.M., Shirliff M.E. 2011. *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Virulence*, 2, 5: 460-465.
- Jacobsen S.M., Stickler D.J., Mobley H.L., Shirliff M.E. 2008. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 1: 26-59.
- Jaganathan H., Gage J., Leonard F., Srinivasan S., Souza G.R., Dave B., Godin B. 2014. Three-dimensional *in vitro* co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. *Scientific Reports*, 4, doi: 10.1038/srep06468: 14 str.
- Jiao H., Guan F., Yang B., Li J., Song L., Hu X., Du Y. 2012. Human amniotic membrane derived-mesenchymal stem cells induce C6 glioma apoptosis *in vivo* through the Bcl-2/caspase pathways. *Molecular Biology Reports*, 39, 1: 467-473.

- Jin E., Kim T.H., Han S., Kim S.W. 2015. Amniotic epithelial cells promote wound healing in mice through high epithelialization and engraftment. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 10, 7: 613-622.
- Johnson C.C. 1991. Definitions, classification, and clinical presentation of urinary tract infections. *Medical Clinics of North America*, 75, 2: 241-252.
- Jones J.C. 2001. Hemidesmosomes in bladder epithelial cells. *Urology*, 57, 6: 475-490.
- Jost S.P., Gosling J.A., Dixon J.S. 1989. The morphology of normal human bladder urothelium. *Journal of Anatomy*, 167, 103-115.
- Kang N.H., Hwang K.A., Kim S.U., Kim Y.B., Hyun S.H., Jeung E.B., Choi K.C. 2012. Potential antitumor therapeutic strategies of human amniotic membrane and amniotic fluid-derived stem cells. *Cancer Gene Therapy*, 19: 517-522.
- Kantor A.F., Hartge P., Hoover R.N., Narayana A.S., Sullivan J.W., Fraumeni J.F. 1984. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *American Journal of Epidemiology*, 119, 4: 510-515.
- Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 2: 123-140.
- Kaufman D.S., Shipley W.U., Feldman A.S. 2009. Bladder cancer. *Lancet*, 374: 239-249.
- Kennedy K.M., Dewhirst M.W. 2010. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncology*, 6: 127-148.
- Khandelwal P., Abraham S.N., Apodaca G. 2009. Cell biology and physiology of the uroepithelium. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 297, 6: 1477-1501.
- Kim J.C., Tseng S.C. 1995. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean Journal of Ophthalmology*, 9, 1: 32-46.
- Kim J.S., Kim J.C., Hahn T.W., Park W.C. 2001. Amniotic membrane transplantation in infectious corneal ulcer. *Cornea*, 20, 7: 720-726.
- Kim J.S., Kim J.C., Na B.K., Jeong J.M., Song C.Y. 2000. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Experimental Eye Research*, 70, 3: 329-337.
- Kim S.W., Zhang H.Z., Guo L., Kim J.M., Kim M.H. 2012. Amniotic mesenchymal stem cells enhance wound healing in diabetic NOD/SCID mice through high angiogenic and engraftment capabilities. *PLoS One*, 7, 7: e41105, doi: 10.1371/journal.pone.0041105: 11 str.
- Kjaergaard N., Hein M., Hyettel L., Helmig R.B., Schonheyder H.C., Uldbjerg N., Madsen H. 2001. Antibacterial properties of human amnion and chorion *in vitro*. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*, 94, 2: 224-229.

- Kline K.A., Schwartz D.J., Lewis W.G., Hultgren S.J., Lewis A.L. 2011. Immune activation and suppression by group B *Streptococcus* in a murine model of urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 79, 9: 3588-3595.
- Knowles M.A., Hurst C.D. 2015. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nature Reviews Cancer*, 15, 1: 25-41.
- Koizumi N.J., Inatomi T.J., Sotozono C.J., Fullwood N.J., Quantock A.J., Kinoshita S. 2000. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Current Eye Research*, 20, 3: 173-177.
- Koob T.J., Lim J.J., Masee M., Zabek N., Denoziere G. 2014. Properties of dehydrated human amnion/chorion composite grafts: implications for wound repair and soft tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research part B: Applied Biomaterials*, 102, 6: 1353-1362.
- Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Hultgren S.J. 2013. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3, 4: a010306, doi:10.1101/cshperspect.a010306: 16 str.
- Kronsteiner B., Peterbauer-Scherb A., Grillari-Voglauer R., Redl H., Gabriel C., van Griensven M., Wolbank S. 2011. Human mesenchymal stem cells and renal tubular epithelial cells differentially influence monocyte-derived dendritic cell differentiation and maturation. *Cellular Immunology*, 267: 30-38.
- Kubo M., Sonoda Y., Muramatsu R., Usui M. 2001. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42, 7: 1539-1546.
- La Vecchia C., Negri E., D'Avanzo B., Savoldelli R., Franceschi S. 1991. Genital and urinary tract diseases and bladder cancer. *Cancer Research*, 51, 2: 629-631.
- Lasič E., Višnjar T., Erdani Kreft M. 2015. Properties of the urothelium that establish the blood-urine barrier and their implications for drug delivery. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 168: 1-29.
- Lee G., Romih R., Zupančič D. 2014. Cystitis: from urothelial cell biology to clinical applications. *BioMed Research International*, 2014: 473536, doi:10.1155/2014/473536: 8 str.
- Levison M.E., Kaye D. 2013. Treatment of complicated urinary tract infections with an emphasis on drug-resistant gram-negative uropathogens. *Current Infectious Diseases Reports*, 15, 2: 109-115.
- Lewis D.A., Brown R., Williams J., White P., Jacobson S.K., Marchesi J.R., Drake M.J. 2013. The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. *Frontiers in Cellular and Infectious Microbiology*, 3, 41, doi:10.3389/fcimb.2013.00041: 11 str.

- Lewis S.A., Eaton D.C., Diamond J.M. 1976. The mechanism of Na⁺ transport by rabbit urinary bladder. *Journal of Membrane Biology*, 28, 1: 41-70.
- Li J., Koike-Soko C., Sugimoto J., Yoshida T., Okabe M., Nikaido T. 2015. Human amnion-derived stem cells have immunosuppressive properties on NK cells and monocytes. *Cell Transplantation*, 24: 2065-2076.
- Li W., He H., Kawakita T., Espana E.M., Tseng S.C. 2006. Amniotic membrane induces apoptosis of interferon-gamma activated macrophages *in vitro*. *Experimental Eye Research*, 82, 2: 282-292.
- Lichtenberger P., Hooton T.M. 2008. Complicated urinary tract infections. *Current Infectious Disease Reports*, 10, 6: 499-504.
- Lindenmair A., Hatlapatka T., Kollwig G., Hennerbichler S., Gabriel C., Wolbank S., Redl H., Kasper C. 2012. Mesenchymal stem or stromal cells from amnion and umbilical cord tissue and their potential for clinical applications. *Cells*, 1: 1061-1088.
- Lipophilic tracers - DiI, DiO, DiD, DiA and DiR. 2013. Waltham, ThermoFisher Scientific: 12 str.
<https://www.thermofisher.com> (april, 2016).
- Liu J., Sheha H., Fu Y., Liang L., Tseng S.C. 2010. Update on amniotic membrane transplantation. *Expert Review of Ophthalmology*, 5, 5: 645-661.
- Liu Y., Memet S., Saban R., Kong X., Aprikian P., Sokurenko E., Sun T., Wu X. 2015. Dual ligand/receptor interactions activate urothelial defenses against uropathogenic *E. coli*. *Scientific Reports*, 5: 16234, doi: 10.1038/srep16234: 18 str.
- Lo V., Pope E. 2009. Amniotic membrane use in dermatology. *International Journal of Dermatology*, 48: 935-940.
- Lober V.H., Brech A., Pedersen N.M., Wesche J., Oppelt A., Malerod L., Stenmark H. 2010. Ubiquitination of alpha 5 beta 1 integrin controls fibroblast migration through lysosomal degradation of fibronectin-integrin complexes. *Developmental Cell*, 19: 148-159.
- Lukacz E.S., Sampselle C., Gray M., Macdiarmid S., Rosenberg M., Ellsworth P., Palmer M.H. 2011. A healthy bladder: a consensus statement. *International Journal of Clinical Practice*, 65, 10: 1026-1036.
- Ma L., Zhou Z., Zhang D., Yang S., Wang J., Xue F., Yang Y., Yang R. 2012. Immunosuppressive function of mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix in immune thrombocytopenia patients. *Thrombosis and Haemostasis*, 107: 937-950.
- Magatti M., Caruso M., De Munari S., Vertua E., De D., Manuelpillai U., Parolini O. 2015. Human amniotic membrane-derived mesenchymal and epithelial cells exert different effects on monocyte-derived dendritic cell differentiation and function. *Cell Transplantation*, 24: 1733-1752.

- Magatti M., De Munari S., Vertua E., Parolini O. 2012. Amniotic membrane-derived cells inhibit proliferation of cancer cell line by inducing cell cycle arrest. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16, 9: 2208-2218.
- Mahfouz W., Elsalmy S., Corcos J., Fayed A.S. 2013. Fundamentals of bladder tissue engineering. *African Journal of Urology*, 19, 2: 51-57.
- Malhotra C., Jain A.K. 2014. Human amniotic membrane transplantation: Different modalities of its use in ophthalmology. *World Journal of Transplantation*, 4, 2: 111-121.
- Mamede A.C., Botelho M.F. 2015. Amniotic membrane – origin, characterization and medical applications. 1st ed. Amsterdam, Springer Netherlands: 254 str.
- Manuelpillai U., Moodley Y., Borlongan C.V., Parolini O. 2011. Amniotic membrane and amniotic cells: potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis? *Placenta*, 32, Suppl. 4: S320-S325.
- Martin I., Wendt D., Heberer M. 2004. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 22: 80-86.
- Medical dictionary. 2016. Bethesda, U.S. National Library of Medicine: 243 str. <http://www.nlm.nih.gov> (maj, 2016).
- Mehats C., Schmitz T., Marcellin L., Breuiller-Fouche M. 2011. Biochemistry of fetal membranes rupture. *Gynecologie Obstetrique & Fertilité*, 39, 6: 365-369.
- Meller D., Pires R.T., Tseng S.C. 2002. *Ex vivo* preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. *British Journal of Ophthalmology*, 86, 4: 463-471.
- Mencucci R., Menchini U., Dei R. 2006. Antimicrobial activity of antibiotic-treated amniotic membrane: an *in vitro* study. *Cornea*, 25, 4: 428-431.
- Miki T., Lehmann T., Cai H., Stolz D.B., Strom S.C. 2005. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*, 23: 1549-1559.
- Miki Y., Ono K., Hata S., Suzuki T., Kumamoto H., Sasano H. 2012. The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating *in vivo* environment. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 131, 3/5: 68-75.
- Min G., Wang H., Sun T.T., Kong X.P. 2006. Structural basis for tetraspanin functions as revealed by the cryo-EM structure of uroplakin complexes at 6-A resolution. *Journal of Cell Biology*, 173, 6: 975-983.
- Mougiakakos D., Choudhury A., Lladser A., Kiessling R., Johansson C.C. 2010. Regulatory T cells in cancer. *Advances in Cancer Research*, 107: 57-117.
- Mulvey M.A. 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, 4: 257-271.
- Murdoch C., Muthana M., Coffelt S.B., Lewis C.E. 2008. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 8: 618-631.

- Murphy C., Karnes R. 2014. Bladder cancer in males: a comprehensive review of urothelial carcinoma of the bladder. *Journal of Men's Health*, 11, 1: 18-27.
- Muruganandham K., Dubey D., Kapoor R. 2007. Acute urinary retention in benign prostatic hyperplasia: Risk factors and current management. *Indian Journal of Urology*, 23, 4: 347-353.
- National Institutes of Health. 2016. U.S. National Institutes of Health clinical trials database. Bethesda, National Institutes of Health: 24 str.
<https://clinicaltrials.gov/> (april, 2016)
- Nelson D.E., Dong Q., Van der Pol B., Toh E., Fan B., Katz B.P., Mi D., Rong R., Weinstock G.M., Sodergren E., Fortenberry J.D. 2012. Bacterial communities of the coronal sulcus and distal urethra of adolescent males. *PLoS One*, 7, 5: e36298, doi:10.1371/journal.pone.0036298: 9 str.
- Nelson D.E., Van Der Pol B., Dong Q., Revanna K.V., Fan B., Easwaran S., Sodergren E., Weinstock G.M., Diao L., Fortenberry J.D. 2010. Characteristic male urine microbiomes associate with asymptomatic sexually transmitted infection. *PLoS One*, 5, 11: e14116, doi:10.1371/journal.pone.0014116: 7 str.
- Nema R., Khare S. 2012. An animal cell culture: advance technology for modern research. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 3: 219-226.
- Nielubowicz G.R., Mobley H.L. 2010. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nature Reviews Urology*, 7, 8: 430-441.
- Niknejad H., Khayat-Khoei M., Peirovi H., Abolghasemi H. 2014. Human amniotic epithelial cells induce apoptosis of cancer cells: a new anti-tumor therapeutic strategy. *Cytotherapy*, 16: 33-40.
- Niknejad H., Paeini-Vayghan G., Tehrani F.A., Khayat-Khoei M., Peirovi H. 2013. Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. *Placenta*, 34: 340-345.
- Niknejad H., Peirovi H., Jorjani M., Ahmadiani A., Ghanavi J., Seifalian A.M. 2008. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *European Cells and Materials*, 15: 88-99.
- Niveditha S., Pramodhini S., Umadevi S., Kumar S., Stephen S. 2012. The isolation and the biofilm formation of uropathogens in the patients with catheter associated urinary tract infections (UTIs). *Journal of Clinical Diagnosis Research*, 6, 9: 1478-1482.
- O'Brien F.J. 2011. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14, 3: 88-95.
- Onkološki inštitut. 2016. Urogenitalni raki. Ljubljana, Onkološki inštitut: 1 str.
<http://www.onko-i.si/> (junij, 2016)
- Orabi H., Bouhout S., Morissette A., Rousseau A., Chabaud S., Bolduc S. 2013. Tissue engineering of urinary bladder and urethra: advances from bench to patients. *Scientific World Journal*, 2013, doi: 10.1155/2013/154564: 13 str.

- Ouellet-Hellstrom R., Rensch J.D. 1996. Bladder cancer incidence in arylamine workers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 38, 12: 1239-1247.
- Paolini-Vayghan G., Peirovi H., Niknejad H. 2011. Inducing of angiogenesis is the net effect of the amniotic membrane without epithelial cells. *Iranian Journal of Medical Hypotheses and Ideas*, 5: 16-28.
- Paner G.P., Ro J.Y., Wojcik E.M., Venkataraman G., Datta M.W., Amin M.B. 2007. Further characterization of the muscle layers and lamina propria of the urinary bladder by systematic histologic mapping: implications for pathologic staging of invasive urothelial carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology*, 31: 1420-1429.
- Park D.S., Park J.H., Lee J.L., Lee J.M., Kim Y.H., Lee J.M., Kim S.J. 1997. Induction of ICAM-1, HLA-DR molecules by IFN-gamma and oncogene expression in human bladder cancer cell lines. *Urologia Internationalis*, 59, 2: 72-80.
- Park J.C., Citrin D.E., Agarwal P.K., Apolo A.B. 2014. Multimodal management of muscle-invasive bladder cancer. *Current Problems in Cancer*, 38, 3: 80-108.
- Parolini O., Alviano F., Bagnara G.P., Bilic G., Buhring H.J., Evangelista M., Hennerbichler S., Liu B., Magatti M., Mao N., Miki T., Marongiu F., Nakajima H., Nikaido T., Portmann-Lanz C.B., Sankar V., Soncini M., Stadler G., Surbek D., Takahashi T.A., Redl H., Sakuragawa N., Wolbank S., Zeisberger S., Zisch A., Strom S.C. 2008. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*, 26: 300-311.
- Parolini O., De D., Rodrigues M., Caruso M. 2014a. Placental stem/progenitor cells: isolation and characterization perinatal stem cells. V: *Perinatal Stem Cells*. 1st ed. Atala A., Murphy S.V. (eds.). New York, Springer: 141-156.
- Parolini O., Souza-Moreira L., O'Valle F., Magatti M., Hernandez-Cortes P., Gonzalez-Rey E., Delgado M. 2014b. Therapeutic effect of human amniotic membrane-derived cells on experimental arthritis and other inflammatory disorders. *Arthritis and Rheumatology*, 66, 2: 327-339.
- Parry S., Strauss J.F 3rd. 1998. Premature rupture of the fetal membranes. *New England Journal of Medicine*, 338: 663-670.
- Parsons C.L., Boychuk D., Jones S., Hurst R., Callahan H. 1990. Bladder surface glycosaminoglycans: an epithelial permeability barrier. *Journal of Urology*, 143, 1: 139-142.
- Parsons D.W., Jones S., Zhang X., Lin J.C., Leary R.J., Angenendt P., Mankoo P., Carter H., Siu I., Gallia G.L., Olivi A., McLendon R., Rasheed B.A., Keir S., Nikolskaya T., Nikolsky Y., Busam D.A., Tekleab H., Diaz L.A., Hartigan J., Smith D.R., Strausberg R.L., Marie S.K.N., Shinjo S.M.O., Yan H., Riggins G.J., Bigner D.D., Karchin R., Papadopoulos N., Parmigiani G., Vogelstein B., Velculescu V.E.,

- Kinzler K. W. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 321, 5897: 1807-1812.
- Parthasarathy M., Sasikala R., Gunasekaran P., Raja J. 2014. Antimicrobial activity of human amniotic and chorionic membranes. *Journal of Academia and Industrial Research*, 2, 10: 545-547.
- Paterson D.L. 2006. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Medicine*, 119, 6: S20-S28.
- Pearce M.M., Hilt E.E., Rosenfeld A.B., Zilliox M.J., Thomas-White K., Fok C., Kliethermes S., Schreckenberger P.C., Brubaker L., Gai X., Wolfe A.J. 2014. The female urinary microbiome: a comparison of women with and without urgency urinary incontinence. *MBio*, 5, 4: e01283-01214, doi:10.1128/mBio.01283-14: 14 str.
- Pećina-Šlaus N. 2003. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell international*, 3, 1: 17-24.
- Pendleton J.N., Gorman S.P., Gilmore B.F. 2013. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11, 3: 297-308.
- Peter S. 1978. The junctional connections between the cells of the urinary bladder in the rat. *Cell and Tissue Research*, 187, 3: 439-448.
- Pianta S., Bonassi P.S., Muradore I., Rodrigues M.F., Rossi D., Silini A., Parolini O. 2015. Amniotic membrane mesenchymal cells-derived factors skew T cell polarization toward Treg and downregulate Th1 and Th17 cells subsets. *Stem Cell Reviews and Reports*, 11, 3: 394-407.
- Pitti R.M., Marsters S.A., Lawrence D.A., Roy M., Kischkel F.C., Dowd P., Huang A., Donahue C.J., Sherwood S.W., Baldwin D.T., Godowski P.J., Wood W.I., Gurney A.L., Hillan K.J., Cohen R.L., Goddard A.D., Botstein D., Ashkenazi, A. 1998. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*, 396, 6712: 699-703.
- Pollard S.M., Aye N.N., Symonds E.M. 1976. Scanning electron microscope appearances of normal human amnion and umbilical cord at term. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 83, 6: 470-477.
- Polykandriotis E., Popescu L.M., Horch R.E. 2010. Regenerative medicine: then and now-an update of recent history into future possibilities. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14, 10: 2350-2358.
- Porter K.R., Kenyon K., Badenhausen S. 1967. Specializations of the unit membrane. *Protoplasma*, 63, 1: 262-274.
- Portmann-Lanz C.B., Schoeberlein A., Huber A., Sager R., Malek A., Holzgreve W., Surbek D.V. 2006. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *American Journal Obstetrics and Gynecology*, 194: 664-673.

- Prasad S.M., Decastro G.J., Steinberg G.D. 2011. Urothelial carcinoma of the bladder: definition, treatment and future efforts. *Nature Reviews Urology*, 8: 631-642.
- Ro J.Y., Staerckel G.A., Ayala A.G. 1992. Cytologic and histologic features of superficial bladder cancer. *Urologic Clinics of North America*, 19, 3: 435-453.
- Rocha M.S.C., Baptista C.J.M. 2015. Biochemical properties of amniotic membrane. V: *Amniotic Membrane*. Mamede A.C., Botelho M.F. (eds.). Amsterdam, Springer: 19-40.
- Romih R., Korosec P., de Mello W., Jezernik K. 2005. Differentiation of epithelial cells in the urinary tract. *Cell and Tissue Research*, 320, 2: 259-268.
- Ronald A. 2003. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Disease-a-Month*, 49, 2: 71-82.
- Russo T.A., Johnson J.R. 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *Journal of Infectious Diseases*, 181, 5: 1753-1754.
- Saeki H., Sugimachi K. 2001. Carcinogenic risk factors. *Journal of the Japan Medical Association*, 125: 297-300.
- Scholes D., Hooton T.M., Roberts P.L., Stapleton A.E., Gupta K., Stamm W.E. 2000. Risk factors for recurrent urinary tract infection in young women. *Journal of Infectious Diseases*, 182, 4: 1177-1182.
- Schwartz D.J., Chen S.L., Hultgren S.J., Seed P.C. 2011. Population dynamics and niche distribution of uropathogenic *Escherichia coli* during acute and chronic urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 79, 10: 4250-4259.
- Sheinfeld J., Schaeffer A.J., Cordon-Cardo C., Rogatko A., Fair W.R. 1989. Association of the Lewis blood-group phenotype with recurrent urinary tract infections in women. *New England Journal Medicine*, 320, 12: 773-777.
- Siddiqui H., Nederbragt A.J., Lagesen K., Jeansson S.L., Jakobsen K.S. 2011. Assessing diversity of the female urine microbiota by high throughput sequencing of 16S rDNA amplicons. *BMC Microbiology*, 11, 244: doi:10.1186/1471-2180-11-244: 12 str.
- Siegel R., Ward E., Brawley O., Jemal A. 2011. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA: Cancer Journal for Clinicians*, 61: 212-236.
- Silini A.R., Cargnoni A., Magatti M., Pianta S., Parolini O. 2015. The Long Path of Human Placenta, and Its Derivatives, in *Regenerative Medicine*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3: 162-172.
- Slovenski medicinski slovar. 2014. 5. izd. Kališnik M. (ur.) Ljubljana, Medicinska fakulteta, Zdravniška zbornica Slovenije: 588-588.
- Sniadecki N.J., Desai R.A., Ruiz S.A., Chen C.S. 2006. Nanotechnology for cell-substrate interactions. *Annals of Biomedical Engineering*, 34, 1: 59-74.

- Svanborg C., Godaly G. 1997. Bacterial virulence in urinary tract infection. *Infectious Disease Clinics of North America*, 11, 3: 513-529.
- Szekeres-Bartho J. 2002. Immunological relationship between the mother and the fetus. *International reviews of immunology*, 21, 6: 471-495.
- Talmi Y.P., Sigler L., Inge E., Finkelstein Y., Zohar Y. 1991. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta*, 12, 3: 285-288.
- Tehrani F.A., Ahmadiani A., Niknejad H. 2013. The effects of preservation procedures on antibacterial property of amniotic membrane. *Cryobiology*, 67: 293-298.
- Teng J., Wang Z., Jarrard D.F., Bjorling D.E. 2008. Roles of estrogen receptor α and β in modulating urothelial cell proliferation. *Endocrine-related Cancer*, 15, 1: 351-364.
- Toda A., Okabe M., Yoshida T., Nikaido T. 2007. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *Journal of Pharmacological Sciences*, 105: 215-228.
- Trepel J., Mollapour M., Giaccone G., Neckers L. 2010. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10: 537-549.
- Truschel S.T., Wang E., Ruiz W.G., Leung S.M., Rojas R., Lavelle J., Ziedel M., Stoffer D., Apodaca, G. 2002. Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 3: 830-846.
- 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. *Journal of Cellular Physiology*, 179, 3: 325-335.
- Tumor grade. 2016. Bethesda, National Cancer Institute: 3 str.
<http://www.cancer.gov> (maj, 2016).
- Ungefroren H., Sebens S., Seidl D., Lehnert H., Hass R. 2011. Interaction of tumor cells with the microenvironment. *Cell communication and signaling*, 9, 18: doi: 10.1186/1478-811X-9-18: 9 str.
- Varley C.L., Garthwaite M.A., Cross W., Hinley J., Trejdosiewicz L.K., Southgate, J. 2006. PPARgamma-regulated tight junction development during human urothelial cytodifferentiation. *Journal of Cellular Physiology*, 208, 2: 407-417.
- Veranič P., Erman A., Kerec-Kos M., Bogataj M., Mrhar A., Jezernik K. 2009. Rapid differentiation of superficial urothelial cells after chitosan-induced desquamation. *Histochemistry and Cell Biology*, 131, 1: 129-139.
- Veranič P., Jezernik K. 2002. Trajectorial organisation of cytokeratins within the subapical region of umbrella cells. *Cellular Motility and Cytoskeleton*, 53, 4: 317-325.
- Višnjar T., Kocbek P., Erdani Kreft M. 2012. Hyperplasia as a mechanism for rapid resealing urothelial injuries and maintaining high transepithelial resistance. *Histochemistry and Cell Biology*, 137: 177-186.

- Walgenbach K.J., Voigt M., Riabikhin A.W., Andree C., Schaefer D.J., Galla T.J., Bjorn G. 2001. Tissue engineering in plastic reconstructive surgery. *Anatomical Record*, 263, 4: 372-378.
- Walz T., Haner M., Wu X.R., Henn C., Engel A., Sun T.T., Aebi U. 1995. Towards the molecular architecture of the asymmetric unit membrane of the mammalian urinary bladder epithelium: a closed "twisted ribbon" structure. *Journal of Molecular Biology*, 248, 5: 887-900.
- Wang X., Xie J., Tan L., Huo J., Xie H. 2012. Epithelium of human fresh amniotic membrane has antimicrobial effects *in vitro*. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 21: 4533-4537.
- Whiteside S.A., Razvi H., Dave S., Reid G., Burton J.P. 2015. The microbiome of the urinary tract - a role beyond infection. *Nature Reviews Urology*, 12, 2: 81-90.
- Willner D., Low S., Steen J.A., George N., Nimmo G.R., Schembri M.A., Hugenholtz P. 2014. Single clinical isolates from acute uncomplicated urinary tract infections are representative of dominant *in situ* populations. *MBio*, 5, 2: e01064-01013, doi:10.1128/mBio.01064-13: 10 str.
- Wilshaw S.P., Kearney J.N., Fisher J., Ingham E. 2006. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Engineering*, 12, 8: 2117-2129.
- Wolfe A.J., Toh E., Shibata N., Rong R., Kenton K., Fitzgerald, M., Mueller E.R., Schreckenberger P., Dong Q., Nelson D.E., Brubaker L. 2012. Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 4: 1376-1383.
- Wu X.R., Kong X.P., Pellicer A., Kreibich G., Sun T.T. 2009. Uroplakins in urothelial biology, function, and disease. *Kidney International*, 75, 11: 1153-1165.
- Yamahara K., Harada K., Ohshima M., Ishikane S., Ohnishi, S., Tsuda H., Otani K., Taguchi A., Soma T., Ogawa H., Katsuragi S., Yoshimatsu J., Harada-Shiba M., Kengawa K., Ikeda, T. 2014. Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 9, 2: e88319, doi: 10.1371/journal.pone.0088319: 7 str.
- Yamamoto M., Wu H.H., Momose H., Rademaker A., Oyasu R. 1992. Marked enhancement of rat urinary bladder carcinogenesis by heat-killed *Escherichia coli*. *Cancer Research*, 52, 19: 5329-5333.
- Yan F., Polk D.B. 2004. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Current Opinion in Gastroenterology*, 20, 6: 565-571.
- Yang L., Pang Y., Moses H.L. 2010. TGF-beta and immune cells: and important regulatory axis in the tumor environment and progression. *Trend in Immunology*, 31: 220-227.

- Yu J., Manabe M., Sun T.T. 1992. Identification of an 85-100 kDa glycoprotein as a cell surface marker for an advanced stage of urothelial differentiation: association with the inter-plaque ('hinge') area. *Epithelial Cell Biology*, 1, 1: 4-12.
- Zaghloul M.S. 2012. Bladder cancer and schistosomiasis. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 24, 4: 151-159.
- Zaslavsky A., Baek K.H., Lynch R.C., Short S., Grillo J., Folkman J., Italiano J.E.Jr., Ryeom, S. 2010. Platelet-derived thrombospondin-1 is a critical negative regulator and potential biomarker of angiogenesis. *Blood*, 115, 22: 4605-4613.
- Zhang L., Foxman B., Manning S.D., Tallman P., Marrs C.F. 2000. Molecular epidemiologic approaches to urinary tract infection gene discovery in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 68, 4: 2009-2015.
- Zhang Y., Atala A. 2013. Urothelial cell culture: stratified urothelial sheet and three-dimensional growth of urothelial structure. *Methods in Molecular Biology*, 945: 383-399.
- Zhao H., Yuan X., Jiang J., Wang P., Sun X., Wang D., Zheng Q. 2014. Antimetastatic effects of licochalcone B on human bladder carcinoma T24 by inhibition of matrix metalloproteinases-9 and NF- κ B activity. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 115, 6: 527-533.
- Železnik T. 2014. Uporaba nosilcev iz amnijske membrane za zaviranje rasti rakavih urotelijskih celic. Raziskovalno delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 73 str.

ZAHVALA

S spoštovanjem se oziram na naše sijajne učitelje, s hvaležnostjo pa na tiste, ki so se dotaknili naših človeških čustev.

Carl Gustav Jung

Vesela sem, da sem imela priložnost delati z odličnimi znanstveniki in čudovitimi ljudmi, ki so številne ure potrpežljivo posvetili mentoriranju, poučevanju in odgovarjanju na moja mnoga vprašanja. Še posebej iskrena hvala mentorici prof. dr. Mateji Erdani Kreft in somentorici prof. dr. Marjanci Starčič Erjavec, predsedniku komisije za zagovor magistrske naloge prof. dr. Alojzu Ihanu in recenzentki prof. dr. Ines Mandić Mulec. Hvala tudi Urški Dragin Jerman, dr. Tanji Višnjari, Sanji Čabradi, Nadi Pavlici Dubarič, Lindi Štrus, Sabini Železnik in vsem ostalim z Inštituta za biologijo celice, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani, dr. Zdravku Podlesku, Gregorju Bajcu in Barbari Kastelic Bokal z Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani ter dr. Tini Cirman z Zavoda za transfuzijsko medicino, Univerzitetni klinični center Ljubljana.

Zagotovo pa mi največ pomeni to, da so mi vedno stali ob strani moji najbližji. Hvala, da tako vztrajno in neumorno navijate zame, z vami je vse lažje in lepše.

PRILOGE

Priloga A: Dinamika rasti celic RT4 na nosilcih iz AM in na sintetičnem nosilcu.

Povprečna prekritost nosilca s celicami RT4 (% $\pm$ SE)				
Dan trajanja poskusa	eAM	gAM	sAM	Sintetični nosilec
1	4,68 $\pm$ 0,09	10,20 $\pm$ 1,84	5,63 $\pm$ 1,54	71,52 $\pm$ 5,46
2	3,93 $\pm$ 0,78	15,28 $\pm$ 2,56	7,41 $\pm$ 1,35	82,25 $\pm$ 5,16
3	6,12 $\pm$ 1,76	26,85 $\pm$ 4,00	12,64 $\pm$ 2,65	88,78 $\pm$ 5,17
7	24,70 $\pm$ 3,14	83,52 $\pm$ 4,86	46,78 $\pm$ 5,65	99,70 $\pm$ 0,19
14	25,71 $\pm$ 3,04	90,07 $\pm$ 2,45	68,71 $\pm$ 5,88	99,63 $\pm$ 0,20
21	45,96 $\pm$ 3,59	98,34 $\pm$ 0,53	75,90 $\pm$ 4,64	99,84 $\pm$ 0,15

Priloga B: Statistična analiza rasti rakavih urotelijskih celic RT4 na različnih nosilcih iz AM in na sintetičnem nosilcu.

Primerjava	F-test	Studentov T-test
eAM : SN	0,334364782	2,99407E-26
gAM : SN	3,34341E-06	7,0555E-05
sAM : SN	2,69998E-05	1,17872E-10
eAM : gAM	1,10638E-06	3,76276E-05
gAM : sAM	0,471311349	0,059955147
sAM : eAM	1,91013E-05	0,006197832

Priloga C: Primerjava dinamike rasti celic RT4 oziroma T24 in NPU v kokulturi na nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu.

Povprečna prekritost nosilca s celicami RT4 oziroma T24 in NPU v kokulturi na nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu (% $\pm$ SE)								
Dan trajanja poskusa	NPU+RT4 na eAM		NPU+T24 na eAM		NPU+RT4 na sintetičnem nosilcu		NPU+T24 na sintetičnem nosilcu	
	NPU	RT4	NPU	T24	NPU	RT4	NPU	T24
1	2,83 $\pm$ 0,49	5,71 $\pm$ 0,67	1,07 $\pm$ 0,20	3,49 $\pm$ 0,67	12,91 $\pm$ 2,01	28,91 $\pm$ 6,18	9,77 $\pm$ 0,66	46,02 $\pm$ 7,48
2	3,54 $\pm$ 1,01	4,95 $\pm$ 1,34	2,51 $\pm$ 0,86	3,47 $\pm$ 1,21	16,95 $\pm$ 1,07	45,97 $\pm$ 9,59	12,16 $\pm$ 0,50	53,68 $\pm$ 6,57
3	1,16 $\pm$ 0,35	2,11 $\pm$ 0,69	4,32 $\pm$ 1,53	8,68 $\pm$ 3,05	29,22 $\pm$ 2,63	63,06 $\pm$ 12,20	17,91 $\pm$ 0,91	86,51 $\pm$ 3,22
7	1,63 $\pm$ 0,50	4,73 $\pm$ 1,61	2,53 $\pm$ 0,91	6,85 $\pm$ 2,48	39,52 $\pm$ 2,50	96,89 $\pm$ 0,74	18,91 $\pm$ 1,42	98,48 $\pm$ 0,26

Priloga D: Statistična analiza rasti normalnih in rakavih urotelijskih celic na nosilcu eAM in na sintetičnem nosilcu.

Primerjava	F-test	Studentov T-test
Kokultura RT4 in NPU		
eAM RT4 : SN RT4	1,25686E-07	3,23351E-08
eAM NPU : SN NPU	1,44207E-05	2,20156E-09
Kokultura T24 in NPU		
eAM T24 : SN T24	0,000637107	1,87268E-12
eAM NPU : SN NPU	0,803307836	4,22125E-08

Priloga E: Statistična analiza protimikrobne aktivnosti AM pri metodi izpostavitve v tekočem gojišču.

Primerjava	F-test	Studentov T-test
(<i>E.coli</i> DH5 α + kAM+atb) : <i>E.coli</i> DH5 α	0,112906925	0,596307116
(<i>E. coli</i> DH5 α + kAM) : <i>E.coli</i> DH5 α	0,291771432	0,252353121
(UPEC DL90 + kAM+atb) : <i>E.coli</i> DH5 α	0,24963727	0,686784371
(UPEC DL90 + kAM) : <i>E.coli</i> DH5 α	0,487675725	0,765818756