

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Aleksandar JANEV

**VPLIV PRIPRAVKOV IZ HUMANE AMNIJSKE
MEMBRANE NA IZBRANE SIGNALNE POTI
EPITELIJSKO-MEZENHIMSKEGA PREHODA
NORMALNIH IN RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC**

DOKTORSKA DISERTACIJA

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Aleksandar JANEV

**VPLIV PRIPRAVKOV IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE NA
IZBRANE SIGNALNE POTI EPITELIJSKO-MEZENHIMSKEGA
PREHODA NORMALNIH IN RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE EFFECT OF HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE
PREPARATIONS ON THE SELECTED SIGNALLING PATHWAYS
OF THE EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION OF NORMAL
AND CANCER UROTHELIAL CELLS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2022

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 29. seje Komisije za doktorski študij UL z dne 15. 9. 2020 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje znanosti o celici. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Mateja Erdani Kreft.

Doktorsko delo je bilo opravljeno na Inštitutu za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Nada ŽNIDARŠIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Peter VERANIČ
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

Članica: prof. dr. Maja ČEMAŽAR
Onkološki inštitut Ljubljana

Datum zagovora: 05.10.2022

Aleksandar Janev

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

| | |
|----|--|
| ŠD | Dd |
| DK | UDK 577.2:616.62-006(043.3) |
| KG | humana amnijska membrana, normalne in rakave urotelijske celice, protirakavo delovanje, homogenat, izvleček |
| AV | JANEV, Aleksandar, mag. lab. biomed. (UNI) |
| SA | ERDANI KREFT, Mateja (mentor) |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101 |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski program Bioznanosti, znanstveno področje znanosti o celici |
| LI | 2022 |
| IN | VPLIV PRIPRAVKOV IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE NA IZBRANE SIGNALNE POTI EPITELIJSKO - MEZENHIMSKEGA PREHODA NORMALNIH IN RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC |
| TD | Doktorska disertacija |
| OP | XIII, 155 str., 20 pregl., 38 sl., 350 vir. |
| IJ | sl |
| JI | sl/en |
| AI | Rak sečnega mehurja je deseto najpogostejše rakavo obolenje na svetu. Uporaba humane amnijske membrane (hAM) za zdravljenje raka je ena od perspektivnih idej, ki se je pojavila v zadnjih letih. Cilj doktorske disertacije je bil proučiti celično-biološke mehanizme protirakavega delovanja homogenata in izvlečka hAM na modelih raka in normalnega sečnega mehurja <i>in vitro</i> . Z uporabo različnih molekularnih in mikroskopskih metod smo ugotovili, da priprava iz hAM zmanjšata izražanje označevalcev fokalnih stikov, migracije, invazije in proliferacije mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in neinvazivnih urotelijskih celic papiloma RT4. Dokazali smo, da je eden izmed mehanizmov protirakavega delovanja pripravkov iz hAM inhibicija FAK in p-FAK ter posledično zmanjšanje izražanja genov in proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR v rakavih urotelijskih celicah T24. Poleg tega smo dokazali, da homogenat hAM v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24 in urotelijskih celicah papiloma RT4 zavre izražanje proteinov, ki so vpleteni v reorganizacijo aktinskega citoskeleta. Naša raziskava je potrdila, da priprava iz hAM nimata škodljivega učinka na normalne urotelijske celice. Ugotovili smo, da proučevana priprava iz hAM delujeta na več molekularnih tarč karcinogeneze, na osnovi česar menimo, da imata potencial za uporabo, kot dodatni protirakavi učinkovini, v večtarčni intravezikalni terapiji po transuretralni resekciji tumorjev sečnega mehurja. |

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 577.2:616.62-006(043.3)
CX human amniotic membrane, normal and cancer urothelial cells, anticancer effect, homogenate, extract
AU JANEV, Aleksandar
AA ERDANI KREFT, Mateja (supervisor),
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Scientific field Cell Sciences
PY 2022
TI THE EFFECT OF HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE PREPARATIONS ON THE SELECTED SIGNALLING PATHWAYS OF THE EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION OF NORMAL AND CANCER UROTHELIAL CELLS
DT Doctoral dissertation
NO XIII, 155 p., 20 tab., 37 fig., 350 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Bladder cancer is the tenth most common cancer. Using human amniotic membrane (hAM) to treat cancer is one of the promising ideas that have emerged in recent years. The aim of the PhD thesis was to investigate the effect of hAM homogenate and extract on different *in vitro* models of bladder cancer. Using molecular and microscopic methods, we have shown that hAM homogenate and extract reduce the expression of markers of focal adhesion, migration, invasion and proliferation in muscle-invasive urothelial T24 cells and transitional cell papilloma RT4 cells. In addition, we have shown that one of the mechanisms of action is through downregulation of genes and proteins that are part of the FAK/PI3K/Akt/mTOR pathway in T24 cancer cells. We have also shown that the hAM homogenate inhibits the expression of focal adhesion proteins and proteins involved in the reorganization of the actin cytoskeleton of cancer urothelial cells. Our research has also confirmed that the hAM preparations have no harmful effects on normal urothelial cells. In conclusion, we have shown that hAM preparations have multitargeted anticancer effect, which further supports the idea of a possible clinical application of hAM homogenate and extract as additional anti-cancer agents in multi-target intravesical therapy after transurethral resection of bladder tumors.

KAZALO VSEBINE

| | |
|---|------------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA | II |
| KEY WORDS DOCUMENTATION..... | III |
| KAZALO VSEBINE | IV |
| KAZALO PREGLEDNIC | IX |
| KAZALO SLIK..... | X |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI | XII |
| 1 UVOD..... | 1 |
| 1.1 RAZISKOVALNE HIPOTEZE..... | 1 |
| 2 PREGLED OBJAV..... | 2 |
| 2.1 SEČNI MEHUR..... | 2 |
| 2.1.1 Anatomija in fiziologija sečnega mehurja..... | 2 |
| 2.1.2 Urotelij..... | 3 |
| 2.2 RAK SEČNEGA MEHURJA | 4 |
| 2.2.1 Epidemiologija..... | 4 |
| 2.2.2 Stadiji raka sečnega mehurja po klasifikaciji TNM | 4 |
| 2.2.3 Dejavniki tveganja..... | 6 |
| 2.2.4 Molekularna biologija raka sečnega mehurja | 7 |
| 2.2.5 Zdravljenje..... | 8 |
| 2.3 EPITELIJSKO-MEZENHIMSKI PREHOD | 8 |
| 2.4 SIGNALNA POT PI3K/AKT/MTOR | 10 |
| 2.5 FOKALNA ADHEZIJSKA KINAZA (FAK)..... | 11 |
| 2.5.1 Strukturne značilnosti FAK..... | 11 |
| 2.5.2 Vloga FAK v rakavih celicah | 13 |
| 2.5.2.1 FAK spodbuja preživetje in proliferacijo rakavih celic..... | 14 |
| 2.5.2.2 FAK spodbuja migracijo rakavih celic | 14 |
| 2.5.2.2.1 Reorganizacija aktinskega citoskeleta..... | 14 |
| 2.5.2.2.2 Fokalni stiki..... | 15 |
| 2.5.2.3 FAK spodbuja invazijo rakavih celic..... | 16 |
| 2.5.3 Klinični pomen izražanja FAK pri raku..... | 17 |
| 2.5.4 Inhibitorji FAK | 18 |
| 2.5.4.1 PF-573,228..... | 18 |
| 2.5.4.2 PND-1186 | 19 |
| 2.5.4.3 Defactinib..... | 19 |
| 2.6 HUMANA AMNIJSKA MEMBRANA | 21 |
| 2.6.1 Struktura humane amnijske membrane..... | 21 |
| 2.6.2 Uporaba humane amnijske membrane v terapevtske namene..... | 22 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.6.2.1 | Protirakavo delovanje humane amnijske membrane (prikaz dosedanjih raziskav) | 22 |
| 3 | MATERIAL IN METODE | 27 |
| 3.1 | MATERIAL..... | 27 |
| 3.1.1 | Laboratorijska oprema | 27 |
| 3.1.2 | Reagenti in kemikalije | 28 |
| 3.1.3 | Raztopine in pufri..... | 30 |
| 3.1.4 | Celične kulture in gojišča | 36 |
| 3.1.4.1 | Trajne celične linije rakavih celic | 36 |
| 3.1.4.2 | Normalne prašičje urotelijske celice..... | 37 |
| 3.1.4.3 | Netumorigene celice dojke | 38 |
| 3.1.4.4 | Gojišče za pripravo homogenata in izvlečka humane amnijske membrane | 38 |
| 3.1.5 | Inhibitorji FAK | 39 |
| 3.2 | METODE..... | 40 |
| 3.2.1 | Priprava homogenata humane amnijske membrane..... | 40 |
| 3.2.2 | Priprava izvlečka humane amnijske membrane..... | 41 |
| 3.2.3 | Analiza vpliva homogenata in izvlečka humane amnijske membrane na luščenje normalnih in rakavih celic..... | 42 |
| 3.2.4 | Analiza učinka homogenata hAM na pritrjevanje rakavih urotelijskih celic | 42 |
| 3.2.5 | Analiza proliferacije rakavih urotelijskih celic..... | 43 |
| 3.2.6 | In vitro model celjenja rane | 43 |
| 3.2.7 | In vitro model celjenja rane v realnem času..... | 44 |
| 3.2.8 | In vitro test invazivnosti | 44 |
| 3.2.9 | Določanje koncentracije celokupnih proteinov z metodo BCA | 46 |
| 3.2.10 | Prenos Western..... | 46 |
| 3.2.11 | Analiza izražanja mRNA z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) | 49 |
| 3.2.11.1 | Izolacija RNA | 49 |
| 3.2.11.2 | Prepisovanje RNA v cDNA..... | 49 |
| 3.2.11.3 | Verižna reakcije s polimerazo v realnem času..... | 50 |
| 3.2.12 | Želatinska cimografija | 51 |
| 3.2.13 | Encimsko imunski test ELISA | 52 |
| 3.2.14 | Priprava vzorcev za vrstično elektronsko mikroskopijo..... | 53 |
| 3.2.15 | Priprava vzorcev za presevno elektronsko mikroskopijo | 53 |
| 3.2.16 | Statistična analiza..... | 54 |
| 3.2.17 | Izjava o dostopnosti podatkov..... | 54 |
| 4 | REZULTATI | 55 |
| 4.1 | VPLIV PRIPRAVKOV HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE NA LUŠČENJE | |

| | |
|---|-----------|
| NORMALNIH IN RAKAVIH CELIC | 55 |
| 4.1.1 Homogenat hAM povzroči luščenje rakavih celic, vendar ne normalnih celic | 55 |
| 4.1.2 Način priprave in čas tretiranja s homogenatom hAM vplivata na odstotek odlučenih rakavih urotelijskih celic | 56 |
| 4.1.3 Izvleček hAM povzroči luščenje mišično invazivnih urotelijskih celic po 24-urni inkubaciji..... | 61 |
| 4.2 VPLIV HOMOGENATA HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE NA PRITRJEVANJE IN PROLIFERACIJO RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC | 63 |
| 4.2.1 Homogenat hAM zmanjša zmožnost pritrjevanja rakavih urotelijskih celic | 64 |
| 4.2.2 Homogenat hAM zavira proliferacijo rakavih urotelijskih celic preko regulacije izražanja ciklina D1..... | 65 |
| 4.3 VPLIV PRIPRAVKOV HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE NA MIGRACIJO IN INVAZIJO NORMALNIH IN RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC | 67 |
| 4.3.1 Homogenat in izvleček hAM zavirata migracijo rakavih urotelijskih celic | 67 |
| 4.3.2 Homogenat in izvleček hAM vplivata na način migracije rakavih urotelijskih celic ter na njihovo morfologijo..... | 70 |
| 4.3.3 Homogenat in izvleček hAM zmanjšata stopnjo invazije mišično invazivnih urotelijskih celic..... | 73 |
| 4.4 VLOGA PRIPRAVKOV IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE PRI URAVNAVANJU SPECIFIČNIH MOLEKUL SIGNALNIH POTI, KI VODIJO EPITELIJSKO-MEZENHIMSKI PREHOD RAKAVIH IN NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC | 75 |
| 4.4.1 Homogenat in izvleček hAM zmanjšata izražanje FAK in nekaterih genov in proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR v rakavih urotelijskih celicah | 75 |
| 4.4.2 Homogenat humane amnijske membrane v rakavih urotelijskih celicah zmanjša izražanje proteinov, ki so vpleteni v reorganizacijo aktinskega citoskeleta..... | 78 |
| 4.4.3 Kombinirano tretiranje s homogenatom hAM in inhibitorji FAK najbolj učinkovito zavira migracijo mišično invazivnih urotelijskih celic v danih eksperimentalnih pogojih | 79 |
| 4.4.4 Homogenat in izvleček hAM znižata izražanje proteinov fokalnih stikov v mišično invazivnih urotelijskih celicah | 82 |
| 4.4.5 V normalnih urotelijskih celicah po izzvani poškodbi ali že po zacelitvi rane tako homogenat kot tudi izvleček hAM ne vplivata niti na izražanje FAK in p-FAK niti na izražanje proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR | 84 |

| | |
|---|-----------|
| 4.4.6 Homogenat in izvleček hAM v normalnih urotelijskih celicah vplivata na izražanje proteinov, ki so vpleteni v reorganizacijo aktinskega citoskeleta po poškodbi in zacelitvi rane | 86 |
| 4.5 VPLIV PRIPRAVKOV HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE NA OZNAČEVALCE EPITELIJSKO-MEZENHIMSKEGA PREHODA NORMALNIH IN RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC | 88 |
| 4.5.1 Homogenat hAM zniža izražanje N-kadherina v mišično invazivnih urotelijskih celicah | 88 |
| 4.5.2 Homogenat in izvleček hAM zmanjšata izražanje in aktivnost MMP-2 v mišično invazivnih urotelijskih celicah | 89 |
| 4.5.3 Homogenat in izvleček hAM rahlo povečata količino TIMP-2, izločenega iz rakavih in normalnih urotelijskih celic | 91 |
| 4.6 ANALIZA ULTRASTRUKTURE NORMALNIH IN RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC, TRETIRANIH S HOMOGENATOM HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE | 92 |
| 4.6.1 Homogenat hAM se pritrди na površino rakavih urotelijskih celic, vendar ne na površino normalnih urotelijskih celic | 92 |
| 4.6.2 Homogenat hAM se vrine v medcelične prostore mišično invazivnih urotelijskih celic in zmanjša število plasti urotelijskih celic papiloma | 95 |
| 5 RAZPRAVA | 97 |
| 5.1 PRIPRAVKA IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE POVZROČATA LUŠČENJE RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC | 97 |
| 5.2 HOMOGENAT HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE ZMANJŠA ZMOŽNOST PRITRJEVANJA RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC IN ZAVIRA NJIHOVO PROLIFERACIJO | 101 |
| 5.3 PRIPRAVKA IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE ZAVIRATA MIGRACIJO RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC | 102 |
| 5.4 KOMBINACIJA INHIBITORJEV FAK IN HOMOGENATA HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE UČINKOVITO ZAVIRA MIGRACIJO MIŠIČNO INVAZIVNIH UROTELIJSKIH CELIC | 104 |
| 5.5 PRIPRAVKA IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE VPLIVATA NA NAČIN MIGRACIJE RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC TER NA NJIHOVO MORFOLOGIJO | 105 |
| 5.6 PRIPRAVKA IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE ZMANJŠATA STOPNJO INVAZIJE RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC | 106 |
| 5.7 HOMOGENAT HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE SE PRITRDI NA POVRŠINO RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC, NE PA TUDI NA POVRŠINO NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC | 110 |
| 5.8 PROTIRAKAVI UČINEK HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE JE ODVIŠEN OD TIPA RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC IN UPORABLJENEGA | |

| | |
|---|------------|
| PRIPRAVKA..... | 110 |
| 5.9 PRIPRAVKA IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE NIMATA ŠKODLJIVEGA UČINKA NA NORMALNE UROTELIJSKE CELICE..... | 112 |
| 5.10 PRIPRAVKA IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE V NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC PO POŠKODBI IN PO ZACELITVI RANE NE VPLIVATA NA IZRAŽANJE FAK, P-FAK IN NA PROTEINE KI SO DEL SIGNALNE POTI PI3K/AKT/MTOR, VENDAR ZMANJŠATA IZRAŽANJE NEKATERIH PROTEINOV, KI SO VPLETENI V REORGANIZACIJO AKTINSKEGA CITOSKELETA | 113 |
| 5.11 DOPRINOS K ZNANOSTI IN PERSPEKTIVE ZDRAVLJENJA RAKA SEČNEGA MEHURJA S PRIPRAVKI IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE | 114 |
| 6 SKLEPI..... | 116 |
| 7 POVZETEK (SUMMARY)..... | 122 |
| 7.1 POVZETEK..... | 122 |
| 7.2 SUMMARY | 124 |
| 8 VIRI..... | 126 |
| ZAHVALA | 156 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|--|-----|
| Preglednica 1: Stadiji raka sečnega mehurja po klasifikaciji TNM. | 5 |
| Preglednica 2: Kronološki pregled <i>in vitro</i> ter <i>in vivo</i> študij, ki opisujejo spekter različnih protirakavih učinkov hAM. | 24 |
| Preglednica 3: Seznam laboratorijske opreme, ki smo jo uporabili v doktorskem delu. | 27 |
| Preglednica 4: Seznam uporabljenih reagentov in kemikalij. | 28 |
| Preglednica 5: Raztopine in pufri, ki smo jih uporabljali pri praktičnem delu. | 31 |
| Preglednica 6: Sestava gojišča (ADMEM + F12), prilagojena za gojenje rakavih celic. | 37 |
| Preglednica 7: Sestava gojišča UroM (- Ca ²⁺ + S), ki spodbuja proliferacijo normalnih prašičjih celic. | 40 |
| Preglednica 8: Sestava gojišča UroM (+ Ca ²⁺ - S), ki omogoča diferenciacijo normalnih prašičjih celic. | 37 |
| Preglednica 9: Sestava gojišča, prilagojena za gojenje netumorigenih celic dojke MCF10. | 38 |
| Preglednica 10: Sestavine gojišča za pripravo homogenata in izvlečka hAM. | 38 |
| Preglednica 11: Seznam uporabljenih inhibitorjev FAK. | 39 |
| Preglednica 12: Specifikacije homogenizatorjev, ki so bili uporabljeni pri proučevanju protirakavega učinka hAM. | 40 |
| Preglednica 13: Navodila za pripravo standardnih raztopin BSA za merjenje proteinov. | 46 |
| Preglednica 14: Seznam uporabljenih primarnih protiteles za dokazovanje proteinov s prenosom Western. | 48 |
| Preglednica 15: Seznam uporabljenih sekundarnih protiteles za dokazovanje proteinov s prenosom Western. | 48 |
| Preglednica 16: Reakcijska mešanica za reverzno prepisovanje RNA v cDNA. | 49 |
| Preglednica 17: Sestava reakcijske mešanice za qPCR. | 50 |
| Preglednica 18: Seznam oligonukleotidnih začetnikov za reakcijo qPCR. | 50 |
| Preglednica 19: Sestavine 10 % poliakrilamidnega gela z 0,1 % želatino za želatinsko cimoografijo. | 52 |
| Preglednica 20: Povzetek značilnosti mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in urotelijskih celic papiloma RT4. | 111 |

KAZALO SLIK

| | |
|---|----|
| Slika 1: Shematski prikaz stene sečnega mehurja. | 2 |
| Slika 2: Shematski prikaz plasti človeškega urotelija. | 4 |
| Slika 3: Shematski prikaz epiteljsko-mezenhimskega prehoda (EMP). | 9 |
| Slika 4: Shematski prikaz signalne poti PI3K/AKT/mTOR. | 11 |
| Slika 5: Shematski prikaz domen fokalne adhezijske kinaze (FAK). | 12 |
| Slika 6: FAK regulira izražanje in aktivacijo molekularnih tarč, ki uravnavajo procese povezane z nastankom in napredovanjem raka. | 13 |
| Slika 7: Shematski prikaz migrirajoče celice s fokalnimi stiki in vodilnim robom. | 17 |
| Slika 8: Shematski prikaz zgradbe humane amnijske membrane (hAM). | 21 |
| Slika 9: Shematski prikaz priprave homogenata in izvlečka hAM. | 41 |
| Slika 10: Shematski prikaz <i>in vitro</i> modela celjenja rane. | 44 |
| Slika 11: Shematski prikaz <i>in vitro</i> testa invazivnosti. | 45 |
| Slika 12: Homogenat hAM povzroča luščenje rakavih celic, ne pa tudi normalnih celic. | 56 |
| Slika 13: Način priprave in čas tretiranja s homogenatom hAM vplivata na odstotek odluščenih rakavih urotelijskih celic. | 58 |
| Slika 14: Tridnevno 2-urno tretiranje z različnimi pripravki homogenata hAM povzroča luščenje mišično invazivnih urotelijskih celic, vendar ne vpliva na luščenje urotelijskih celic papiloma in normalnih urotelijskih celic. | 60 |
| Slika 15: Izvleček hAM povzroči luščenje mišično invazivnih urotelijskih celic T24 po 24-urnem, tridnevnom tretiranju. | 62 |
| Slika 16: Tridnevno 2-urno tretiranje z izvlečkom hAM ne povzroča luščenja rakavih in normalnih urotelijskih celic. | 63 |
| Slika 17: Homogenat hAM zmanjša zmožnost pritrjevanja in dinamiko rasti rakavih urotelijskih celic. | 64 |
| Slika 18: Homogenat hAM zavira proliferacijo mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in urotelijskih celic papiloma RT4 ter zmanjša izražanje ciklina D1 pri prvih. | 66 |
| Slika 19: Homogenat in izvleček hAM zavirata migracijo rakavih urotelijskih celic. ... | 69 |
| Slika 20: Homogenat in izvleček hAM vplivata na način migracije mišično invazivnih urotelijskih celic T24. | 71 |
| Slika 21: Homogenat in izvleček hAM zmanjšata količino lamelopodijev in filopodijev vzdolž vodilnega roba urotelijskih celic papiloma. | 72 |
| Slika 22: Homogenat in izvleček hAM ne vplivata na morfologijo ter način migracije normalnih urotelijskih celic. | 73 |
| Slika 23: Homogenat in izvleček hAM zmanjšata stopnjo invazije mišično invazivnih urotelijskih celic. | 74 |
| Slika 24: Homogenat in izvleček hAM v rakavih urotelijskih celicah zmanjšata izražanje FAK in nekaterih genov in proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR. | 77 |
| Slika 25: Homogenat hAM v rakavih urotelijskih celicah hAM zmanjša izražanje | |

| | |
|--|-----|
| nekaterih proteinov, ki so vpleteni v reorganizacijo aktinskega citoskeleta. | 79 |
| Slika 26: Inhibitorji FAK podobno kot homogenat hAM vplivajo na izražanje proteinov p-FAK, Cdc42, Rac1/2/3. | 80 |
| Slika 27: Kombinirano tretiranje s homogenatom hAM in inhibitorji FAK ima največji zaviralni učinek na migracijo mišično invazivnih urotelijskih celic T24. | 82 |
| Slika 28: Homogenat in izvleček hAM znižata izražanje proteinov fokalnih stikov v mišično invazivnih urotelijskih celicah. | 83 |
| Slika 29: V normalnih urotelijskih celicah po izzvani poškodbi ali že po zacelitvi rane tako homogenat kot tudi izvleček hAM ne vplivata niti na izražanje FAK in p-FAK niti na proteine, ki so del signalne PI3K/Akt/mTOR. | 85 |
| Slika 30: V prvih 6 urah po izzvani poškodbi v normalnih urotelijskih celicah tako homogenat kot tudi izvleček hAM zmanjšata izražanje proteinov, ki so vpleteni v reorganizacijo aktinskega citoskeleta. | 87 |
| Slika 31: Homogenat hAM zniža izražanje N-kadherina v mišično invazivnih urotelijskih celicah. | 88 |
| Slika 32: Homogenat in izvleček hAM zmanjšata izražanje in aktivnost MMP2 v mišično invazivnih urotelijskih celicah. | 90 |
| Slika 33: Homogenat in izvleček hAM rahlo povečata količino TIMP-2, izločenega iz rakavih in normalnih urotelijskih celic. | 92 |
| Slika 34: Homogenat hAM se pritrdi na površino rakavih urotelijskih celic, vendar ne na površino normalnih urotelijskih celic. | 94 |
| Slika 35: Homogenat hAM se pritrdi na površino rakavih urotelijskih celic in se vrine v medcelične prostore mišično invazivnih urotelijskih celic. | 95 |
| Slika 36: Homogenat hAM zmanjša število plasti urotelijskih celic papiloma po 72-urni inkubaciji. | 96 |
| Slika 37: Predlagani mehanizem delovanja homogenata in izvlečka hAM na rakave in normalne urotelijske celice. | 119 |
| Slika 38: Predlagani mehanizem delovanja homogenata in izvlečka hAM na normalne urotelijske celice po izzvani poškodbi ali zacelitve rane. | 121 |

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|---------------------|--|
| ATCC | ameriška zbirka tipskih kultur (angl. <i>American Type Culture Collection</i>) |
| BCG | cepivo <i>Bacillus Calmette-Guérin</i> |
| BSA | goveji serumski albumin (angl. <i>bovine serum albumin</i>) |
| CIS | karcinom <i>in situ</i> (angl. <i>carcinoma in situ</i>) |
| DAPI | 4,6-diamino-2-fenilindol dihidroklorid |
| DMSO | dimetilsulfoksid |
| EGF | epidermalni rastni faktor (angl. <i>epidermal growth factor</i>) |
| EMP | epitelijsko-mezenhimski prehod (angl. <i>epithelial mesenchymal transition</i>) |
| EMP-TF | z epitelijsko-mezenhimskim prehodom povezani transkripcijski faktorji |
| FAK | fokalna adhezijska kinaza |
| FBS | goveji fetalni serum (angl. <i>fetal bovine serum</i>) |
| GOI | tarčni gen (angl. <i>gene of interest (GOI)</i>) |
| hAEC | humane amnijske epitelijske celice |
| hAM | humana amnijska membrana |
| hAMSC | humane amnijske mezenhimske stromalne celice |
| HS | konjski serum (angl. <i>horse serum</i>) |
| log ₂ FC | kratnik dvojiškega logaritma spremembe (angl. <i>log₂ fold change</i>) |
| MIBC | mišično invazivni rak sečnega mehurja |
| MMP | metaloproteinaze matriksa (angl. <i>matrix metalloproteinase</i>) |
| NPU | normalne prašičje urotelijske celice |
| NMIBC | mišično neinvazivni rak sečnega mehurja |

| | |
|-------|---|
| PBS | fosfatni pufer (angl. <i>phosphate buffered saline</i>) |
| PI3K | fosfoinozimid 3-kinaza |
| qPCR | metoda verižne reakcije s polimerazo v realnem času |
| RT4 | trajna celična linija, ki izvira iz humane urotelijskega papiloma sečnega mehurja |
| SEM | standardna napaka povprečja (angl. <i>standard error of mean</i>) |
| T24 | trajna celična linija, ki izvira iz humane mišično invazivne urotelijske neoplazije |
| TBS-T | Tris pufer s soljo z dodanim 0,1 % Tween® 20 (angl. <i>tris-buffered saline, 0.1% Tween® 20</i>) |
| TIMP | tkivni inhibitor metaloproteinaz (angl. <i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>) |
| TURBT | transuretralna resekcija tumorja sečnega mehurja |
| Y | tirozin |

1 UVOD

Rak sečnega mehurja je deseto najpogostejše rakavo obolenje na svetu, ki trikrat pogosteje prizadene moške kot ženske (Sung in sod., 2021). Rezultati epidemiološke študije iz leta 2018 kažejo, da je Slovenija ena od sedmih držav na svetu z naraščajočo incidenco raka sečnega mehurja (Wong in sod., 2018). Ob postavitvi diagnoze je 75 % rakavih obolenj sečnega mehurja uvrščenih med mišično neinvazivne, 25 % pa je mišično invazivnih (Babjuk in sod., 2022; Witjes in sod., 2021). Po odstranitvi mišično neinvazivnih tumorjev pogosto pride do ponovitve bolezni ali celo do transformacije v mišično invazivno obliko (Babjuk in sod., 2022). Bolniki z mišično invazivno obliko raka sečnega mehurja imajo slabšo prognozo, saj se pri njih pogosto pojavijo metastaze. Posledično so novi pristopi zdravljenja rakavih obolenj sečnega mehurja nujni (Ogawa in sod., 2020; Park in sod., 2014).

Humana amnijska membrana (hAM) je notranja plast posteljice, ki med nosečnostjo ščiti plod (Ramuta in Kreft, 2018). Zaradi dostopnosti in številnih bioloških lastnosti se že uporablja v kliniki, zlasti pri rekonstrukciji roženice ter celjenju kožnih opeklin, in kroničnih ran (Cirman in sod., 2014; Lo in sod., 2010; Mohammadi in sod., 2017; Mohammadi in sod., 2013). Uporaba hAM za zdravljenje raka je ena od obetavnih idej, ki se je pojavila v zadnjih letih.

Kljub novim študijam *in vitro* ter *in vivo*, so celično-biološki in molekularni mehanizmi, na katerih temelji protirakavi učinek hAM, slabo poznani. Po do sedaj znanih podatkih, vpliv različnih pripravkov iz hAM na signalne poti epiteljsko-mezenhimskega prehoda (EMP) karcinoma urotelijskih celic še ni raziskan. Namen doktorske naloge je zato proučiti celično-biološke mehanizme protirakavega delovanja homogenata in izvlečka hAM na različnih modelih raka sečnega mehurja *in vitro*. V sklopu doktorske naloge bomo uporabili našete pripravke iz hAM in skušali pojasniti njihovo vlogo pri uravnavanju specifičnih molekul signalnih poti, ki vodijo EMP urotelijskih celic.

1.1 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

V doktorski nalogi bomo preverili naslednje hipoteze:

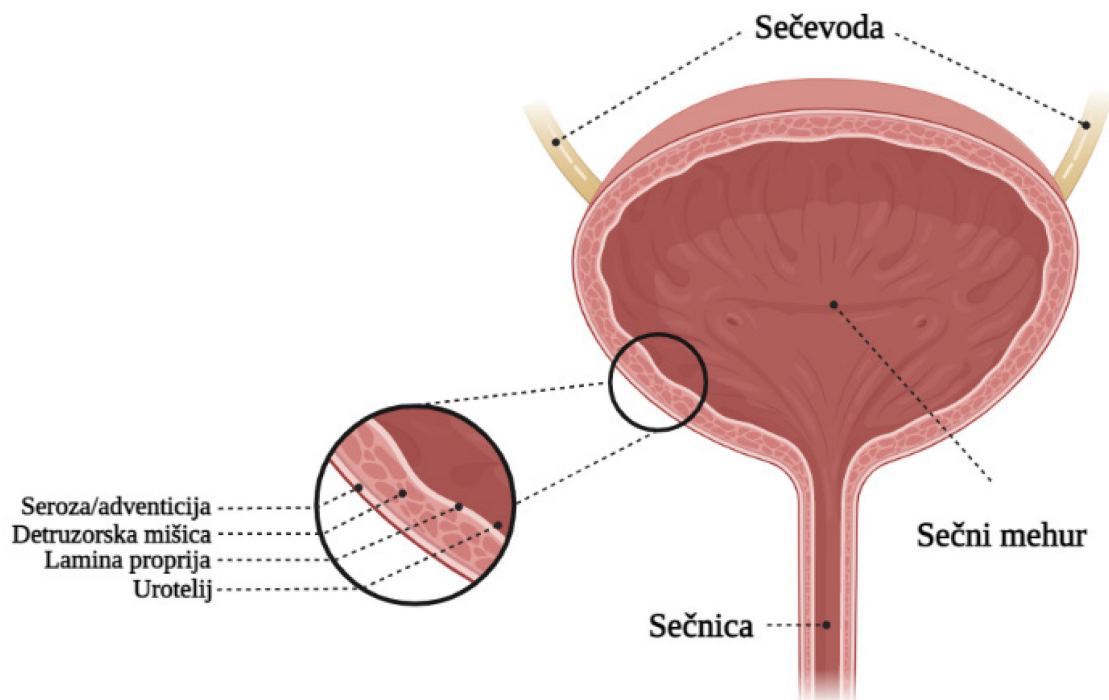
- Hipoteza 1: Pripravki iz hAM vplivajo na signalno pot PI3K/Akt in s tem spodbujajo EMP normalnih urotelijskih celic takoj po poškodbi.
- Hipoteza 2: Pripravki iz hAM vplivajo na signalno pot PI3K/Akt in s tem preprečijo EMP normalnih urotelijskih celic po zacelitvi rane.
- Hipoteza 3: Pripravki iz hAM vplivajo na signalno pot PI3K/Akt in s tem preprečijo EMP urotelijskih celic papiloma.
- Hipoteza 4: Pripravki iz hAM vplivajo na signalno pot PI3K/Akt in s tem ustavijo EMP malignih mišično invazivnih urotelijskih celic.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SEČNI MEHUR

2.1.1 Anatomija in fiziologija sečnega mehurja

Sečni mehur je zgrajen iz več plasti (Slika 1). Notranja plast, ki meji na svetlino sečnega mehurja, je sestavljena iz prehodnega epitelija, ki se imenuje urotelij. Slednji je obdan z lamino proprijo ali tanko plastjo vezivnega tkiva, ki ga ločuje od debelejši zunanje mišične plasti, znane tudi kot detruzorska mišica. Najbolj zunanjo plast mehurja sestavljajo seroza ali adventicija in perivezikalno maščobno tkivo (Matsumoto in sod., 2008; Wong-You-Cheong in sod., 2006). Glavni funkciji sečnega mehurja sta zbiranje in shranjevanje urina, ki priteka skozi sečevoda iz ledvic (Lewis, 2000). Sečni mehur je oživen preko avtonomnih (simpatičnih in parasimpatičnih) živčnih vlaken. Ko se mehur polni, simpatični živci spodbujajo sprostitve detruzorskih mišic in vzdržujejo krčenje notranjega sfinktra sečnice. Ko je mehur poln, pa mehanoreceptorji prenesejo informacijo preko aferentnih nevronov v hrbtenjačo, kar vodi do parasimpatične aktivacije ter posledično do krčenja stene mehurja in hkrati do sprostitve notranjega sečničnega sfinktra. Zunanji sfinkter sečnice, ki kontrolira pretok urina, je pod nadzorom somatskega živčevja ter deluje pod vplivom naše volje (Costanzo, 2013).

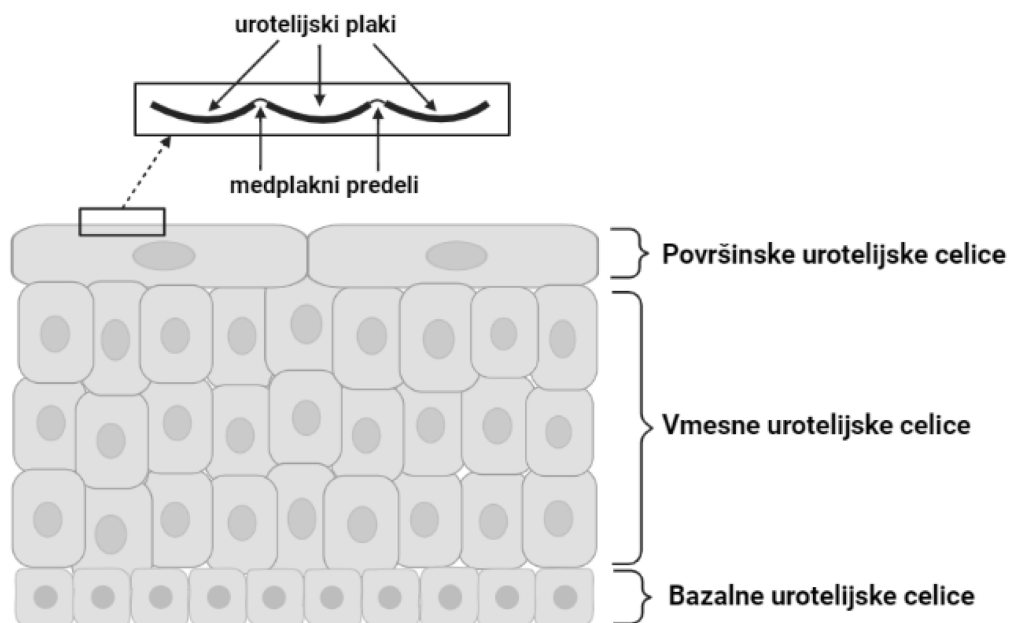


Slika 1. Shematski prikaz stene sečnega mehurja. Urotelij, ki leži na bazalni lamini, je obdan s plastjo vezivnega tkiva ali lamine proprije. Pod njima leži plast gladkomišičnih celic, ki tvorijo detruzorsko mišico.

Najbolj zunanjo plast predstavljata seroza in adventicija. Slika je izrisana s spletnim orodjem BioRender.

2.1.2 Urotelij

Urotelij sečnega mehurja tvori krvno-urinsko pregrado, saj onemogoča prehajanje snovi iz urina v krvožilje in obratno. Sestavljen je iz treh različnih tipov celic, in sicer iz bazalnih, vmesnih ter površinskih urotelijskih celic (Slika 2) (Hicks, 1975). Bazalne urotelijske celice so nizko diferencirane celice s premerom 5–10 μm , ki tvorijo en sklad in se pritrjajo na bazalno lamino s hemidezmosomi. Nad njimi ležijo delno diferencirane vmesne urotelijske celice, katerih premer znaša 10–15 μm in tvorijo tri do pet skladov (Khandelwal in sod., 2009). Površinske ali dežnikaste urotelijske celice so visoko diferencirane celice s premerom 25–300 μm , ki tvorijo en sklad (Kreft in sod., 2005). Gre za visoko specializirane celice, ki mejijo na svetlino sečnega mehurja in zagotavljajo krvno-urinsko pregrado. Med seboj so povezane z močnimi tesnimi stiki, ki preprečujejo paracelularni transport snovi iz urina v spodaj ležeče tkivo in obratno (Khandelwal in sod., 2009; Lasič in sod., 2009). Obenem k preprečevanju transcelularnega transporta prispeva tudi apikalna plazmalema površinskih celic, katerih 90 % površine predstavljajo urotelijski plaki, zgrajeni iz transmembranskih proteinov uroplakinov (Hu in sod., 2000; Kreft in sod., 2010b). Uroplakini nastajajo v endoplazemskem retikulumu, kjer se tudi povezujejo v heterodimere (UPIa/UPII in UPIb/UPIIIa) (povzeto po Kreft in sod., 2022). V Golgijevem aparatu (GA) se heterodimeri povezujejo med seboj v heterotetramere, pri čemer nastanejo 16 nm veliki uroplakinski partikli. V post-GA predelkih se uroplakinski partikli postopoma razporedijo v urotelijske plake, ki se nato s fuziformnimi vezikli (FV) prenesejo na apikalno plazmalemo (Hicks, 1975; Kreft in sod., 2010b; Hudoklin in sod., 2011; Hudoklin in sod., 2012). K transcelularni upornosti in neprepustnosti urotelija prispevajo tudi različni glikoproteini in lipidi v apikalni plazmalemi površinskih urotelijskih celic (Kačnik-Prastowska in sod., 2014; Parsons in sod., 1990).



Slika 2. Shematski prikaz plasti človeške urotelije. Humani urotelij je sestavljen iz treh različnih tipov celic: bazalnih, vmesnih in površinskih urotelijskih celic. Apikalna plazmalema površinskih urotelijskih celic je sestavljena iz urotelijskih plakov (~ 90 % površine) in medplaknih predelov (~ 10 % površine). Slika je izrisana s spletnim orodjem BioRender.

2.2 RAK SEČNEGA MEHURJA

2.2.1 Epidemiologija

Rak sečnega mehurja je najpogostejše maligno obolenje, ki prizadene sečila (Sung in sod., 2021). Po podatkih podatkovne zbirke GLOBOCAN 2020 gre za deseto najpogostejše rakavo obolenje na svetu, ki se trikrat pogosteje pojavlja pri moških kot pri ženskah (Sung in sod., 2021). Najpomembnejši dejavnik tveganja za raka sečnega mehurja je starost; njena mediana ob diagnozi je približno 70 let (Knowles in Hurst, 2015). Po podatkih Slovenskega registra raka iz leta 2018 je bil v obdobju med letoma 2014 in 2018 rak sečnega mehurja po pogostnosti pojavljanja med vsemi raki pri moških na 9. mestu, pri ženskah pa na 16. mestu (Register raka 2018). Nedavna globalna epidemiološka študija raka sečnega mehurja uvršča Slovenijo med sedem držav na svetu z naraščajočo incidenco raka sečnega mehurja in napoveduje, da naj bi se incidenca raka sečnega mehurja v Sloveniji do leta 2030 povečala za 92 % pri moških ter za 256 % pri ženskah (Wong in sod., 2018).

2.2.2 Stadiji raka sečnega mehurja po klasifikaciji TNM

Rak sečnega mehurja običajno izvira iz urotelija. V zahodnem svetu predstavljajo urotelijski ali prehodnocelični karcinomi več kot 90 % vseh rakov sečnega mehurja. Preostalih 10 % raka sečnega mehurja so bolj redke histološke vrste, in sicer adenokarcinomi, ploščatocelični karcinomi, mikropapilarni karcinomi in drobnocelični

karcinomi (Knowles in Hurst, 2015; Robinson in Khani, 2018; Sanli in sod., 2017).

Rak sečnega mehurja ločujemo na dve podvrsti: mišično neinvazivni rak sečnega mehurja (NMIBC) in mišično invazivni rak sečnega mehurja (MIBC) (Knowles in Hurst, 2015). Tri četrtine bolnikov ima ob začetni diagnozi NMIBC, ki je omejen na urotelij ali spodaj ležečo lamino proprijo. Kljub temu da imajo bolniki z NMIBC boljšo prognozo in večjo možnost preživetja, pri 70 % bolnikov po odstranitvi tumorjev pride do lokalne ponovitve bolezni (Babjuk in sod., 2022; Burger in sod., 2008). Poleg tega NMIBC pri 10–15 % bolnikov napreduje v mišično invazivno obliko, za katero je značilna slabša prognoza s pet letnim preživetjem < 50 % in pogostim napredovanjem do metastaz (Burger in sod., 2008; Witjes in sod., 2021). Zaradi večkratnih kirurških posegov in doživljenjskega spremljanja statusa bolnikov, se rak sečnega mehurja umešča med najdražje vrste raka za zdravljenje (Leal in sod., 2016; Mossanen in Gore, 2014).

V skladu s smernicami Evropskega združenja urologov (EAU), se za postavitev diagnoze uporablja sistem TNM (angl. *Tumor, Node, Metastasis*). V Preglednici 1 so prikazani stadiji raka sečnega mehurja po klasifikaciji TNM (Brierley in sod., 2017).

Preglednica 1. Stadiji raka sečnega mehurja po klasifikaciji TNM.

T – primarni tumor

| | |
|-----------------------------|---|
| T_x | Primarnega tumorja ni mogoče oceniti. |
| T₀ | Ni dokazov o primarnem tumorju. |
| T_a | Neinvaziven papilarni karcinom. |
| T_{is} (CIS) | Neinvaziven urotelijski karcinom ali karcinom <i>in situ</i> - CIS (angl. <i>Carcinoma in situ</i>). |
| T₁ | Tumor invadira v lamino proprijo. |
| T₂ | Tumor invadira v detruzorsko mišico. |
| T_{2a} | Tumor invadira v notranjo polovico detruzorske mišice. |
| T_{2b} | Tumor invadira v zunanjo polovico detruzorske mišice. |
| T₃ | Tumor invadira skozi steno mehurja v perivezikalno tkivo. |
| T_{3a} | Tumor invadira v perivezikalno tkivo – zaznamo mikroskopsko. |
| T_{3b} | Tumor invadira v perivezikalno tkivo – zaznamo makroskopsko. |
| T₄ | Tumor infiltrira v okoliške organe (stroma prostate, semenski vezikli, maternica, vaginalna medenična stena, trebušna stena). |
| T_{4a} | Tumor invadira v stromo prostate, semenske vezikle, maternico ali vagino. |
| T_{4b} | Tumor invadira v medenično ali trebušno steno. |

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 1

N – bezgavke

| | |
|-----------|--|
| Nx | Regionalne bezgavke ni mogoče oceniti. |
| N0 | Metastaz v regionalnih bezgavkah ni. |
| N1 | Metastaze v eni bezgavki v področju medenice. |
| N2 | Metastaze v dveh ali več bezgavkah v področju medenice. |
| N3 | Metastaze v bezgavkah na področju skupne iliakalne arterije. |

M – oddaljene metastaze

| | |
|------------|--|
| M0 | Oddaljenih metastaz ni. |
| M1 | Oddaljene metastaze. |
| M1a | Metastaze le v bezgavkah izven medenice. |
| M1b | Oddaljene metastaze v drugih delih telesa. |

2.2.3 Dejavniki tveganja

Kajenje predstavlja glavni okoljski dejavnik tveganja za razvoj raka sečnega mehurja (Czerniak in sod., 2016; Jiang in sod., 2012; Sanli in sod., 2017). Študije so pokazale, da je pri kadilcih prisotno od 3- do 4-krat večje tveganje za razvoj raka na mehurju in da je uživanje tobaka odgovorno za približno eno polovico vseh primerov raka sečnega mehurja (Burger in sod., 2013; Freedman in sod., 2011). Poleg kajenja predstavlja dodatno tveganje za razvoj raka sečnega mehurja tudi izpostavljenost industrijskim rakotvornim snovem. V industriji, kjer predelujejo barve, gumo, naftne derivate in barvila, so zaposleni izpostavljeni aromatskim aminom (benzidin, 2-naftilamin, 4-aminobifenil) ter policikličnim aromatskim ogljikovodikom (benzo[a]piren), ki so dokazano rakotvorni (Burger in sod., 2013; Sanli in sod., 2017). Še eno skupino pomembnih dejavnikov tveganja za razvoj raka sečnega mehurja predstavlja v pitni vodi prisotna visoka vsebnost arzena ter stranskih produktov, ki so posledica kloriranja vode (Efstathiou in Zietman, 2016; Guo in sod., 1997; King in Marrett, 1996; Marshall in sod., 2007; Villanueva in sod., 2003). Poleg okoljskih dejavnikov igra pomembno vlogo pri nastanku in rasti tumorjev mehurja tudi genetska variabilnost (Czerniak in sod., 2016). Dedni polimorfizmi v genih, ki kodirajo encima N-acetiltransferazo 2 (*NAT2*) in glutation S-transferazo Mu 1 (*GSTM1*), vključena pri presnovi aromatskih aminov in policikličnih aromatskih ogljikovodikov, so povezani s povečanim tveganjem za rak sečnega mehurja, saj imajo za posledico zmanjšanje ali izgubo funkcije teh metabolnih encimov (García-Closas in sod., 2005; Golka in sod., 1997; Knowles in Hurst, 2015). Asociacijske študije na celotnem genomu (GWAS) so odkrile enonukleotidne polimorfizme (SNP, angl. *Single Nucleotide Polymorphism*), ki so povezani z zmernim tveganjem za raka mehurja. Gre za SNP, ki so v bližini kandidatnih genov: *TP63*, *UGT1A*, *CCNE1*, *APOBEC3A*, *CBX6*, *TACC3*, *FGFR3*, *PSCA*, *TERT*, *CLPTMIL* in *TMEM129* (Cumberbatch in sod., 2018b; Figueroa in sod., 2014; Knowles in Hurst, 2015; Petersen in sod., 2010).

2.2.4 Molekularna biologija raka sečnega mehurja

Specifične delecije kromosomskih odsekov, genske mutacije, epigenetske spremembe ter spremembe v delovanju določenih miRNA lahko vodijo v karcinogenezo. Te spremembe spreminjajo različne celične funkcije, kar vodi v izogibanje apoptoze, neodzivnost na mehanizme, ki uravnavajo število celičnih delitev, povečano angiogenezo in nazadnje invazijo v sosednje organe ali/in oddaljene organe (Cheng in sod., 2011; Hanahan in Weinberg, 2000; Novaković, 2018; Shin in sod., 2018).

Pri približno 50 % NMIBC je prisotna izguba heterozigotnosti (LOH) na kromosomu 9, kar lahko povzroči inaktivacijo tumor supresorskega gena *CDKN2A* (Lindgren in sod., 2006; Obermann in sod., 2003; Sanli in sod., 2017; Simoneau in sod., 2000). Druge najpogostejše genetske spremembe pri bolnikih z NMIBC so mutacije v promotorski regiji gena *TERT* (v 70–80 % primerov) (Hurst in sod., 2014; Sanli in sod., 2017). Te mutacije vodijo v prekomerno izražanje in aktivnost TERT, kar vodi v podaljševanje telomer. Več kot 70 % bolnikov z NMIBC ima aktivacijske mutacije v genu *FGFR3*, ki kodira tirozin-kinazni receptor FGFR3 (Sanli in sod., 2017; Sibley in sod., 2001; van Rhijn in sod., 2014). FGFR3 je pri bolnikih z NMIBC čezmerno izražen in posledično vodi do nenadzorovane celične proliferacije in urotelijske hiperplazije (Knowles, 2007). Skupaj z mutacijami v *FGFR3* se pogosto pojavljajo tudi mutacije v *PIK3CA* (v 16–25 % primerov) (Kompier in sod., 2010; López-Knowles in sod., 2006; Sanli in sod., 2017). Pri približno 30 % bolnikov z NMIBC je mutiran tumor supresorski gen *STAG2*, ki kodira podenoto kohezinskega kompleksa, katerega funkcija je ločitev sestrskih kromatid med delitvijo celic (Aquila in sod., 2018; Sanli in sod., 2017; Taylor in sod., 2014). Po drugi strani ima 15 % bolnikov z NMIBC mutacije v tumor supresorskemu genu *TSC1*, katerega funkcija je uravnavanje izražanja mTOR, ki je pri raku sečnega mehurja čezmerno aktiviran (Platt in sod., 2009).

Za MIBC so značilne mutacije v tumor supresorskemu genu *TP53* (približno 50 % bolnikov) (Weinstein in sod., 2014). *TP53* kodira protein p53, ki zavira napredovanje celičnega cikla (Rivlin in sod., 2011). Pri napredovanju rakavih urotelijskih celic sodeluje tudi tumor supresorski gen *RBI*, ki je mutiran pri 15 % bolnikov, ki zbolijo z MIBC (Nordentoft in sod., 2014). Poleg tega so homozigotne delecije in mutacije v genu *CDKN2A* značilne za približno 20 % bolnikov z MIBC (Rebouissou in sod., 2012; Sanli in sod., 2017). Mutacije v *FGFR3* in *PIK3CA* so prisotne pri bolnikih z MIBC, vendar v manjši frekvenci v primerjavi z NMIBC (v 5–20 % oz. 9–20 % primerov) (Sanli in sod., 2017). Prav tako ima 17 % bolnikov z MIBC mutacijo v tumor supresorskemu genu *PTEN*, ki regulira signalno pot Akt (Knowles in sod., 2009; Platt in sod., 2009; Sanli in sod., 2017).

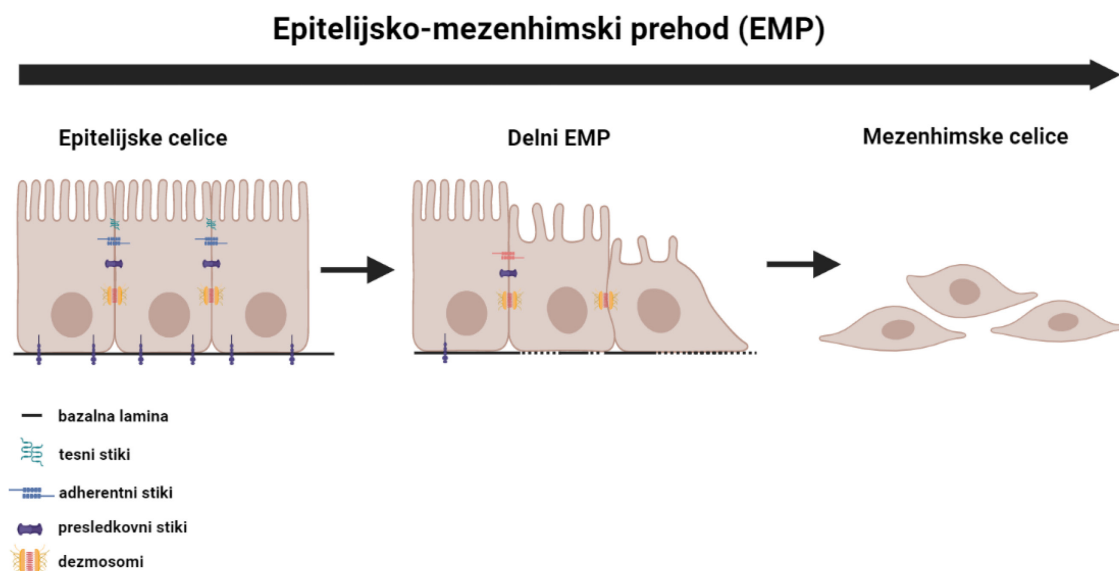
2.2.5 Zdravljenje

Zdravljenje raka sečnega mehurja je odvisno od stadija bolezni. Transuretralna resekcija tumorja sečnega mehurja (TURBT) je glavna izbira zdravljenja neinvazivne oblike raka (Rebek in sod., 2018). Bolniki s tumorji T1 imajo ponoven TURBT v obdobju 2–6 tednov po prvem posegu (Chang in sod., 2016; Cumberbatch in sod., 2018a; Rebek in sod., 2018). Bolnike z majhnim tveganjem za ponovitev bolezni se po operaciji spremlja z rednimi citoskopskimi pregledi. Po drugi strani se bolnike s srednjim ali visokim tveganjem za ponovitev ali napredovanje bolezni v invazivno obliko še dodatno zdravi z bodisi intravezikalno kemoterapijo (mitomicin C, epirubicin, pirarubicin), bodisi z imunoterapijo (aplikacija cepiva *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)) (Babjuk in sod., 2022; Rebek in sod., 2018; Taskovska in sod., 2020; Sanli in sod., 2017). Za bolnike, ki so neodzivni na zdravljenje z BCG ali tiste, pri katerih je odkrit tumor CIS, je značilna radikalna cistektomija (odstranitev sečnega mehurja) (Babjuk in sod., 2022; Chade in sod., 2010; Rebek in sod., 2018; Sanli in sod., 2017). Radikalna cistektomija z odstranitvijo regionalnih bezgavk je zlati standard za zdravljenje MIBC (Alfred Witjes in sod., 2017; Rebek in sod., 2018). Glede na razširjenost tumorja se lahko uvede pred ali pooperativna kemoterapija. Najpogosteje uporabljena kombinacija kemoterapevtikov je gemcitabin in cisplatin oziroma metotreksat, vinblastin, adriamicin in cisplatin (Alfred Witjes in sod., 2017; Rebek in sod., 2018; Witjes in sod., 2020). Za nekatere bolnike z MIBC je primerno tudi tako imenovano ohranitveno kombinirano zdravljenje s TURBT, kemoterapijo in obsevanjem, pri čemer se sečni mehur ohrani (Ploussard in sod., 2014; Rebek in sod., 2018). Bolnike z metastazami, ki so neodzivni na sistemsko kemoterapijo ali niso primerni za kemoterapijo s cisplatinom se zdravi z zaviralci imunskih kontrolnih točk (atezolizumab, pembrolizumab, avelumab) (Alfred Witjes in sod., 2017; Eckstein in sod., 2019; Rebek in sod., 2018; Stenehjem in sod., 2019; Tran in sod., 2021).

2.3 EPITELIJSKO-MEZENHIMSKI PREHOD

Epitelijsko-mezenhimski prehod (EMP) je dinamičen proces, ki igra osrednjo vlogo v embrionalnem razvoju in obnavljanju tkiv (Czerniak in sod., 2016). Med EMP epitelijske celice pridobijo mezenhimski fenotip, kar privede do funkcionalnih spememb pri migraciji in invaziji celic (Yang in sod., 2020). EMP se začne z izgubo tesnih stikov in apiko-bazalne polariziranosti epitelijskih celic (Slika 3). Med EMP se v celicah reorganizira citoskelet, spremenijo se tudi signalne poti, ki določajo obliko celic in izražanje genov. Skupaj te spremembe povečajo gibljivost posameznih celic, kar omogoča vdor in premikanje skozi medceličnino (Dongre in Weinberg, 2019; Lamouille in sod., 2014). EMP vodijo z EMP povezani traskripcijski faktorji (EMP-TF), in sicer SNAIL, SLUG, ZEB in TWIST. Delujejo pleiotropno in v različnih kombinacijah, s čimer zavirajo izražanje genov, ki vzdržujejo epitelijsko stanje (*CDH1*, *OCLN*, *CLDN*, *EPCAM*) in aktivirajo gene, povezane z mezenhimskim fenotipom (*CDH2*, *VIM*, *FNI*, *MMP*) (Dongre in Weinberg, 2019). Izražanje in aktivacija EMP-TF sta odvisna od

različnih signalnih poti posredovanimi s: TGF β , BMP, Wnt, Notch, Hedgehog, receptorskimi tirozin-kinazami (RTK), hipoksijo in z medceličnino (Gonzalez in Medici, 2014).



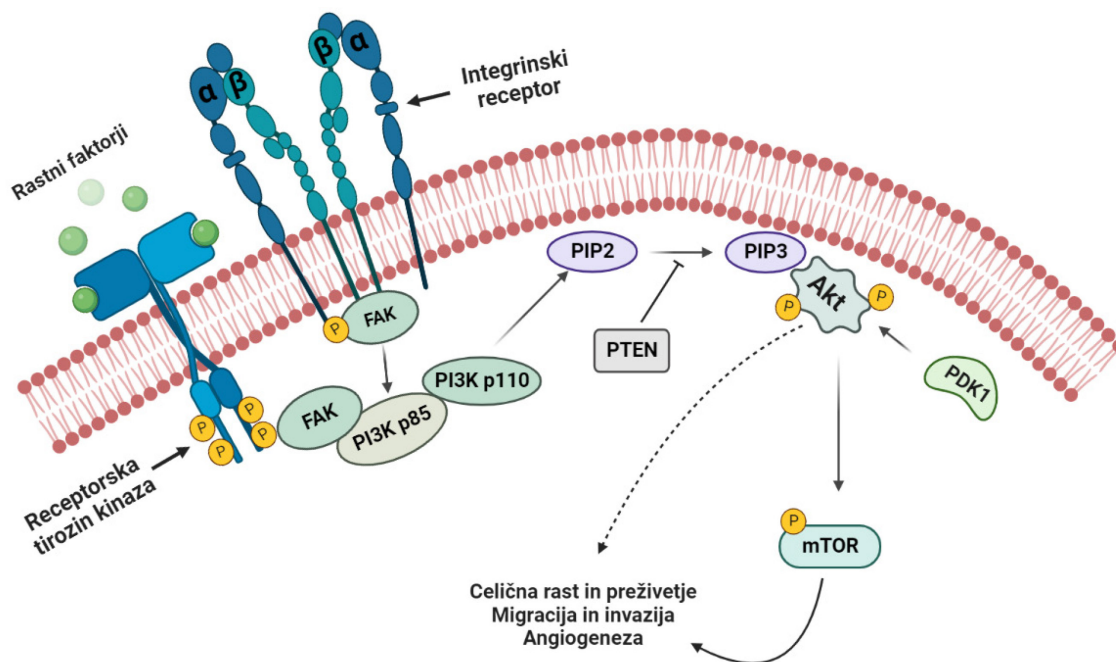
Slika 3. Shematski prikaz epitelijsko-mezenhimskega prehoda (EMP). Za epitelijske celice, ki so podvržene EMP, je značilna izguba medceličnih stikov ter spremembe v fenotipu in polariziranosti. Za rakave celice je značilen delni EMP, pri čemer celice sočasno izražajo epitelijske in mezenhimske označevalce. Slika je izrisana s spletnim orodjem BioRender.

Vedno več je dokazov, da je ta drugače normalen fiziološki proces vpleten tudi v različne patološke procese, kot sta invazija in metastaziranje tumorjev epitelijskega izvora (Brabletz in sod., 2018; Lee in sod., 2006; Xu in sod., 2015). EMP-TF igrajo pomembno vlogo v vseh fazah napredovanja raka od iniciacije in rasti primarnega tumorja do invazije ter metastaziranja (Brabletz in sod., 2018; Nieto in sod., 2016). Vedno več je podatkov, da je popolni EMP pri humanih karcinomih redek, pogostejši je delni EMP (Aiello in Kang, 2019; Aiello in sod., 2018; Saitoh, 2018; Saxena in sod., 2020). Za delni EMP je značilno sočasno izražanje epitelijskih in mezenhimskih označevalcev (Saitoh, 2018). Študije so pokazale, da delni EMP rakavim celicam omogoča kolektivno celično migracijo v skupjih, kar predstavlja večje tveganje za pojav metastatske bolezni (Brabletz in sod., 2018; Saitoh, 2018; Saxena in sod., 2020). Poleg tega, da postanejo gibljive in invazivne, rakave celice, ki so podvržene delnemu EMP, pridobijo odpornost na zdravila in kemoterapevtike (Dongre in Weinberg, 2019).

Študije kažejo, da je EMP vpleten tudi v karcinogenezo sečnega mehurja (McConkey in sod., 2009; Yun in Kim, 2013). Za MIBC je značilna izguba izražanja E-kadherina, tesnostičnih proteinov in zmanjšano izražanje citokeratinov ter povišano izražanje mezenhimskih označevalcev, kot so N-kadherin, vimentin, fibronektin, metaloproteinaze matriksa (MMP) in EMP-TF (TWIST, ZEB1) (Knowles in Hurst, 2015; McConkey in sod., 2009; Song in sod., 2014; Xiaong in sod., 2021; Yun in Kim, 2013).

2.4 SIGNALNA POT PI3K/Akt/mTOR

Signalna pot PI3K/Akt/mTOR je del različnih signalnih poti, med drugim s signalnimi potmi posredovanimi s TGF β , RTK, in z medceličnino, ki posredno ali neposredno sprožajo EMP (Roshan in sod., 2019; Xu in sod., 2015). Signalno pot PI3K/Akt/mTOR aktivirajo številne navzgorne molekule, vključno s fokalno adhezijsko kinazo (FAK) (Slika 4) (Sulzmaier in sod., 2014). Slednja fosforilira PI3K in jo aktivira. PI3K je heterodimer, sestavljen iz katalitične podenote p110 in adapterske/regulacijske podenote p85. Aktivna katalitična podenota PI3K p110 p110 α , ki jo kodira gen *PIK3CA*, fosforilira fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (PIP2) v fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfat (PIP3). Ko se fosfolipid PIP3 veže s serin/treonin protein kinazo Akt, se ta fosforilira z od 3-fosfoinozidida odvisno protein kinazo-1 (PDK1) in se tako aktivira (Ching in Hansel, 2010; Gonzalez in Medici, 2014; Xu in sod., 2015). Aktivirana Akt nato fosforilira vrsto substratov in tako vpliva na različne celične-biološke procese, kot so celična proliferacija, rast diferenciacija, preživetje, senescenca, apoptoza, presnova, avtofagija, angiogeneza in migracija (Xu in sod., 2015; Xu in sod., 2014; Yu in sod., 2015). Eden izmed glavnih navzdolnjih efektorjev Akt je tarča rapamicina pri sesalcih (mTOR, angl. *mammalian target of rapamycin*) (Ching in Hansel, 2010; Porta in sod., 2014). Aktivacija mTOR vodi do povečane sinteze več proteinov (npr. ciklin D1), ki so vpleteni v patogenezo tumorjev (Ching in Hansel, 2010). Izražanje mTOR regulirajo še druge molekule in signalne poti, ki so neodvisne od Akt. Kot odgovor na mitogene signalne, se v celicah aktivira signalna pot Ras/MEK/ERK, kar aktivira mTOR. Na aktivacijo mTOR vpliva tudi razpoložljivost hranil, npr. aminokislin. Signalizacija preko mTOR je odvisna tudi od hipoksije, saj ta proces izčrpa znotrajcelične energetske zaloge ter posledično inhibira aktivacijo mTOR (Memmott in Dennis, 2009).



Slika 4. Shematski prikaz signalne poti PI3K/AKT/mTOR. Receptorske tirozin kinaze in integrinski receptorji aktivirajo FAK, ki posledično fosforilira PI3K. PI3K je sestavljen iz regulacijske podenote p85 in katalitične podenote p110, ki katalizira pretvorbo fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (PIP2) v fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfat (PIP3). Vezava PIP3 na Akt sproži fosforilacijo slednje z od 3-fosfoinozotida odvisne protein kinaze-1 (PDK1). Akt aktivira številne molekule, vključno z mTOR. Prekomerna aktivnost signalne poti PI3K/Akt/mTOR spodbuja celično rast, preživetje, angiogenezo, migracijo, invazijo in celic. Protein PTEN defosforilira PIP3 s čimer inhibira aktivacijo Akt. P-fosfatna skupina. Slika je izrisana s spletnim orodjem BioRender.

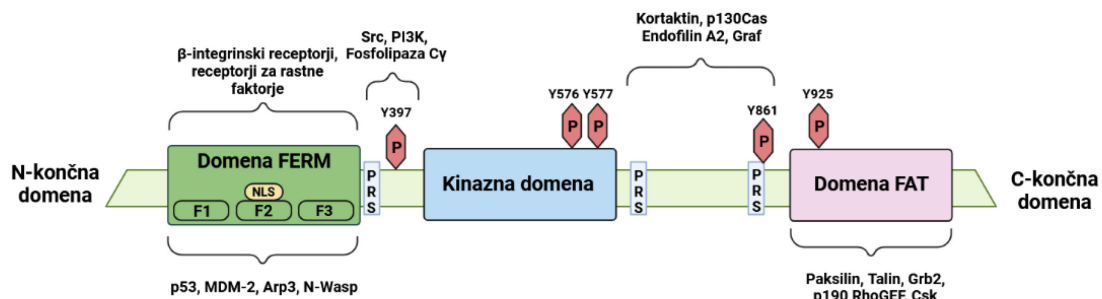
Signalna pot PI3K/Akt/mTOR je prekomerno izražena in aktivirana pri različnih vrstah raka, tudi v raku sečnega mehurja (Knowles in sod., 2009). Študije so pokazale, da aktivirana signalna pot PI3K/Akt/mTOR sproži migracijo in invazijo rakavih urotelijskih celic (Neoh in sod., 2017; Sathe in Nawroth, 2018). Hansel in sodelavci so ugotovili, da je fosforilacija mTOR povezana z zmanjšanim preživetjem bolnikov z rakom sečnega mehurja. Poleg tega so pokazali, da je inhibicija mTOR zmanjšala proliferacijo in migracijo rakavih urotelijskih celic RT4, T24, J82 ter UMUC3 *in vitro*. Ista raziskovalna skupina je ugotovila, da inhibicija mTOR zmanjša velikost tumorja v mišjem modelu raka sečnega mehurja (Hansel in sod., 2010). Te rezultate je podprla druga študija *in vivo*, kjer so pokazali, da inhibicija mTOR preprečuje napredovanje iz CIS v invazivno obliko raka sečnega mehurja (Seager in sod., 2009).

2.5 FOKALNA ADHEZIJSKA KINAZA (FAK)

2.5.1 Strukturne značilnosti FAK

FAK je nereceptorska, citoplazemska tirozin kinaza, prisotna v fokalnih stikih (Schaller in sod., 1992). Poleg opravljanja kinazne funkcije, FAK deluje tudi kot ogrodni protein, s čimer sodeluje pri prenosu signala med različnimi molekulami (Sulzmaier in sod.,

2014). Protein FAK kodira gen *PTK2*, ki se nahaja na kromosomski regiji 8q24.3 (Chuang in sod., 2022). FAK je sestavljen iz osrednje kinazne domene, ki je obkrožena z N-končno in C-končno domeno (Slika 5) (Chuang in sod., 2022; Parsons, 2003).



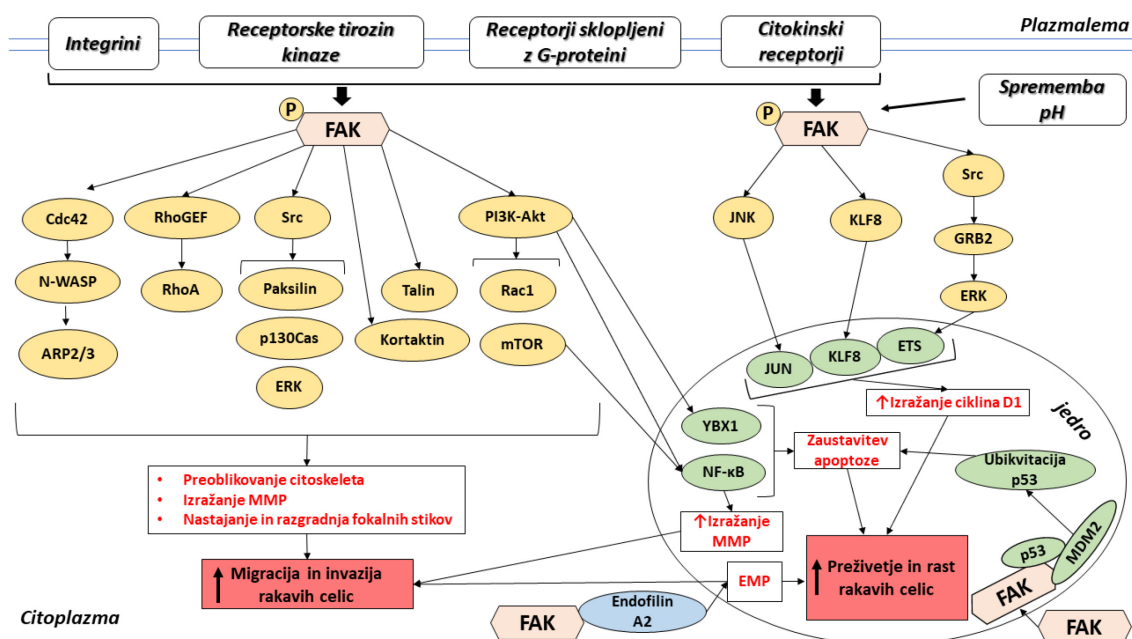
Slika 5. Shematski prikaz domen fokalne adhezijske kinaze (FAK). FAK je zgrajen iz N-končne domene, kinazne domene in C-končne domene. Fosforilacija (P) poteka na številnih tirozinskih ostankih (Y), vključno z Y397, Y576, Y577, Y861 in Y925. V strukturi FAK so poleg domeni FERM in FAT, tri regije bogate s prolino (PRS), ki predstavljajo vezavno mesto za številne proteine. N-končna domena FERM je razdeljena na tri poddomene F1, F2 in F3. V poddomeni F2 je jedrni lokalizacijski signal (NLS), ki FAK omogoči vezavo na importin in transport v jedro. Na sliki so prikazani še proteini, ki reagirajo s FAK in uravnavajo številne biološke procese. Slika je izrisana s spletnim orodjem BioRender.

N-končna domena vsebuje ne-katalitično domeno FERM, ki je razdeljena na tri poddomene: F1, F2 in F3 (Frame in sod., 2010). Domena FERM reagira z različnimi β -integrinskimi receptorji in receptorji za rastne faktorje, s čimer uravnava različne interakcije med proteini ter med proteini in lipidi (Frame in sod., 2010). Preko zaporedij v poddomeni F1, FAK reagira s tumor supresorskim proteinom p53 in tako regulira celično preživetje. Preko domene FERM F3, FAK stabilizira povezavo med ubikvitin-ligazo MDM-2 in p53 in tako spodbudi razgradnjo slednjega (Lim in sod., 2008). Študije so pokazale, da preko domene FERM F1 FAK reagira z ARP3, podenoto kompleksa ARP2/3, in tako spodbuja nukleacijo aktina (Frame in sod., 2010; Serrels in sod., 2007). Kljub temu da je FAK v glavnem lokaliziran v fokalnih stikih, lahko vstopi v jedro preko jedrnega lokalizacijskega signala (NLS), ki se nahaja v poddomeni F2 (Ossovskaya in sod., 2008). Glavno mesto avtofosforilacije je na tirozinu (Y) 397. Y397 se nahaja na koncu N-končne domene za regijo, bogato s prolino (PRS) (Lietha in sod., 2007). Domena FERM deluje kot regulator aktivnosti FAK bodisi z vezavo na kinazno domeno bodisi z blokiranjem dostopa do Y397, ali pa s preprečevanjem avtofosforilacije (Cooper in sod., 2003; Lietha in sod., 2007). Vezava citoplazemskega dela β -integrinskih receptorjev in receptorjev za rastne faktorje z domeno FERM povzroči konformacijske spremembe, kar sproži avtofosforilacijo na mestu Y397 (Frame in sod., 2010; Lietha in sod., 2007). To vodi v nastanek visoko afinitetnih vezavnih mest za različne proteine, vključno s kinazami družine Src (Mitra in Schlaepfer, 2006), fosfolipazo $C\gamma$ (Zhang in sod., 1999) in podenoto p85 fosfoinozimid 3-kinaze (PI3K) (Xia in sod., 2004). Kinazna domena leži v središču proteina FAK in vsebuje dve glavni fosforilacijski mesti Y576 in Y577 (Owen in sod., 1999). Po avtofosforilaciji Y397 vezava kinaze Src sproži fosforilacijo na mestih Y576 in Y577, kar vodi v popolno katalitsko aktivacijo FAK (Calalb in sod., 1995; Zhao in

Guan, 2009). Za nekatalitično C-končno domeno so značilne dve domeni PRS ter domena FAT, ki reagira s proteini fokalnih stikov (Mitra in sod., 2005). Domena FAT določa subcelično lokacijo FAK, saj se veže na paksilin in talin in tako usmerja FAK v fokalne stike (Schlaepfer in sod., 2004). Preko PRS reagira FAK z različnimi proteini, vključno s proteini p130Cas (Bouton in sod., 2001), Graf (Parsons, 2003) in endofilinom A2 (Wu in sod., 2005). Na C-končni domeni se nahajata še dve fosforilacijski mesti, in sicer Y861 in Y925, ki zagotavljata vezavna mesta za proteine, ki vsebujejo domeno SH2 (Calalb in sod., 1996; Schlaepfer in Hunter, 1996).

2.5.2 Vloga FAK v rakavih celicah

Receptorji na površini celice, kot so integrini, receptorske tirozin kinaze, citokinski receptorji, in receptorji sklopljeni z G-proteini ter spremembe pH v celici (Sulzmaier in sod., 2014), posredujejo signale proteinu FAK, ki nato sproži različne signalne poti, ki so bistvene za celično adhezijo (Michael in sod., 2009), migracijo (Sieg in sod., 1999; Sieg in sod., 2000), preživetje in proliferacijo (Lim in sod., 2008; Sulzmaier in sod., 2014). Mnogi od teh procesov so v tumorju spremenjeni. V tem poglavju bomo opisali vlogo FAK pri uravnavanju preživetja, proliferacije, migracije in invazije rakavih celic (Slika 6).



Slika 6. FAK regulira izražanje in aktivacijo molekularnih tarč, ki uravnavajo procese povezane z nastankom in napredovanjem raka. Številni proteini, vključno z integrini, receptorskimi tirozin kinazami, receptorji sklopljenimi z G-proteini, citokinskimi receptorji ter spremembe pH v citosolu aktivirajo FAK. Aktiviran FAK z vplivom na Cdc42, RhoGEF, Src, talin, kortaktin, PI3K sodeluje pri preoblikovanju citoskeleta, nastanku in obnovi fokalnih stikov ter izražanju MMP, s čimer spodbuja migracijo in invazijo rakavih celic. FAK spodbuja proliferacijo in preživetje rakavih celic preko signalne poti JNK, KLF8 in kompleksa Src/ERK. Signalna pot FAK/PI3K/Akt zavira apoptozo rakavih celic z vplivom na YBX1 in NF-κB. Jedrni FAK deluje kot ogrodni protein in reagira z MDM2 in p53, s čimer

poveča razgradnjo slednjega in tako spodbuja preživetje rakavih celic. FAK spodbuja izražanje epitelijsko-mezenhimskih označevalcev z vezavo na endofilin A2. P-fosfatna skupina, vezana na protein; RhoGEF-Rho izmenjevalni faktor nukleotidov gvanin; MMP-metaloproteinaze matriksa, KLF8-Krüppelu podoben faktor 8; JNK-N-terminalna kinaza c-Jun; NF- κ B-nuklearni transkripcijski faktor kappa B; YBX1-Y-box vezavni protein 1 (Y-box transkripcijski faktor). Slika je prirejena po (Sulzmaier in sod., 2014).

2.5.2.1 FAK spodbuja preživetje in proliferacijo rakavih celic

FAK-posredovana signalizacija igra ključno vlogo pri uravnavanju preživetja rakavih celic (Sulzmaier in sod., 2014). Prekomerna fosforilacija FAK spodbuja vezavo proteina Grb2, kar povzroči aktivacijo ERK in posledično povečano izražanje ciklina D1. Ta je ključni regulator celičnega cikla, saj nadzoruje napredovanje celičnega cikla iz faze G1 v fazo S (Zhao in sod., 2001). Poleg tega FAK uravnava celični cikel preko kompleksa Src/p130cas, ki aktivira signalno pot N-terminalne kinaze c-Jun (JNK) (Oktay in sod., 1999). Študije so pokazale, da je prekomerno izražanje FAK povezano z odpornostjo na anoikis oziroma na mehanizem celične smrti, ki je posledica pomanjkanja stikov med celicami in medceličnino. Kompleks FAK/Src namreč spodbuja aktivacijo signalnih kaskad PI3K/Akt in MAPK/ERK (Ras-Raf-MEK-ERK), s čimer se poveča sposobnost preživetja in rasti rakavih celic, ki so izgubile celične stike (Bouchard in sod., 2007). Poleg tega kompleks PI3K/Akt spodbuja aktivacijo nuklearnega transkripcijskega faktorja kappa B (NF- κ B), kar poveča izražanje inhibitorjev apoptoze (You in sod., 2015). Študije so pokazale, da FAK vpliva na apoptozo rakavih celic z regulacijo tumor supresorskega proteina p53. Jedrni FAK se namreč veže na p53, s čimer zavira njegovo aktivnost. Prav tako FAK spodbuja razgradnjo p53 tako, da stabilizira interakcijo med MDM-2 in p53. (Lim in sod., 2008).

2.5.2.2 FAK spodbuja migracijo rakavih celic

Migracija rakavih celic je ključni korak k metastatskemu širjenju rakavih celic na sekundarne lokacije (Yamazaki in sod., 2005). Glavna mehanizma, s katerima FAK uravnava adhezijo in migracijo rakavih celic, je tvorba fokalnega adhezijskega kompleksa in preoblikovanje citoskeleta (Chuang in sod., 2022).

2.5.2.2.1 Reorganizacija aktinskega citoskeleta

Preoblikovanje citoskeleta je ključen proces potreben za migracijo rakavih celic. Kot odgovor na specifične zunajcelične signale, znotrajcelične signalne kaskade sprožijo polimerizacijo aktinskih filamentov in nastanek membranskih izrastkov (lamelopodijev in filopodijev) na vodilnem robu migrirajočih rakavih celic (Tai in sod., 2015).

FAK vpliva na reorganizacijo aktinskega citoskeleta s svojim vplivom na majhne GTPaze (Slika 7). Majhne GTPaze (RhoA, RhoC, Cdc42 in Rac1) so članice družine proteinov Rho, ki imajo osrednjo vlogo pri reorganizaciji citoskeleta (Parri in Chiarugi, 2010; Ridley, 2006). Z uravnavanjem kontraktilnosti aktomiozina, RhoA in RhoC vplivata na

medcelične interakcije ter interakcije med celicami in medceličnino (Parri in Chiarugi, 2010). Rac1 in Cdc42 regulirata polimerizacijo aktina, s čimer spodbujata nastanek membranskih izrastkov (lamelopodijev in filopodijev) na vodilnem robu migrirajočih celic (Lamarche in sod., 1996; Ridley, 2006). Cdc42 igra tudi ključno vlogo pri nadzoru smeri migracije (Osmani in sod., 2010). Več študij je pokazalo, da FAK uravnava aktivacijo in inhibicijo RhoA z interakcijo s p190RhoGEF oziroma p190RhoGAP (Holinstat in sod., 2006; Zhai in sod., 2003). FAK spodbuja gibljivost celic s fosforilacijo nevrálnega proteina Wiskott-Aldrichovega sindroma (N-WASP), ki je navzdoljni efektor Cdc42. N-WASP aktivira ARP2/3, ki posreduje pri tvorbi razvejanih aktinskih mrež (Wu in sod., 2004). Poleg fosforilacije ima FAK zmožnost neposredne vezave na kompleks ARP2/3 preko zaporedij v svoji katalitično neaktivni domeni FERM (Serrels in sod., 2007). Hkrati FAK aktivira majhno GTPazo Rac1 preko kompleksa Src/p130cas/Crk (Sharma in Mayer, 2008) ali PI3K/Akt (Kallergi in sod., 2007; Reiske in sod., 1999; Yu in sod., 2018) in tako vpliva na polimerizacijo aktina.

2.5.2.2.2 Fokalni stiki

Lamelopodije in filopodije stabilizirajo fokalni stiki, ki povezujejo aktinski citoskelet z medceličnino (Ohashi in sod., 2017). Gre za večproteinske komplekse, ki delujejo kot središče za zaznavanje in prenos mehanskih signalov med celicami in njihovim mikrookoljem (Haase in sod., 2014). Fokalni stiki vključujejo številne proteine, kot so integrini, FAK, Src, p130Cas, vinkulin, paksilin, talin, tenzin, α -aktinin, kalpain, Rho GTPaze (Geiger in sod., 2001; Martino in sod., 2018).

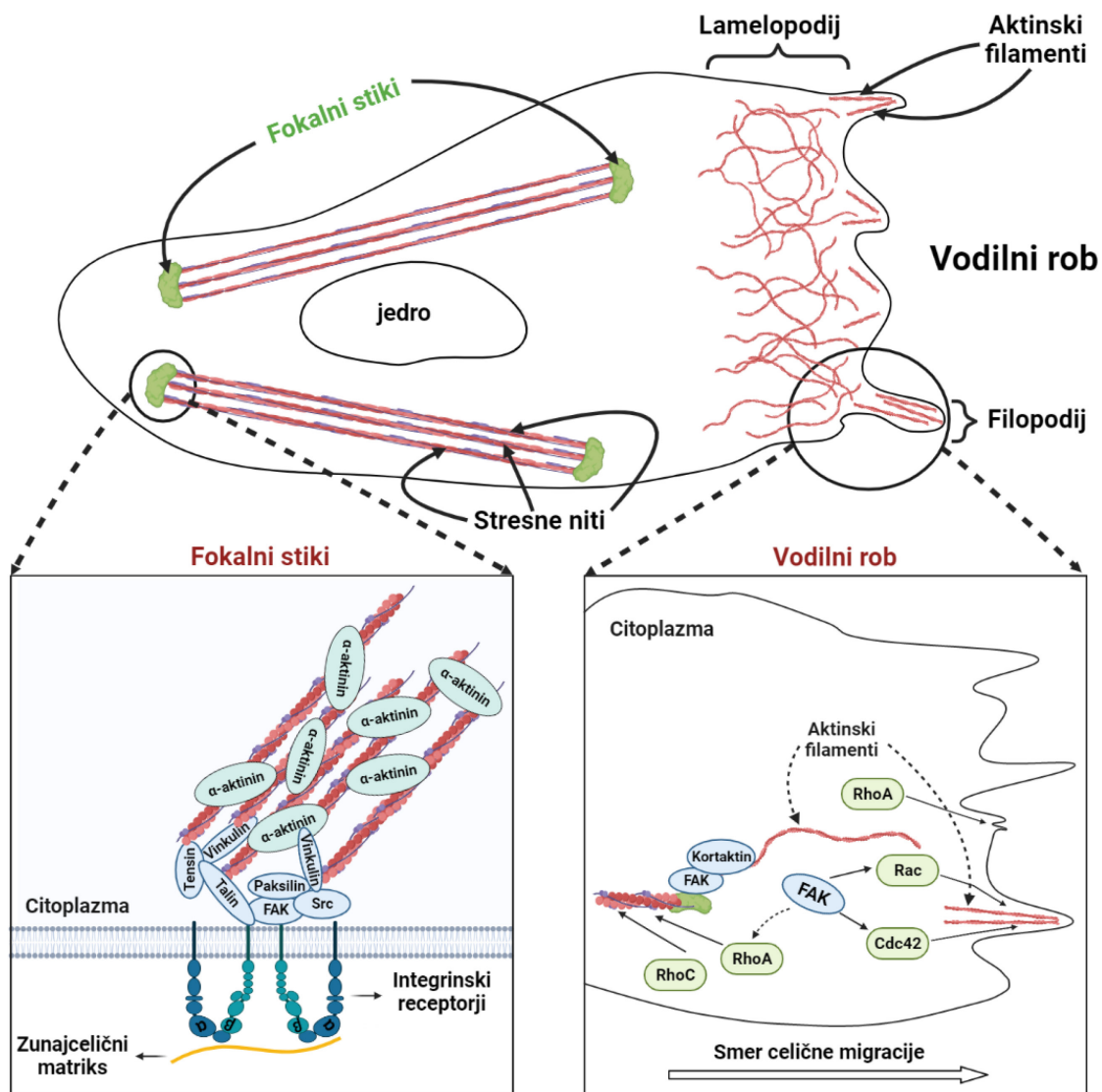
FAK je glavni regulator sestavljanja in razstavljanja fokalnih stikov. Ta dva procesa sta bistvena za učinkovito usmerjeno gibanje celic (Hu in sod., 2014). FAK je namreč ena izmed glavnih kinaz, ki interagira z različnimi proteini fokalnih stikov ter uravnava njihovo dinamiko. Paksilin je ogrodni protein, ki veže FAK in ga nato usmeri v fokalne stike, kjer pride do njegove aktivacije (Schaller, 2001). FAK se veže tudi na druge ogrodne proteine, in sicer talin (Lawson in sod., 2012), α -aktinin (Izaguirre in sod., 2001) in p130Cas (Cary in sod., 1998). Talin je 270 kDa velik adapterski protein, ki se veže na β -integrine in stimulira njihovo aktivacijo. Poleg tega talin vsebuje vezavna mesta za aktin in vinkulin, s čimer dodatno stabilizira povezavo med medceličnino in citoskeletom (Martino in sod., 2018). Podobno kot talin tudi vinkulin reagira z več proteini, ki uravnavajo nastanek in integriteto fokalnih stikov. Deluje kot ogrodni protein, ki povezuje transmembranske proteine z aktinskimi filamentami (Geiger in sod., 2001; Martino in sod., 2018). Glavna funkcija α -aktinina je oblikovanje aktomiozinskih stresnih vlaken (Martino in sod., 2018). V fokalnih stikih je prisoten tudi tenzin, ki prav tako sodeluje pri navzkrižnem povezovanju aktinskih filamentov in se lahko poveže z ostalimi proteini fokalnih stikov (integrini, p130Cas) (Lo, 2004).

FAK ne spodbuja le nastanka fokalnih stikov, temveč sodeluje tudi pri obnavljanju

oziroma recikliranju fokalnih stikov. FAK fosforilira α -aktinin v vezavni domeni za aktin in s tem zmanjša njegovo zmožnost oblikovanja stresnih niti (Izaguirre in sod., 2001). Poleg tega se FAK lahko veže na proteazo kalpain-2, ki cepi številne proteine v fokalnih stikih, vključno s talinom (Franco in sod., 2004), paksilinom (Cortesio in sod., 2011) in samim proteinom FAK (Carragher in sod., 2003). FAK uravnava dinamiko fokalnih stikov tudi preko vpliva na kortaktin. Slednji je citoplazemski protein, ki veže aktinske filamente in spodbuja njihovo nukleacijo (Weed in Parsons, 2001). Kortaktin deluje kot premostitvena molekula, saj povezuje aktinski citoskelet s fokalnimi stiki. N-končna domena kortaktina se povezuje z aktinskimi filamenti, medtem ko se njegova C-končna domena veže na FAK (Wang in sod., 2011). Slednji lahko fosforilira kortaktin neposredno ali preko kompleksa FAK/Src (Tomar in sod., 2012). Fosforilacija kortaktina oslabi vezavo med kortaktinom in FAK ter povzroči destabilizacijo fokalnih stikov, kar omogoča spremembe v obliki celice, potrebne za učinkovito gibanje (Tomar in sod., 2012).

2.5.2.3 FAK spodbuja invazijo rakavih celic

Poleg povečane celične gibljivosti, ki je posledica sprememb v dinamiki citoskeletnih in fokalnih adhezijskih struktur, so za uspešno invazijo skozi medceličnino potrebne tudi spremembe v izražanju ali aktivaciji MMP. Številne študije so pokazale, da povečano izražanje FAK spodbuja aktivacijo MMP na vodilnem robu migrirajočih celic, kar vodi do povečane proteolize zunajceličnih proteinov (Canel in sod., 2008; Sein in sod., 2000). FAK uravnava izražanje in aktivnost MMP-2 in MMP-9 preko signalnega kompleksa Src/p130Cas/Crk/Dock180, ki vodi do aktivacije proteina JNK preko GTPaze Rac1 (Hsia in sod., 2003). Wu in sodelavci so ugotovili, da signalni kompleks FAK/Src zavira endocitozo transmembranskega proteina MT1-MMP, ki sodeluje pri razgradnji medceličnine. Pokazali so tudi, da FAK, z vezavo na endofilin A2 preko svoje nekatalitične C-terminalne domene, spodbuja izražanje MT1-MMP na plazmalemi celic. MT1-MMP katalizira pretvorbo MMP-2 iz pro- v aktivno obliko, s čimer spodbuja invazijo rakavih celic (Wu in sod., 2005).



Slika 7. Shematski prikaz migrirajoče celice s fokalnimi stiki in vodilnim robom. Signalne molekule (Rho-GTPaze) sprožijo polimerizacijo aktinskih filamentov in nastanek membranskih izrastkov (lamelopodijev in filopodijev) na vodilnem robu migrirajočih celic. Sledi nastanek več proteinskih kompleksov (fokalni stiki), ki povezujejo znotrajcelični aktinski citoskelet z zunajceličnim matriksom. FAK se nahaja v fokalnih stikih in igra ključno vlogo pri uravnavanju celične adhezije in migracije. Vpliva na preoblikovanje aktinskega citoskeleta in stabilizacijo fokalnih stikov z vplivom na kortaktin in aktivnost majhnih Rho-GTPaz (RhoA, RhoC, Cdc42 in Rac1). Kortaktin je ogradni protein, ki povezuje fokalne stike z aktinskim citoskeletom. RhoA, Rac in Cdc42 spodbujajo nastanek membranskih izrastkov (lamelopodijev in filopodijev) na vodilnem robu migrirajočih celic. RhoA in RhoC vplivata na kontraktilnost stresnih niti (aktomiozinskega kompleksa). Slika je izrisana s spletnim orodjem BioRender.

2.5.3 Klinični pomen izražanja FAK pri raku

Kljub temu da FAK ni onkogen, sta njegovo prekomerno izražanje in fosforilacija povezana z različni vrstami raka, vključno s ploščatoceličnim karcinomom glave in vratu (Canel in sod., 2006), nevroblastomom (Beierle in sod., 2008), rakom dojke (Cance in sod., 2000), rakom jajčnikov (Sood in sod., 2004) in rakom debelega črevesja (Cance in

sod., 2000). V zadnjih nekaj letih so študije pokazale, da je povečano izražanje FAK povezano s slabo prognozo pri raku sečnega mehurja. Zhang in sodelavci so proučili izražanje FAK pri bolnikih z rakom sečnega mehurja in z imunohistokemijskimi metodami pokazali, da je izražanje FAK bistveno višje v rakavem tkivu kot v sosednjem zdravem tkivu. Poleg tega so ugotovili, da je raven FAK bistveno višja pri bolnikih z mišično invazivno obliko raka (T2–T4) kot pri bolnikih s tumorjem Ta in T1. Prav tako so z analizo preživetja po Kaplan-Meierju pokazali, da je čezmerno izražanje FAK povezano z manjšim preživetjem (Zhang in sod., 2018a).

2.5.4 Inhibitorji FAK

V zadnjih letih je postal FAK obetavna tarča za zdravljenje raka, saj so eksperimentalni podatki, pokazali, da ima pomembno vlogo v celičnih procesih, ki spodbujajo nastanek in razvoj rakavih obolenj. Inhibitorji FAK, ki so trenutno del predkliničnih in kliničnih raziskav, so na splošno razdeljeni v tri skupine: a) ATP-kompetitivni inhibitorji kinazne funkcije, b) molekule, ki blokirajo katalitično aktivnost FAK na alternativne načine in c) molekule, ki blokirajo ogrodno funkcijo FAK (Sulzmaier in sod., 2014). ATP-kompetitivni inhibitorji so derivati pirimidina ali piridina, ki zmanjšajo katalitično aktivnost FAK tako, da se vežejo v vezavno mesto za ATP in s tem preprečijo fosforilacijo na Y397 (Slack-Davis in sod., 2007; Sulzmaier in sod., 2014; Tanjoni in sod., 2010). Inhibitorji FAK, ki blokirajo aktivnost FAK na alternativne načine se vežejo na različna kinazna mesta, ki ne tekmujejo z molekulami ATP, zaradi česar posledično zmanjšajo katalitično funkcijo FAK (Golubovskaya in sod., 2012; O'Brien in sod., 2014). Za blokiranje ogrodne funkcije FAK so razvili inhibitorje, ki zavirajo interakcije FAK z različnimi proteini in ne vplivajo na njegovo katalitično funkcijo (Golubovskaya in sod., 2013; Kandil in sod., 2018). Kljub možnosti za nespecifično vezavo, ATP-kompetitivni inhibitorji predstavljajo večino uporabljenih inhibitorjev FAK z obetavno uspešnostjo v kliničnih študijah (Spallarosa in sod., 2022). V eksperimentalnem delu doktorske naloge smo uporabili ATP-kompetitivne inhibitorje, ki jih bomo podrobneje opisali v naslednjih podglavijih.

2.5.4.1 PF-573,228

PF-573,228 je derivat bisamino piramidina, ki zavira kinazne aktivnosti FAK (Slack-Davis in sod., 2007; Tai in sod., 2015). Slack-Davis in sodelavci so pokazali, da PF-573,228 zavira migracijo ter zmanjša recikliranje fokalnih stikov z zmanjšanjem fosforilacije FAK in navzdolnjega efektorja paksilina. Kljub zmanjšani fosforilaciji FAK je imela ta spojina majhen zaviralni učinek na celično proliferacijo in apoptozo normalnih fibroblastov ter rakavih celic prostate (Slack-Davis in sod., 2007). Po drugi strani so Kong in sodelavci pokazali, da inhibitor PF-573,228 sproži apoptozo s TGF-beta stimuliranimi rakavimi urotelijskimi celicami T24 (Kong in sod., 2015). Prav tako je ista raziskovalna skupina pokazala, da PF-573,228 zavira migracijo in invazijo s TGF-beta stimuliranih rakavih urotelijskih celic T24 (Kong in sod., 2017). Do zdaj je bila učinkovitost PF-

573,228 proučevana le v *in vitro* ter *in vivo* študijah, vendar ne v kliničnih raziskavah.

2.5.4.2 PND-1186

PND-1186 ali VS-4718 je piridinski reverzibilni inhibitor kinazne aktivnosti FAK. Tanjoni in sodelavci so pokazali, da PND-1186 zavira migracijo celic raka dojke *in vitro*. Prav tako so pokazali, da inhibicija signalne kaskade FAK/p130Cas PND-1186 sproži apoptozo v celicah raka dojke (Tanjoni in sod., 2010). Ista raziskovalna skupina je ugotovila, da PND-1186 deluje protirakavo v dveh različnih mišjih modelih raka dojke (Tanjoni in sod., 2010; Walsh in sod., 2010). Poleg učinka na raka dojke so prav tako pokazali, da PND-1186 zavira rast tumorja karcinoma jajčnikov v razmerah *in vitro* ter *in vivo* (Tanjoni in sod., 2010). Muz in sodelavci so dokazali, da je monoterapija s PND-1186 zmanjšala proliferacijo in sprožila apoptozo v plazmocitomskih celicah (Muz in sod., 2019). Jiang in sodelavci so poročali, da zaviranje FAK z enkratnim odmerkom PND-1186 močno ovira napredovanje tumorja ter dvakratno poveča stopnjo preživetja mišjega modela adenokarcinoma trebušne slinavke (Jiang in sod., 2016). Učinkovitost PND-1186 je bila proučevana v treh različnih kliničnih študijah, ki so vključevale bolnike z rakom trebušne slinavke (Verastem, 2017a), refraktarno ali recidivno akutno mieloidno levkemijo (Verastem, 2016) ter metastaskimi nehematološkimi rakavimi obolenji (Verastem, 2017b). Vse klinične študije so bile ukinjene ali umaknjene brez pojasnjenih razlogov.

2.5.4.3 Defactinib

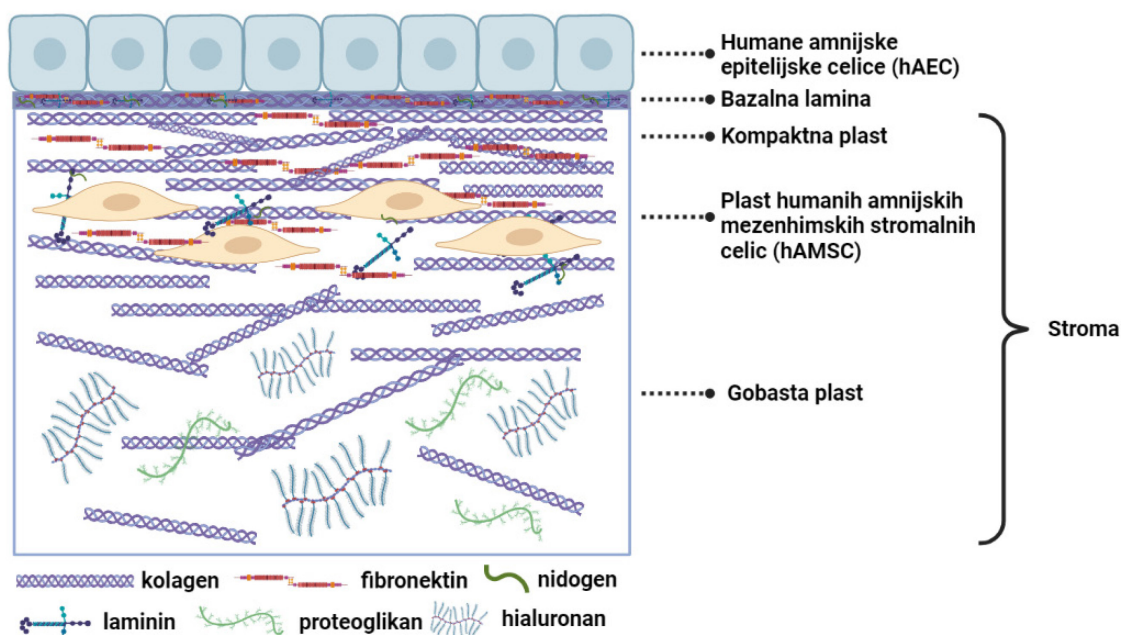
Defactinib je inhibitor druge generacije, ki zavira fosforilacijo FAK na Y397 (Wu in sod., 2021). Študija na urotelijskih celicah papiloma RT4 je pokazala, da defactinib zmanjša fosforilacijo FAK in s tem zavira tvorbo in velikost organoidov (Barlow in sod., 2017). Defactinib v kombinaciji s paklitakselom zmanjša proliferacijo in poveča apoptozo celične linije raka jajčnikov *in vitro* (Kang in sod., 2013). Študije *in vivo* so pokazale, da samostojno ali v kombinaciji z drugimi zdravilnimi učinkovinami, defactinib zavira fosforilacijo FAK v mišjih modelih raka jajčnikov (Kang in sod., 2013), raka prostate (Lin in sod., 2018) in adenokarcinoma trebušne slinavke (Le Large in sod., 2021). Samostojno ali kombinirano zdravljenje z defactinibom je tudi proučevano v kliničnih študijah prve in druge faze. Šest kliničnih študij je na dan 01.06.2022 že zaključenih (NCT01943292, NCT00787033, NCT02913716, NCT0195690, NCT01778803, NCT02546531) osem jih je v fazi rekrutacije (NCT03875820, NCT04625270, NCT03287271, NCT04720417, NCT04620330, NCT03727880, NCT04331041, NCT02465060), ena študija je aktivna (NCT04439331), štiri študije so prekinjene (NCT02004028, NCT02372227, NCT01870609, NCT02943317), ena študija je umaknjena (NCT04201145) ena študija pa je z neznanim statusom (NCT02758587). Klinična študija prve faze NCT01943292, ki je vključevala bolnike s potrjeno nehematološko maligno boleznijo, je pokazala, da je peroralna uporaba defactiniba varna,

saj pri udeležencih ni prišlo do pojave toksičnosti, ki omejuje odmerek (ang. *DLT – dose limiting efficacy*) (Shimizu in sod., 2016). Druga klinična študija prve faze NCT00787033 je pokazala, da ima defactinib sprejemljiv varnostni profil z reverzibilnimi neželenimi učinki stopnje 1 ali 2 (Jones in sod., 2015). Najpogostejši neželeni učinki, ki so se pojavili v obeh študijah, so glavobol, driska, slabost, nekonjugirana hiperbilirubinemija in utrujenost (Jones in sod., 2015; Shimizu in sod., 2016). Klinična študija druge faze NCT01951690 je pokazala, da je uporaba defactiniba varna pri bolnikih z nedrobnoceličnim pljučnim rakom z mutacijo gena *KRAS*, vendar pa je imela monoterapija z defactinibom skromno aktivnost, saj ni bistveno izboljšala kliničnega izida (Shimizu in sod., 2016). Po drugi strani je bila klinična raziskava druge faze NCT01870609 prekinjena, saj peroralna uporaba defactiniba po kemoterapiji kljub sprejemljivemu varnostnemu profilu ni vplivala niti na preživetje brez napredovanja bolezni, niti na splošno preživetja bolnikov z malignim pleuralnim mezoteliomom (Fennell in sod., 2019). Osem kliničnih študij je v fazi rekrutacije, kjer bodo ocenili protirakav učinek defactiniba pri bolnikih z različnimi tipi raka, in sicer z melanomom, rakom jajčnikov, nedobroceličnim pljučnim rakom ter rakom trebušne slinavke (Institute of Cancer Research in Verastem, 2022; Michael in sod., 2023; National Cancer, 2025; Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns in sod., 2023; Thomas Jefferson in Verastem, 2023; Verastem, 2023; Verastem in sod., 2023; Washington University School of in sod., 2025).

2.6 HUMANA AMNIJSKA MEMBRANA

2.6.1 Struktura humane amnijske membrane

Humana amnijska membrana (hAM) je ekstraembrionalna ovojnica, ki med nosečnostjo obdaja plod. Zgrajena je iz treh plasti, in sicer iz humanih amnijskih epiteljskih celic (hAEC), debele bazalne lamine in spodaj ležečega neožiljenega in neoživčenega vezivnega tkiva (stroma) (Slika 8). Slednja se nadalje deli na kompaktno plast, plast humanih amnijskih mezenhimskih stromalnih celic (hAMSC) ter gobasto plast (Cirman in sod., 2014; Jerman in sod., 2014a; Ramuta in Kreft, 2018; Ramuta Železnik in sod., 2022; Rocha in Baptista, 2015; Silini in sod., 2020). Bazalna lamina hAM je sestavljena iz tesno povezanih kolagenov tipa III, IV, VII, lamininov tipa 1 in 5, fibronektina ter nidogena. V kompaktni plasti prevladujejo fibronektin in kolageni tipa I, III, V in VI. Poleg stromalnih celic vsebuje plast hAMSC veliko kolagena tipa I, III, VI ter fibronektina, laminina-5 in nidogena. Gobasta plast je sestavljena iz kolagenov tipa I, III, IV, hialuronana in proteoglikanov (Niknejad in sod., 2008; Ramuta in sod., 2022).



Slika 8. Shematski prikaz zgradbe humane amnijske membrane (hAM). hAM gradijo humane amnijske epiteljske celice (hAEC), bazalna lamina in stroma. Stroma je razdeljena na kompaktno plast, plast humanih amnijskih mezenhimskih stromalnih celic (hAMSC) in gobasto plast. Slika je izrisana s spletnim orodjem BioRender.

Kljub enotni strukturi hAM razdelimo na tri anatomske regije: humano placentarno amnijsko membrano (hPAM), humano reflektirano amnijsko membrano (hRAM) in humano amnijsko membrano popkovnice (hUC-AM) (Centurione in sod., 2018; Weidinger in sod., 2020). *In utero* je hPAM obrnjena proti fetalni strani placente (fronozni horij), hRAM obroblja steno maternice (gladki horij), medtem ko hUC-AM prekriva popkovnico (Weidinger in sod., 2020). Več različnih študij je pokazalo, da se

lastnosti celic in medceličnine razlikujejo med različnimi amnijskimi regijami (Banerjee in sod., 2018; Banerjee in sod., 2015; Centurione in sod., 2018; Han in sod., 2008; Kim in sod., 2011).

2.6.2 Uporaba humane amnijske membrane v terapevtske namene

Študije so potrdile, da hAM pospešuje celjenje ran (Alcaraz in sod., 2015; Cirman in sod., 2014; ElHeneidy in sod., 2016; Jerman in sod., 2014a), zavira brazgotinjenje tkiva (Eskandarlou in sod., 2016; Insausti in sod., 2010; Mohammadi in sod., 2017) ter deluje imunomodulatorno (Insausti in sod., 2014; Magatti in sod., 2018), protivnetno (Navas in sod., 2018; Shimmura in sod., 2001) in protimikrobno (Ramuta in sod., 2020b; Šket in sod., 2019). Poleg vsega naštetega ima hAM nizko imunogenost (Kubo in sod., 2001) in je vir rastnih faktorjev (Bischoff in sod., 2017; Stachon in sod., 2015) ter matičnih celic (Kim in sod., 2014; Miki in sod., 2005). Raziskovalci so v svojih raziskavah uporabili različne pripravke iz hAM, kot so nosilci (Dragúňová in sod., 2019; Jerman in sod., 2014a; Mahmoudi-Rad in sod., 2013), kondicionirano gojišče (Niknejad in sod., 2014; Pan in sod., 2019; Riedel in sod., 2019), homogenat (Ramuta in sod., 2020b; Šket in sod., 2019; Wu in sod., 2017), izvleček (Mamede in sod., 2016; Mamede in sod., 2014; Shayan Asl in sod., 2019) ter koščki (Banerjee in sod., 2015; Bernabé-García in sod., 2017; Ramuta in sod., 2020b) ali celice, izolirane iz hAM (Bu in sod., 2017; Jiao in sod., 2012; Magatti in sod., 2012). Zaradi dostopnosti in njenih bioloških lastnosti se danes hAM večinoma uporablja na področju oftalmologije, in sicer za zdravljenje očesnih površinskih ran, razjed roženice, neoplazije, glavkoma, pomanjkanja limbalnih matičnih celic ali pri okuloplastičnih posegih (Cirman in sod., 2014; Lo in sod., 2010; Lo in Pope, 2009; Mamede in sod., 2012). Uporaba hAM je prisotna tudi na področju dermatologije, saj se pogostokrat uporablja za celjenje ran pri bolnikih z akutnimi in kroničnimi ranami, opeklinami ali diabetičnimi razjedami spodnjih okončin (Lo in sod., 2010; Lo in Pope, 2009; Mermet in sod., 2007; Mohammadi in sod., 2017; Mohammadi in sod., 2013).

2.6.2.1 Protirakavo delovanje humane amnijske membrane (prikaz dosedanjih raziskav)

Število študij, ki poročajo o protirakavem delovanju hAM na modelih *in vitro* ter *in vivo* z leti narašča (Preglednica 2). Kljub naraščajočim številom raziskav, ki dokazujejo protirakave lastnosti hAM, vpliv hAM na rakave urotelijske celice v veliki meri temelji le na nekaj študijah. Mamede in sodelavci so ugotovili, da proteinski izvleček iz hAM s koncentracijo proteinov 1 µg/ml zavira 25–50 % metabolne aktivnosti rakavih celic sečnega mehurja HT-1376. Metabolno aktivnost rakavih celic so kvantificirali s kolorimetričnim testom MTT po 72-urnem tretiranju (Mamede in sod., 2014). Rezultati naše raziskovalne skupine so pokazali, da tako celice hAEC in hAMSC kot tudi nosilci iz hAM zavirajo proliferacijo mišično invazivnih rakavih urotelijskih celic T24. Poleg vpliva na proliferacijo, so nosilci iz hAM tudi zmanjšali invazivni potencial in izražanje

mezenhimskih označevalcev (Snail, Slug, N-kadherin). Za posamezne celice T24 je bil značilen mezenhimsko-epitelijski prehod in začele so izražati epitelijske označevalce, in sicer E-kadherin in okludin (Ramuta in sod., 2020a). Naša raziskovalna skupina je tudi prva pripravila in analizirala učinek homogenata hAM na mišično invazivne rakave urotelijske celice T24. Ugotovili smo, da homogenat hAM zmanjša proliferacijo in pritrjevanje ter povzroči luščenje mišično invazivnih urotelijskih celic T24 (Janev in sod., 2021; Ramuta, 2020). Za učinkovito zdravljenje raka sečnega mehurja je poleg protirakavega učinka pomembno tudi, da zdravilo oz. zdravilna učinkovina ne deluje toksično na zdrave celice. Objavljeni rezultati naše raziskovalne skupine na modelih *ex vivo* ter *in vitro*, ki posnemajo urotelijo, kažejo, da nosilci hAM pospešujejo diferenciacijo in regeneracijo normalnih urotelijskih celic sečnega mehurja (Jerman in sod., 2014a). Vsi dosednji rezultati nakazujejo na možnost uporabe hAM za boj proti raku sečnega mehurja.

Janev A. Vpliv pripravkov iz humane amnijske membrane na ... normalnih in rakavih urotelijskih celic.
Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2022.

Preglednica 2. Kronološki pregled *in vitro* ter *in vivo* študij, ki opisujejo spekter različnih protirakavih učinkov hAM. Z rdečim in krepkim tiskom so označene študije na celičnih linijah raka sečnega mehurja.

| Pripravek hAM | Celične linije / živalski model | Zasnova študije | Učinek | Referenca |
|--|---|--|---|------------------------------|
| | | <i>In vitro študije</i> | | |
| hAEC | Celična linija raka dojke (MDA-MB-21). | Gojenje rakavih celic v kokulturi s celicami hAEC. | Zmanjšana viabilnost. | Kang in sod., 2012. |
| hAMSC | Celična linija histiocitnega limfoma (U937); raka materničnega vratu (HeLa); osteosarkoma (Saos-2); akutne T-celične levkemije (Jurkat). | Gojenje rakavih celic v kokulturi s celicami hAMSC. | Zmanjšana proliferacija. Zaustavitev celičnega cikla v fazi G ₀ /G ₁ . Povečano izražanje zaviralcev celičnega cikla (inhibitorja od ciklinov odvisnih kinaz p15 in p21). Zmanjšano izražanje spodbujevalcev celičnega cikla (ciklini D2/E1/H ter od ciklinov odvisnih kinaz 2/4/6). | Magatti in sod., 2012. |
| Kondicionirano gojišče iz hAEC ali koščkov hAM | Celična linija raka materničnega vratu (HeLa) in raka dojke (MDA-MB-231). | Gojenje rakavih celic v prisotnosti kondicioniranega gojišča, v katerem so gojene bodisi celice hAEC bodisi intaktni koščki hAM. | Sprožena apoptoza (povečano izražanje kaspaz 3 in 8). Zmanjšana proliferacija, migracija in preživetje. Inhibirana angiogeneza. | Niknejad in sod., 2014. |
| Izvleček hAM | Celična linija raka prostate (PC3); raka jeter (HepG2, HuH7, Hep3B2.1-7); raka črevesja (WiDr); raka trebušne slinavke (PANC-1 in MIA PaCa-2); raka sečnega mehurja (HT-1376) , raka pljuč (H1299), raka materničnega vratu (ECC-1); raka dojke (HCC1806); raka požiralnika (OE19) osteosarkoma (MNNG/HOS); melanoma (A375). | Gojenje rakavih celic v prisotnosti izvlečka hAM. | Zmanjšana metabolna aktivnost. | Mamede in sod., 2014. |
| Kondicionirano gojišče iz hAMSC | Celični liniji raka prostate (PC-3 in LNCaP). | Gojenje rakavih celic v prisotnosti kondicioniranega gojišča, v katerem so gojene celice hAMSC. | Zmanjšana proliferacija. Zaustavitev celičnega cikla v fazi G1/S. | Rolfo in sod., 2014. |

se nadaljuje

Janev A. Vpliv pripravkov iz humane amnijske membrane na ... normalnih in rakavih urotelijskih celic.
Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2022.

Nadaljevanje Preglednice 2

| Pripravek hAM | Celične linije / živalski model | Zasnova študije | Učinek | Referenca |
|-------------------------------------|---|--|---|-------------------------------|
| Izvleček hAM | Celična linija raka jeter (HuH7, HepG2 in Hep3B2.1-7). | Gojenje rakavih celic v prisotnosti izvlečka hAM. | Zmanjšana metabolna aktivnost v vseh rakavih celičnih linijah. Izzvana celična smrt v vseh rakavih linijah (povečano razmerje Bax/Bcl-2, izražanje prokaspaze 3, aktivacija intrinzične apoptotske poti v HuH7 in ekstrinzične apoptotske poti v HepG2 in Hep3B2.1-7). | Mamede in sod., 2015. |
| Izvleček hAM | Celična linija raka jeter (HuH7, HepG2 in Hep3B2.1-7). | Gojenje rakavih celic v prisotnosti izvlečka hAM. | Zaustavitev celičnega cikla v fazi G2/M v celicah HuH7 in HepG2. Zmanjšano izražanje glutationa in beta katenina v vseh celičnih linijah ter p53 v celicah HuH7 in HePG2. | Mamede in sod., 2016. |
| Kondicionirano gojišče iz hAM | Celična linija raka materničnega vratu (HeLa) in raka dojke (MDA-MB-231). | Gojenje rakavih celic v prisotnosti kondicioniranega gojišča, v katerem so gojeni koščki krioshranjene hAM. | Povečana fragmentacija DNA v celicah HepG2. Zmanjšana viabilnost rakavih celic. | Modaresifar in sod., 2017. |
| hAEC kondicionirano gojišče iz hAEC | in Celični liniji raka jajčnikov (SK-OV-3 in A2780) | Gojene rakavih celic v kokulturi s hAEC ali v prisotnosti kondicioniranega gojišča, v katerem so gojene celice hAEC. | Zmanjšana proliferacija. Zaustavitev celičnega cikla v fazi G ₀ /G ₁ , kot posledica prekomernega izražanja TGFβ1, ki ga izločajo hAEC. | Bu in sod., 2017. |
| Kondicionirano gojišče iz hAM | Celični liniji raka jeter (HuH7 in HepG2). | Gojenje rakavih celic v prisotnosti kondicioniranega gojišča, v katerem so gojeni koščki hAM. | Zmanjšana proliferacija in Zaustavitev celičnega cikla v fazi G2/M. Zmanjšano izražanje ciklina D1, Ki-67, miR-15a in miR-210. | Riedel in sod., 2019. |
| Nosilci hAM hAEC hAMSC | Celična linija raka sečnega mehurja (T24). | Gojenje rakavih celic v kokulturi s celicami hAEC ali hAMSC. Nasaditev rakavih celic na različne nosilce iz hAM. | Povečano izražanje p53, p51, miR-145 in miR-206. Zmanjšana proliferacija. Zmanjšano izražanje mezenhimskih označevalcev (N-kadherin, Snail in Slug). Povečano izražanje epitelijskih označevalcev (E-kadherin, okcludin). | Ramuta in sod., 2020a. |

se nadaljuje

Janev A. Vpliv pripravkov iz humane amnijske membrane na ... normalnih in rakavih urotelijskih celic.
Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2022.

Nadaljevanje Preglednice 2

| Pripravek hAM | Celične linije / živalski model | Zasnovna študije | Učinek | Referenca |
|-------------------------------|---|---|---|-----------------------|
| Kondicionirano gojišče iz hAM | Celične linije raka dojke (MCF7a, MDA-MB-231 in BT-474). | Gojenje rakavih celic v prisotnosti kondicioniranega gojišča, v katerem so gojeni koščki hAM. | Zmanjšana proliferacija. Zaustavitev celičnega cikla v fazi G2/M v MDA-MB-231. | Jafari in sod., 2021. |
| | | | Povečana apoptoza v MDA-MB-231. | |
| | | | Zmanjšana migracija in invazija v MDA-MB-231. | |
| | | | Zmanjšana zmožnost tvorbe kolonij MCF7a. | |
| | | | Zmanjšana zmožnost tvorbe sferoidov MCF7a in MDA-MB-231. | |
| <i>In vivo študije</i> | | | | |
| hAMSC | Mišji model glioma (podkožno vbrizganje rakavih celic C6 v samce BALB/c) | Vbrizganje enkratnega ali večkratnega odmerka hAMSC v isto območje kot rakave celice C6. | Sprožena apoptoza. Povečano izražanje proapoptoskega proteina Bax ter kaspaz 3 in 8. | Jiao in sod., 2012. |
| hAEC | Mišji model raka dojke (podkožno vbrizganje rakavih celic MDA-MB-231 v samice BALB/c) | Vbrizganje hAEC v območje tumorja. | Zmanjšano izražanje antiapoptoskega proteina Bcl-2. | |
| Izvlček hAM | Mišji model raka jeter (subkutano vbrizganje rakavih celic HuH7 ali HepG2 v samce BALB/c) | Intraperitonealna injekcija z izvlečkom hAM na vsakih 2 dni za 12 dni. | Zmanjšan volumen tumorja. | Kang in sod., 2012. |
| hAEC | Mišji model raka jajčnikov (podkožno vbrizganje rakavih celic SK-OV-3 ali SK-OV-3/hAEC v samice BALB/c) | Subkutano vbrizganje rakavih celic SK-OV-3 v kombinaciji s hAEC. | Podaljšano preživetje miši. Ohranjena normalna struktura dojke. Zmanjšan volumen tumorja. | Mamede in sod., 2015. |
| hAEC | Vsaditev razvitega tumorja v endometriji podgan. Tumor je bil pridobljen s podkožnim vbrizganjem rakavih celic HEC-1b v samice RNU. | Vbrizganje hAEC v repno veno podgane. | Zmanjšan volumen tumorja. Povečano izražanje zaviralcev celičnega cikla (p16 ^{INK4A} , p21, fosfo-JNK). Zmanjšano izražanje spodbujevalcev celičnega cikla (fosfo-pRB). | Bu in sod., 2017. |
| | | | Zmanjšana abnormalna hiperplazija tumorskih žil. Zmanjšana hipoksija v tumorju endometriji. Zmanjšan volumen tumorja in proliferacija kot posledica sinergističnega delovanja hAEC in cisplatina. | Guan Zhang, 2019. |

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabljali pri eksperimentalnem delu doktorske disertacije, je navedena v Preglednici 3.

Preglednica 3. Seznam laboratorijske opreme, ki smo jo uporabili v doktorskem delu.

| Laboratorijska oprema | Proizvajalec |
|---|----------------------------------|
| Aparatura za napraševanje kovin Bal-Tec SCD 005 | Balzers, ZDA |
| Aparatura za elektforezo XCell SureLock® Mini-Cell | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Aparatura za prenos proteinov XCell II Blot Module | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Avtoklav A-21 CA | Kambič, Slovenija |
| Avtomatske pipete Eppendorf | Eppendorf, Nemčija |
| Celični CO₂-inkubator HeraCell 150 | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Celični CO₂-inkubator Heracell Vios 160i | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Centrifuga 5810R | Eppendorf, Nemčija |
| Centrifuga CO336R | Labnet International, ZDA |
| Ciklični pomnoževalec Veriti | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Fluorescenčni mikroskop AxioImager.Z1 z dodatkom Apotome | Zeiss, Nemčija |
| Fluorimeter Qubit 4.0 | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Grelnik za gojišča Heraeus | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Hladilnik | Gorenje, Slovenija |
| Hladilnik | Bosch, Nemčija |
| Homogenizator Polytron PT3100 D | Kinematica, Switzerland |
| Homogenizator Russell Hobbs 21350-56 | Russell Hobbs, Zdr |
| Invertni fazno-kontrastni mikroskop Eclipse E300 | Nikon, Japonska |
| Inkubator | Memmert, Nemčija |
| IBright 1500 | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Konfokalni mikroskop LSM 900 | Zeiss, Nemčija |
| MIC qPCR | Biomolecular systems, Avstralija |
| Mikrovalovna pečica | Gorenje Slovenija |
| MikroCam PRO HDMI 5MP | Rhede, Nemčija |
| Mini centrifuga | Benchmark Scientific, ZDA |
| Namizna centrifuga 5810R | Eppendorf, Nemčija |
| Napajalnik PowerEase | Thermo Fisher Scientific, ZDA |

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 3

| Laboratorijska oprema | Proizvajalec |
|---|-------------------------------|
| Naprava za slikanje membran prenosa Western LAS-4000 | Fujifilm, Japonska |
| pH meter FiveEasy plus FP20 | Mettler Toledo, ZDA |
| Presevni elektronski mikroskop CM100 | Philips, Nizozemska |
| ScanMaker 8700 | Microtek, Tajvan |
| Spektrofotometer Nanodrop 1000 | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Spektrofotometer Sapphire | Tecan, Švica |
| Stereomikroskop SMZ800N | Nikon, Japonska |
| Sušilnik SP-45c | Kambič, Slovenija |
| Svetlobni mikroskop Leica DM IL | Leica, Nemčija |
| Tehtnica ET 1111 | Tehtnica, Jugoslavija |
| Tehtnica AE163 | Mettler Toledo, ZDA |
| Tekoči dušik TR26 | Cortex Technology, Danska |
| Vodna kopel | Salvislab, Švica |
| Vrstični elektronski mikroskop Vega 3 | Tescan, Češka |
| Vrtinčni stresalnik KS 260 basic | Ika, Nemčija |
| Zamrzovalna skrinja MDFU500VX-PE | Panasonic, Japonska |
| 4-prekatni inserti IBIDI μ-Dish 35 mm | Ibidi, Nemčija |

3.1.2 Reagenti in kemikalije

Reagenti in kemikalije, ki smo jih uporabljali v doktorskem delu so navedeni v Preglednici 4.

Preglednica 4. Seznam uporabljenih reagentov in kemikalij.

| Reagenti in kemikalije | Proizvajalec |
|--------------------------------|-------------------------------|
| Aceton | Carlo Erba Reagents, Francija |
| Adenin | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Akrilamid-bisakrilamid | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Amonijev persulfat | Serva, Nemčija |
| Barvilo Coomassie modro | Biorad, Madžarska |
| Barvilo bromfenol modro | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Barvilo Giemsa | Merck, ZDA |
| Barvilo Hoechst | Sigma-Aldrich, ZDA |
| CaCl₂ | UKC Ljubljana, Slovenija |
| Citronska kislina | Merck, Nemčija |
| Defactinib | Selleckchem, ZDA |
| DTT | Sigma-Aldrich, ZDA |

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 4

| Reagenti in kemikalije | Proizvajalec |
|--|-------------------------------|
| Izvleček goveje hipofize | Lonza, Švica |
| Epidermalni rastni faktor | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Epon | Serva, Nemčija |
| Etanol (100 %) | KEFO, Slovenija |
| FBS | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Formaldehid | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Fosfoetanolamin | Sigma-Aldrich, ZDA |
| GA-1000 | Lonza, Švica |
| Glutamax | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Glutaraldehid | Serva, Nemčija |
| Glicin | Sigma-Aldrich, ZDA |
| HCL | Carlo Erba, Nemčija |
| Heksametildisilazan | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Hidrokortizon | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Hidrokortizon | Lonza, Švica |
| Gojišče A-DMEM | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Gojišče F12 | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Gojišče MCDB153 | Sigma, Nemčija |
| Gojišče MEBM CC-3151 | Lonza, Švica |
| HS | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Inzulin | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Inzulin | Lonza, Švica |
| KCl | Merck, Nemčija |
| KH₂PO₄ | Merck, Nemčija |
| Koktejl proteaznih in fosfataznih inhibitorjev | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Komplet reagentov BCA protein assay kit | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Komplet reagentov Click-iT® Plus Alexa Fluor® | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Picolyl Azide Toolkit | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Komplet reagentov ELISA za TIMP-2 | R&D systems, ZDA |
| Komplet reagentov za reverzno transkripcijo A3500 | Promega, ZDA |
| Ksilol | Carlo Erba Reagents, Francija |
| Metaloproteinaza-2 | Abcam, Velika Britanija |
| Metanol | J.T. Baker, ZDA |
| NaCl | Merck, Nemčija |

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 4

| Reagenti in kemikalije | Proizvajalec |
|----------------------------------|-------------------------------|
| Natrijev citrat | Merck, Nemčija |
| Natrijev dodecilsulfat | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Natrijev kakodilat | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Na ₂ HPO ₄ | Merck, Nemčija |
| NaOH | Merck, Nemčija |
| Nitrocelulozna membrana | Amersham, Velika Britanija |
| Ocetna kislina | Merck, Nemčija |
| Osmijev tetroksid | Serva, Nemčija |
| PenStrep | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| PBS | Lonza, Švica |
| PF-573228 | Selleckchem, ZDA |
| PND-1186 | Selleckchem, ZDA |
| Posneto mleko v prahu | Pokmurske mlekarne, Slovenija |
| Pufer RIPA 10x | Millipore, ZDA |
| Saharoza | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Svinčev nitrat | Merck, ZDA |
| TEMED | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Toluidinsko modrilo | Merck, Nemčija |
| Tripansko modrilo | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Tripsin-EDTA | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Triton X-100 | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Trizma baza | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Tryple Select | Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| Tween® 20 | Sigma-Aldrich, ZDA |
| Uranil acetat | Merck, Nemčija |
| Vectashield | Vector Laboratories, ZDA |
| Vklopni medij Entellan new | Merck, Nemčija |
| Vodikov peroksid | Carlo Erba Reagents, Francija |

3.1.3 Rastopine in pufri

V preglednici 5 so navedeni pufri in rastopine, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu doktorske disertacije.

Preglednica 5. Raztopine in pufri, ki smo jih uporabljali pri praktičnem delu.

| Raztopine in pufri | Sestava | Količina |
|--|---|----------|
| Fiksativ za vzorce za svetlobno mikroskopijo (4 % FA v PBS) | Formaldehid | 4 g |
| | PBS | 100 ml |
| | Uravnamo pH na 7,2 – 7,4. | |
| PBS (20 x) | KH ₂ PO ₄ | 4 g |
| | KCL | 4 g |
| | Na ₂ HPO ₄ | 23 g |
| | NaCl | 160 g |
| Dopolnimo z dH ₂ O do 1 L in uravnamo pH na 7,2 – 7,4. | | |
| PBS | Zamešamo 1 del PBS (10 x) in 19 delov dH ₂ O. | |
| TBS (10 x) | Trizma baza | 24 g |
| | NaCl | 88 g |
| | Dopolnimo z dH ₂ O do 1 L in uravnamo pH na 7,6. | |
| Tris HCL (1,5 M pH 8,8) | Trizma baza | 18,21 g |
| | dH ₂ O | 100 ml |
| | Uravnamo pH na 8,8 s HCL. | |
| Tris HCL (1,25 M pH 6,8) | Trizma baza | 15,18 g |
| | dH ₂ O | 100 ml |
| | Uravnamo pH na 6,8 s HCL. | |
| Tris HCL (0,5 M pH 7,8) | Trizma baza | 6,07 g |
| | dH ₂ O | 100 ml |
| | Uravnamo pH na 7,8 s HCL. | |
| Raztopine in pufri uporabljeni pri analizi proliferacije | | |
| Reakcijska mešanica Click-It Plus | Click-It reakcijski pufer | 435 µl |
| | AlexaFluor pikolil azid (5 mM) | 5 µl |
| | CuSO ₄ | 9 µl |
| | Zaščitno sredstvo za baker | 1 µl |
| | Click-It puferski dodatek | 50 µl |
| Spiralni pufer 3 % BSA v PBS | BSA | 3 g |
| | Dopolnimo do 50 ml s PBS. | |
| Raztopina za permeabilizacijo | Triton X-100 | 0,5 ml |
| | PBS | 99,5 ml |

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 5

| Raztopine in pufri | Sestava | Količina |
|--|--|-----------------|
| Raztopine in pufri uporabljeni pri testu invazivnosti | | |
| Barvanje s Hoechst-om (100 µg/ml) | Hoechst (1 mg/ml) | 10 µl |
| | dH ₂ O | 990 µl |
| Gojišče ADMEM + F12 brez seruma | Advanced DMEM | 49 ml |
| | F12 (HAM) | 49 ml |
| | Glutamax | 2 ml |
| Kemoatraktant | Gojišče ADMEM + F12 brez seruma | 18 ml |
| | FBS | 2 ml |
| Raztopina Matrigela (500 µg/ml) | Matrigel (8,9 mg/ml) | 85 µl |
| | dH ₂ O | 1415 µl |
| Raztopine in pufri uporabljeni pri določanju koncentracije celokupnih proteinov | | |
| Reakcijska mešanica za določanje celokupne koncentracije proteinov | Reagent A | 1 del |
| | Reagent B | 49 delov |
| Raztopine in pufri uporabljeni pri prenosu Western | | |
| Blokirni pufer | Posneto mleko v prahu | 2,5 g |
| | Dopolnimo do 50 ml s TBS-T | |
| Raztopine in pufri | Sestava | Količina |
| Lizirni pufer RIPA | 10 × RIPA pufer | 1 del |
| | dH ₂ O | 9 delov |
| Premešamo in shranimo v hladilniku 2 uri pred uporabo. | | |
| Nanašalni pufer | DTT | 30 mg |
| | dH ₂ O | 200 µl |
| Dodamo 800 µl SDS pufra (4 ×). | | |
| Pufer za elektroforezo (10 x) | Trizma baza | 29 g |
| | Glicin | 144 g |
| | Natrijev dodecilsulfat | 10 g |
| Dopolnimo z dH ₂ O do 1 L in uravnamo pH na 8,3. | | |
| Pufer za elektroforezo | Pufer za elektroforezo (10 ×) | 80 ml |
| | Dopolnimo z dH ₂ O do 800 ml. | |

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 5

| Raztopine in pufri | Sestava | Količina |
|--|---|-----------------|
| Raztopine in pufri uporabljeni pri prenosu Western | | |
| Pufer za prenos proteinov na nitrocelulozno membrano | dH ₂ O | 380 ml |
| | Pufer za prenos (25 ×) | 20 ml |
| | Metanol | 100 ml |
| Pufer za redčenje primarnih in sekundarnih protiteles (5 % BSA v TBS-T) | BSA | 2,5 g |
| | Dopolnimo do 50 ml s TBS-T. | |
| SDS pufer (4 x) | Natrijev dodecilsulfat | 2 g |
| | TRIS HCL 1,5 M pH 8,8 | 6,25 ml |
| | Glicerol | 2 ml |
| | Bromfenol modro | 0,008 g |
| | Dopolnimo do 20 ml z dH ₂ O. | |
| Izpiralni pufer TBS-T | 10 × TBS | 100 ml |
| | Tween® 20 | 1 ml |
| | Dopolnimo z dH ₂ O do 1L. | |
| Raztopine in pufri uporabljeni za analizo mRNA z metodo verižne reakcije v realnem času | | |
| Raztopine in pufri | Sestava | Količina |
| Izpiralni pufer | 100 % etanol | 96 ml |
| | Koncentrat izpiralnega pufra za RNA #R150 | 24 ml |
| Lizirni pufer | RNA Lysis buffer #R1060-1-50 | 50 ml |
| Pufer za prečiščevanje RNA | RNA Prep buffer #R1060-2-25 | 25 ml |
| Pufer z DNAzo I | DNAza I | 5 µl |
| | Pufer za prebavljanje DNA | 35 µl |
| Reakcijska mešanica za določanje koncentracije RNA | Reagent A (Qubit™ RNA BR Reagent) | 1 del |
| | Pufer B (Qubit™ RNA BR Buffer) | 199 delov |
| | | |

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 5

| Raztopine in pufri | Sestava | Količina |
|--|--|-------------|
| Raztopine in pufri uporabljeni pri želatinski cimografiji | | |
| 20 % SDS | Natrijev dodecilsulfat | 1 g |
| | Dopolnimo do 5 ml z dH ₂ O. | |
| Pufer za barvanje gelov | Coomassie blue | |
| | Coomassie Brilliant Blue R-250 | 2,5 g |
| | Metanol | 25 ml |
| | Ocetna kislina | 50 ml |
| | Dopolnimo z dH ₂ O do 500 ml in filtriramo pred uporabo. | |
| | Pufer za elektroforezo (10 ×) za želatinsko cimografijo | Trizma baza |
| Glicin | | 72,07 g |
| Dopolnimo z dH ₂ O do 500 ml in uravnamo pH na 8,3. | | |
| Pufer za elektroforezo – želatinska cimografija | Pufer za elektroforezo (10 ×) za želatinsko cimografijo | 70 ml |
| | 20 % SDS | 3,5 ml |
| | Dopolnimo do 700 ml z dH ₂ O. | |
| | Pufer za razbarvanje gelov | Etanol |
| Ocetna kislina | | 50 ml |
| Dopolnimo z dH ₂ O do 500 ml. | | |
| Razvijalni pufer (10 ×) | Tris-HCL (0,5 M; pH 7,8) | 60 g |
| | NaCl | 117 g |
| | CaCl ₂ | 5,55 g |
| | Triton X-100 | 2 ml |
| | dH ₂ O | 998 ml |
| | Premešamo in uravnamo pH na 7,8. | |
| Razvijalni pufer | Zamešamo 1 del razvijalnega pufra (10 ×) in 9 delov dH ₂ O. | |
| Renaturacijski pufer | Triton X-100 | 7,5 ml |
| | Dopolnimo do 300 ml z dH ₂ O. | |

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 5

| Raztopine in pufri | Sestava | Količina |
|---|--|----------|
| Raztopine in pufri uporabljeni pri metodi ELISA | | |
| Pufer za blokiranje nevezanih lovilnih protiteles in redčenje standardov, vzorcev, detekcijskih protiteles ter s HRP-konjugiranim streptavidinom (1 % BSA v PBS) | BSA | 1 g |
| | Dopolnimo z 1 × PBS do 50 ml in uravnamo pH na 7,2 – 7,4. | |
| Pufer za spiranje mikrotitrskе ploščice | Tween® 20 | 0,1 ml |
| | Dopolnimo z 1 × PBS do 1L in uravnamo pH na 7,2 – 7,4. | |
| Raztopina substrata | Zamešamo en del barvnega reagenta A (H ₂ O ₂) in en del barvnega reagenta B (tetrametilbenzidin) (R&D Systems, #DY999) ter uporabimo v roku 15 minut. | |
| Ustavitvena raztopina (ustavi reakcijo med hrenovoperoksidazo in raztopino substrata) | Dodamo že pripravljeno 2N H ₂ SO ₄ (R&D Systems, #DY994). | |
| Raztopine in pufri uporabljeni pri pripravi preparatov za elektronsko mikroskopijo | | |
| Aceton:HMDS 1:1 | Zamešamo en del 100 % acetona in en del HMDS. | |
| 90 % etanol | Zamešamo devet delov 100 % etanola in en del dH ₂ O. | |
| 70 % etanol | Zamešamo sedem delov 100 % etanola in tri dele dH ₂ O. | |
| 50 % etanol | Zamešamo pet delov 100 % etanola in pet delov dH ₂ O. | |
| 0,1 M kakodilatni pufer | Dodamo 1 del 0,2 M kakodilatnega pufera in 1 del dH ₂ O. | |
| 0,2 M kakodilatni pufer | Raztopina natrijevega kakodilata | 62,5 ml |
| | HCL (0,2 M) | 3,37 ml |
| | Dopolnimo z dH ₂ O do 250 ml in uravnamo pH na 7,2 – 7,4. | |
| 0,33 M saharoza v 0,1 M kakodilatnem pufru | Saharoza | 11,3 g |
| | 0,2 M kakodilatni pufer | 50 ml |
| | dH ₂ O | 50 ml |
| Fiksativ za vzorce za presevno elektronsko mikroskopijo (3 % FA, 3 % GA v 0,1 M kakodilatnem pufru) | Formaldehid | 3 g |
| | dH ₂ O | 50 ml |
| | 0,1 M Kakodilatni pufer | 50 ml |
| | Glutaraldehid | 12 ml |
| | Uravnamo pH na 7,2 – 7,4. | |

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 5

| Raztopine in pufri | Sestava | Količina |
|--|---------------------------|-----------|
| Raztopine in pufri uporabljeni pri pripravi preparatov za elektronsko mikroskopijo | | |
| Fiksativ za vzorce za vrstično elektronsko mikroskopijo (2 % FA, 2 % GA v 0,2 M kakodilatnem pufri) | Formaldehid | 2 g |
| | dH ₂ O | 50 ml |
| | 0,2 M Kakodilatni pufer | 50 ml |
| | Glutaraldehid | 8 ml |
| | Uravnomo pH na 7,2 – 7,4. | |
| Raztopina natrijevega kakodilata | Natrijev kakodilat | 4,28 g |
| | dH ₂ O | 100 ml |
| 1 % raztopina osmijevega tetrosida v 0,1 M kakodilatnem pufri | OsO ₄ | 1 tableta |
| | dH ₂ O | 50 ml |
| | 0,2 M kakodilatni pufer | 50 ml |
| 2 % osmijev tetraoksid | OsO ₄ | 1 tableta |
| | dH ₂ O | 50 ml |
| 2 % raztopina uranil acetata | Uranil acetat | 2 g |
| | dH ₂ O | 100 ml |
| 10 % raztopina svinčevega citrata | Natrijev citrat | 3,52 g |
| | Svinčev nitrat | 2,66 g |
| | dH ₂ O | 60 ml |
| | 1N NaOH | 16 ml |

3.1.4 Celične kulture in gojišča

Vse celične kulture smo gojili v CO₂-inkubatorju s konstantno temperaturo 37 °C in 5 % CO₂. Celične kulture so bile redno testirane na prisotnost mikoplazem.

3.1.4.1 Trajne celične linije rakavih celic

V poskusih smo uporabili celice trajne celične linije T24, ki izvirajo iz visoko malignega karcinoma humanega urotelija (ATTC, HTB-4) in celic trajne celične linije RT4, ki izvirajo iz humanega urotelijskega papiloma sečnega mehurja (ATCC, HTB-2). V poskusih smo uporabili tudi celice trajne celične linije MCF7, ki izvirajo iz humanega adenokarcinoma dojke (ATCC, HTB-22). Pri proučevanju celične migracije smo uporabili *in vitro* modele celic trajne celične linije T24 z ojačanim zeleno fluorescirajočim proteinom (eGFP), ki je vezan na aktin. Celična linija T24-eGFP je bila pripravljena na Oddelku za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana. Rakave celice smo nasajali z nasaditveno gostoto 5×10^4 celic/cm² in jih gojili v gojišču, katerega sestava je prikazana v Preglednici 6. Za izvedbo poskusov smo uporabili rakave celice T24, T24-eGFP, RT4 in MCF7 od 5. do 30. pasaže.

Preglednica 6. Sestava gojišča (ADMEM + F12), prilagojena za gojenje rakavih celic.

| Sestavine gojišča | Proizvajalec, kataloška številka | Volumen, potreben za pripravo 100 ml gojišča |
|-------------------|-------------------------------------|---|
| Advanced DMEM | Gibco, 12491023 | 46,5 ml |
| F12 (HAM) | Gibco, 21765029 | 46,5 ml |
| Glutamax | Gibco, 35050038 | 2 ml (končna koncentracija 4 mM) |
| FBS | Gibco, 10500064 | 5 ml |

3.1.4.2 Normalne prašičje urotelijske celice

V poskusih smo uporabili normalne prašičje urotelijske celice (NPU), ki so bile izolirane iz normalnih sečnih mehurjev prašičev po že opisanem postopku (Jerman in sod., 2014b). Na kratko, sečne mehurje prašičev smo razrezali na majhne kose, iz urotelija postrgali celice, ter jih nato filtrirali skozi 40 µm filter. NPU smo nasajali z nasaditveno gostoto 1×10^5 celic/cm² in jih gojili en teden v gojišču UroM (- Ca²⁺ + S), ki spodbuja proliferacijo normalnih celic. Nato smo jih gojili še 3 tedne v gojišču UroM (+ Ca²⁺ - S), ki omogoča njihovo dokončno diferenciacijo. V preglednicah 7 in 8 je prikazana sestava obeh gojišč UroM. Za izvedbo poskusov smo uporabili celice NPU od 3. do 10. pasaže.

Uporabo sečnih mehurjev prašičev za pripravo primarnih urotelijskih celic je odobrilo Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano skupaj z Upravo za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (številka odločbe U34453-15/2013/2).

Preglednica 7. Sestava gojišča UroM (- Ca²⁺ + S), ki spodbuja proliferacijo normalnih prašičjih celic.

| Sestavine gojišča | Proizvajalec, kataloška številka | Volumen, potreben za pripravo 100 ml gojišča |
|-------------------|-------------------------------------|---|
| Advanced DMEM | Gibco, 12491023 | 48,5 ml |
| MCDB 153 | Sigma, M7403 | 48,5 ml |
| Adenin | Sigma, A2786 | 60 µl (končna koncentracija 15 µg/ml) |
| Hidrokortizon | Sigma, H0888 | 100 µl (končna koncentracija 0,5 µg/ml) |
| Fosfoetanolamin | Sigma, P0503 | 140 µl (končna koncentracija 0,1 mM) |
| Inzulin | Sigma, I1882 | 50 µl (končna koncentracija 5 µg/ml) |
| Glutamax | Gibco, 35050038 | 1 ml (končna koncentracija 2 mM) |
| FBS | Gibco, 10500064 | 2,5 ml |

Preglednica 8. Sestava gojišča UroM (+ Ca²⁺ - S), ki omogoča diferenciacijo normalnih prašičjih celic.

| Sestavine gojišča | Proizvajalec, kataloška številka | Volumen, potreben za pripravo 100 ml gojišča |
|-------------------|-------------------------------------|---|
| Advanced DMEM | Gibco, 12491023 | 49,5 ml |
| MCDB 153 | Sigma, M7403 | 49,5 ml |

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 8

| Sestavine gojišča | Proizvajalec, kataloška številka | Volumen, potreben za pripravo 100 ml gojišča |
|-------------------|-------------------------------------|---|
| Adenin | Sigma, A2786 | 60 µl (končna koncentracija 15 µg/ml) |
| Hidrokortizon | Sigma, H0888 | 100 µl (končna koncentracija 0,5 µg/ml) |
| Fosfoetanolamin | Sigma, P0503 | 140 µl (končna koncentracija 0,1 mM) |
| Inzulin | Sigma, I1882 | 50 µl (končna koncentracija 5 µg/ml) |
| Glutamax | Gibco, 35050038 | 1 ml (končna koncentracija 2 mM) |
| CaCl ₂ | UKC Ljubljana | 160 µl (končna koncentracija 2,5 mM) |

3.1.4.3 Netumorigene celice dojke

V poskusih smo uporabili celice trajne celične linije MCF10a, ki so bile izolirane iz bolnice s fibrocistično boleznijo dojke, vendar niso tumorigene ter imajo lastnosti normalnih epiteljskih celic dojke. Celice MCF10a smo nasajali z nasaditveno gostoto 5×10^4 celic/cm² in jih gojili v gojišču, katerega sestava je prikazana v Preglednici 9. Za izvedbo poskusov smo uporabili celice MCF10a od 19. do 21. pasaže.

Preglednica 9. Sestava gojišča, prilagojena za gojenje netumorigenih celic dojke MCF10.

| Sestavine gojišča | Proizvajalec, kataloška številka | Volumen, potreben za pripravo 500 ml gojišča |
|---------------------------|-------------------------------------|---|
| Gojišče MEMB | Lonza, CC-3151 | 494 ml |
| Epidermalni rastni faktor | Lonza, CC-4136 | 0,5 ml |
| Hidrokortizon | Lonza, CC-4136 | 0,5 ml |
| Inzulin | Lonza, CC-4136 | 0,5 ml |
| HS | Gibco, 16050-130 | 2,5 ml |

3.1.4.4 Gojišče za pripravo homogenata in izvlečka humane amnijske membrane

Gojišče za pripravo homogenata in izvlečka hAM smo pripravili z enakimi sestavinami, kot smo jih uporabili za pripravo gojišča za gojenje normalnih in rakavih celic, a brez FBS, HS, in CaCl₂ (Preglednica 10).

Preglednica 10. Sestavine gojišča za pripravo homogenata in izvlečka hAM.

| Sestavine gojišča | Proizvajalec, kataloška številka | Volumen, potreben za pripravo 100 ml gojišča |
|--|-------------------------------------|---|
| Gojišče za pripravo homogenata za celice T24, T24-eGFP, RT4 in MCF7 | | |
| Advanced DMEM | Gibco, 12491023 | 49 ml |
| F12 (HAM) | Gibco, 21765029 | 49 ml |
| Glutamax | Gibco, 35050038 | 2 ml (končna koncentracija 4 mM) |

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 10

| Sestavine gojišča | Proizvajalec, kataloška številka | Volumen, potreben za pripravo 100 ml gojišča |
|--|-------------------------------------|---|
| Gojišče za pripravo homogenata za celice NPU | | |
| Advanced DMEM | Gibco, 12491023 | 49,5 ml |
| MCDB 153 | Sigma, M7403 | 49,5 ml |
| Adenin | Sigma, A2786, | 60 µl (končna koncentracija 15 µg/ml) |
| Hidrokortizon | Sigma, H0888 | 100 µl (končna koncentracija 0,5 µg/ml) |
| Fosfoetanolamin | Sigma, P0503 | 140 µl (končna koncentracija 0,1 mM) |
| Inzulin | Sigma, I1882, | 50 µl (končna koncentracija 5 µg/ml) |
| Glutamax | Gibco, 35050038 | 1 ml (končna koncentracija 2 mM) |
| Gojišče za pripravo homogenata za celice MCF10a | | |
| Gojišče MEBM | Lonza, CC-3151 | 494,5 ml |
| Ekstrakt goveje hipofize | Lonza, CC-4136 | 2 ml |
| Epidermalni rastni faktor | Lonza, CC-4136 | 0,5 ml |
| Hidrokortizon | Lonza, CC-4136 | 0,5 ml |
| Inzulin | Lonza, CC-4136 | 0,5 ml |

3.1.5 Inhibitorji FAK

V Preglednici 11 so naštetih inhibitorji FAK, ki smo jih uporabljali med praktičnim delom doktorske disertacije.

Preglednica 11. Seznam uporabljenih inhibitorjev FAK.

| Inhibitor | Proizvajalec, kataloška številka | Koncentracija založne raztopine | Uporabljena koncentracija v poskusih |
|-------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--|
| Defactinib | Selleckchem, S7654 | 10 mM | 10 µM |
| PF-573228 | Selleckchem, S2013 | 10 mM | 10 µM |
| PND-1186 | Selleckchem, S7653 | 1 mM | 10 µM |



V poskusih smo uporabili tiste koncentracije inhibitorjev FAK, ki so se v naših predhodnih raziskavah izkazale kot primerne za nadaljnje poskuse. Ugotovili smo namreč, da visoke koncentracije inhibitorjev FAK (npr. 100 µM) sprožijo luščenje celic T24 in zmanjšajo njihovo viabilnost (Markovič, 2019), zaradi česar izgubimo objekt (celice) raziskovanja.

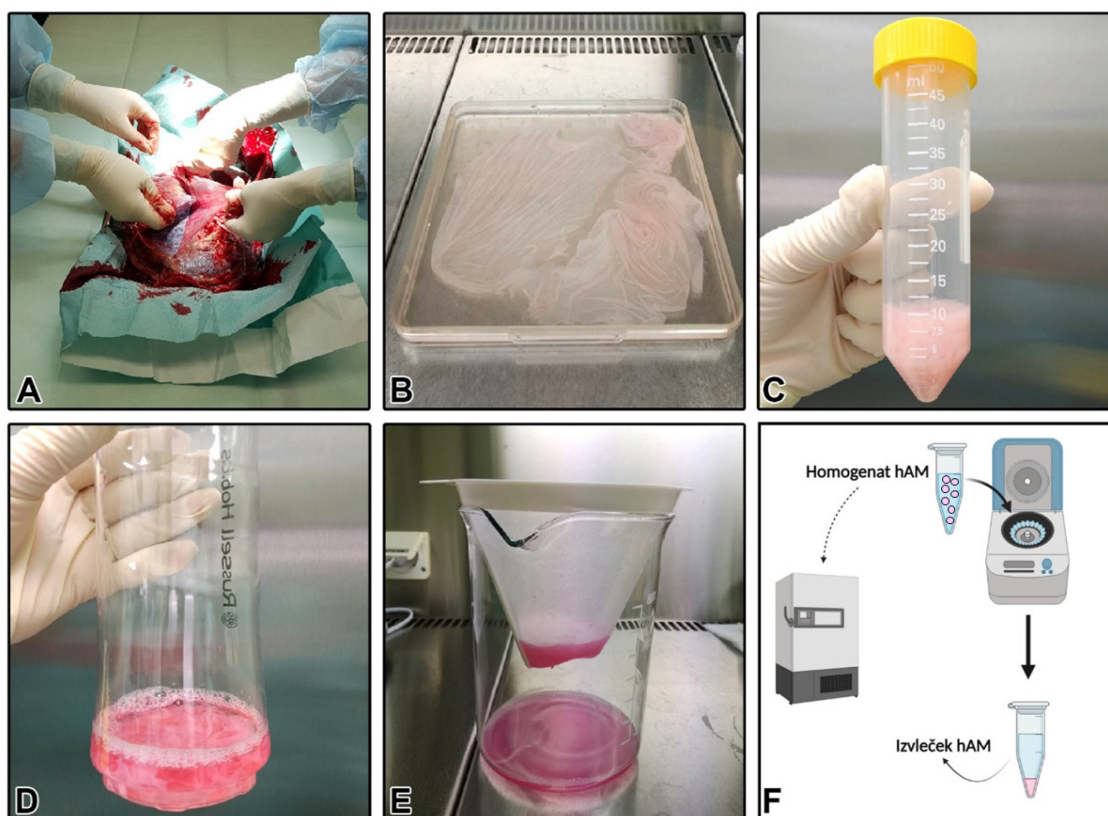
3.2 METODE

3.2.1 Priprava homogenata humane amnijske membrane

Uporabo hAM je odobrila komisija Republike Slovenija za medicinsko etiko (številka odločbe 43/12/09 in 0120-179/2018/5). Po elektivnem carskem rezu smo ločili hAM od horionske membrane (hCM), jo sprali s sterilnim PBS ter odstranili vse predele na hAM, kjer so bili vidni sledovi krvi in lipidnih plakov. Nato smo hAM razrezali na koščke velikosti 3×3 cm, jih prenesli v 50 ml centrifugirko in jim izmerili volumen. Zatem smo v centrifugirko dodali ustrezno gojišče v razmerju 1:4 (1 del hAM in 3 deli gojišča za pripravo homogenata hAM brez FBS, HS in CaCl₂ (Preglednica 10). Sledila je homogenizacija s homogenizatorjem Russell Hobbs 21350-56 (Russell Hobbs, Združeno kraljestvo) in/ali Kinematica PolytronR © PT 3100 D (Kinematica, Švica) (Preglednica 12). Homogenizacijo s Polytronom smo izvedli pri treh različnih hitrostih (20000 obratov/minuto, 10000 obratov/minuto in 5000 obratov/minuto). Po končani homogenizaciji (3 minut 30 sekund) smo homogenate hAM filtrirali skozi sterilni najlonski filter s premerom por 0,5–1 mm ter jih do uporabe hranili pri –80 °C. Priprava homogenata je predstavljena na Sliki 9.

Preglednica 12. Specifikacije homogenizatorjev, ki so bili uporabljeni pri proučevanju protirakavega učinka hAM.

| Homogenizator | Proizvajalec | Moč | Hitrost homogenizacije | Oblika noža |
|-----------------------------------|---|--------|---|---|
| Russell Hobbs 21350-56 | Russell Hobbs, Failsworth, Velika Britanija | 300 W | Ni nastavljiva (ena hitrost do 24000 obratov/minuto) |  |
| Polytron® PT 3100 D | Kinematica, Luzern, Švica | 1200 W | Nastavljiva (homogenat hAM smo pripravili pri 20000, 10000, in 5000 obratih na minuto) |  |



Slika 9. Shematski prikaz priprave homogenata in izvlečka hAM. (A) Ločevanje hAM od hCM. (B) Spiranje hAM s PBS. (C) Meritev volumna koščkov hAM. (D) Dodajanje ustreznega gojišča koščkom hAM v razmerju 1:4 (E) Filtriranje homogenata skozi sterilni najlonski filter s premerom por 0,5–1 mm. (F) Shranjevanje homogenata hAM na -80°C ali priprava izvlečka hAM s centrifugiranjem homogenata hAM.

Homogenat hAM, pripravljen z Russell Hobbsom je bil uporabljen v vseh poskusih. Tako pripravljen homogenat smo poimenovali **Homogenat hAM** ali **RH**. Homogenat hAM, pripravljen s Polytronom smo poimenovali **PT1** (homogenizacija pri 20000 obratih/minuto), **PT2** (homogenizacija pri 10000 obratih/minuto) in **PT3** (homogenizacija pri 5000 obratih/minuto). Tako pripravljen homogenat hAM smo uporabili samo pri analizi vpliva homogenata hAM na luščenje normalnih in rakavih celic (Poglavji 3.2.2 in 4.1.2). Pri analizi vpliva pripravkov iz hAM na migracijo in invazijo normalnih in rakavih urotelijskih celic (Poglavja 3.2.5, 3.2.6 in 4.3) smo uporabili dvakrat redčen homogenat hAM in zato smo ga poimenovali **Homogenat hAM (redčen 1:2)**.

Pred začetkom vsakega poskusa smo homogenatu hAM dodali ustrezen volumen FBS (končna koncentracija 5 % za celice T24, T24-eGFP, RT4 in MCF7), HS (končna koncentracija 5 % za celice MCF10a) ali CaCl_2 (končna koncentracija 2,5 mM za celice NPU).

3.2.2 Priprava izvlečka humane amnijske membrane

Izleček hAM smo pripravili tako, da smo homogenat hAM odmrznili, ga centrifugirali

10 minut, pri $1000 \times g$ in sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo pelet zavrgli ter bistri supernatant, ki smo ga poimenovali kot izvleček hAM, uporabili za nadaljnje poskuse. Priprava izvlečka je predstavljena na Sliki 9.

Izvleček hAM je bil vedno pripravljen po centrifugiranju homogenata hAM, ki je bil pripravljen z Russell Hobbsom in tako pripravljen izvleček smo poimenovali **Izvleček hAM**. Pri analizi vpliva pripravkov iz hAM na migracijo in invazijo normalnih in rakavih urotelijskih celic (Poglavja 3.2.5, 3.2.6 in 4.3) smo uporabili dvakrat redčen izvleček hAM in zato smo ga poimenovali **Izvleček hAM (redčen 1:2)**.

Pred začetkom vsakega poskusa smo izvlečku hAM dodali ustrezen volumen FBS (končna koncentracija 5 % za celice T24, T24-eGFP, RT4 in MCF7), HS (končna koncentracija 5 % za celice MCF10a) ali CaCl_2 (končna koncentracija 2,5 mM za celice NPU).

3.2.3 Analiza vpliva homogenata in izvlečka humane amnijske membrane na luščenje normalnih in rakavih celic

Da bi preverili vpliv pripravkov iz hAM na luščenje rakavih celic, smo konfluentne kulture celic T24, RT4, NPU, MCF7 in MCF10a tretirali 24 ur s homogenatom hAM. Da bi ocenili, kako način priprave homogenata hAM in čas tretiranja vplivata na odstotek odluščenih urotelijskih celic, smo normalne in rakave urotelijske celice gojili do konfluentnosti ter jih nato tretirali z različnimi pripravki homogenata hAM (Poglavje 3.2.1) **(a)** 24 ur tri dni zaporedoma ali **(b)** 2 uri na dan tri dni zapored. Ko smo ugotovili, kateri pripravek homogenata hAM je najbolj učinkovit, smo preverili še vpliv izvlečka hAM na luščenje normalnih in rakavih celic, tako da smo konfluentne kulture normalnih in rakavih urotelijskih celic tretirali z izvlečkom hAM **a)** 24 ur tri dni zaporedoma ali **(b)** 2 uri na dan tri dni zapored. Kot kontrole smo uporabili celice, ki so bile tretirane z gojiščem brez hAM. Po zaključenem tretmaju smo celice trikrat močno sprali z gojiščem ter zajeli 10 naključnih slik na vzorec z invertnim fazno-kontrastnim mikroskopom pri objektivu z 10-kratno lastno povečavo. Območje odluščenih celic smo izmerili s pomočjo programske opreme ImageJ in ga predstavili kot povprečje preraščenosti podlage (%) \pm standardna napaka povprečja (SEM). Rezultate smo pridobili na podlagi 3–6 neodvisnih poskusov, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve.

3.2.4 Analiza učinka homogenata hAM na pritrjevanje rakavih urotelijskih celic

Da bi ovrednotili vpliv homogenata hAM na pritrjevanje rakavih urotelijskih celic na podlago, smo celice T24 in RT4 nasadili v homogenatu hAM in gojišču brez hAM ter jih gojili tri zaporedne dni. Vsakih 24 ur smo celicam dodali svež homogenat hAM ali gojišče. Za kvantifikacijo števila pritrjenih celic, smo najprej odstranili homogenat hAM oz. gojišče, jih fiksirali v 4 % formaldehidu v PBS, sprali trikrat 5 minut s PBS ter nato barvali 15 minut z barvilom Giemsa. Pritrjene celice smo nato trikrat sprali s PBS, jih

poslikali s stereomikroskopom (Nikon, Japonska), opremljenim z MikroCam PRO HDMI 5MP (Bresser GmbH, Nemčija). Slike smo nato poskenirali z aparatom ScanMaker 8700 (Microtek, Hsinchu, Tajvan). Slike, pridobljene s stereomikroskopom smo pretvorili v 8-bitne binarne slike s pomočjo programske opreme ImageJ. Izmerili smo integrirano gostoto pritrjenih celic (oz. vsoto vrednosti slikovnih pik na sliki) ter rezultate predstavili kot povprečno relativno intenziteto (arbitrarne enote; angl. *arbitrary units* (a. u.)) \pm standardna napaka povprečja (SEM). Rezultate smo pridobili na podlagi treh bioloških ponovitev, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve.

3.2.5 Analiza proliferacije rakavih urotelijskih celic

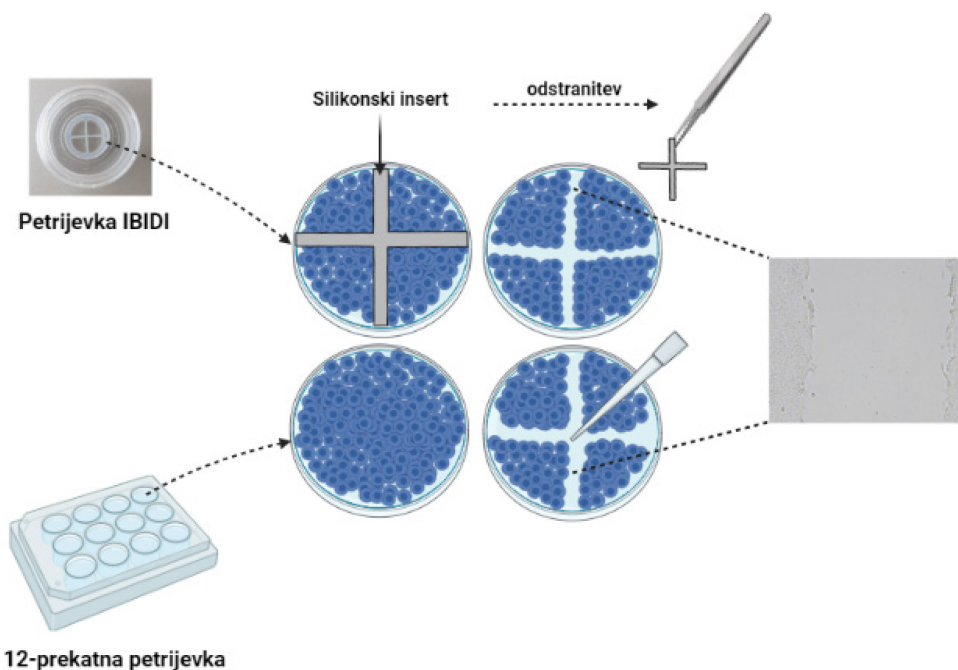
Proliferacijo mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in urotelijskih celic papiloma RT4 smo ovrednotili z uporabo kompleta reagentov Click-iT® Plus Alexa Fluor® Picolyl Azide Toolkit. Konfluentne celice T24 in RT4 smo tretirali s homogenatom hAM ali z gojiščem (kontrola) tri dni zapored ter ovrednotili hitrost proliferacije po 24, 48 in 72 urah od začetka tretiranja. Vzorce smo 24 ur pred analizo proliferacije inkubirali v homogenatu hAM pri 37 °C in 5 % CO₂. V homogenat hAM ali v gojišče smo dodali 5-etinil-2'-deoksiuridin (EdU) koncentracije 10 μ M. Po 24 urah smo celice fiksirali v 4 % formaldehidu v PBS in jih trikrat sprali s 3 % BSA v PBS. Sledila je 20-minutna permeabilizacija v 0,5 % raztopini Triton X-100 v PBS in trikratno spiranje v 3 % raztopini BSA v PBS. Nato smo vzorce inkubirali 30 minut v reakcijski mešanici Click-It Plus v temi pri sobni temperaturi in jih trikrat sprali s 3 % BSA v PBS. Nato smo vzorce pokrili z reagentom za preprečevanje bledenja fluorescence Vectashield (Vector Laboratories, ZDA), ki vsebuje fluorescenčno barvilo DAPI, ki specifično obarva jedra celic modro. S fluorescenčnim mikroskopom AxioImager Z1 z dodatkom ApoTome smo v vseh časovnih točkah zajeli 10 naključnih slik na vzorec in določili število proliferajočih celic. Rezultate smo predstavili kot povprečje odstotka proliferacije \pm standardna napaka povprečja (SEM). Rezultate proliferacije smo pridobili na podlagi treh bioloških ponovitev, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve.

3.2.6 *In vitro* model celjenja rane

Z *in vitro* modelom celjenja rane smo spremljali sposobnost migracije normalnih in rakavih urotelijskih celic. Celice T24, RT4 in NPU smo gojili do konfluentnosti v 12-prekatnih petrijevkah ali v petrijevkah IBIDI, ki vsebujejo silikonski insert (IBIDI μ -Dish 35 mm). 16 ur pred začetkom tretmaja smo celice gojili v gojišču brez seruma. Umetno rano smo ustvarili z 200 μ l pipetnim nastavkom ali z odstranitvijo silikonskega inserta iz petrijevke IBIDI (Slika 10). Celice smo sprali s PBS-om in jim nato dodali različne pripravke hAM ali ustrezno gojišče (kontrola). Celice T24 smo izpostavili inhibitorjem FAK in mešanici homogenata hAM z inhibitorji FAK. Čas zaraščanja rane smo spremljali s faznokontrastnim mikroskopom Eclipse E300 (Nikon, Japonska) ter zajeli 10–15 slik na prekat/petrijevko ob času 0 in po 6, 24, 48, 72 in 96 urah. Rezultate migracije smo

pridobili na podlagi 3–6 neodvisnih poskusov, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve. Rezultate smo predstavili kot odstotek zaraščene rane (enačba 1) ± standardna napaka povprečja (SEM).

$$\% \text{ zaraščene rane} = \frac{(\text{Površina } t=0 \text{ h}) - (\text{Površina } t=\Delta 6-96 \text{ h})}{(\text{Površina } t=0 \text{ h})} \times 100 \% \dots (1)$$



Slika 10. Shematski prikaz *in vitro* modela celjenja rane. Normalne in rakave urotelijske celice smo gojili do konfluentnosti. Umetno rano smo ustvarili z odstranitvijo silikonskega inserta iz petrijevke IBIDI ali z odstranitvijo celic od podlage 12-prekatnih petrijevok z 200 μ l pipetnim nastavkom. Celice smo sprali in jih tretirali z različnimi pripravki ter nato spremljali zaraščanje rane v različnih časovnih točkah (0, 6, 24, 48, 72 ali 96 ur). Slika je izrisana s spletnim orodjem BioRender.

3.2.7 *In vitro* model celjenja rane v realnem času

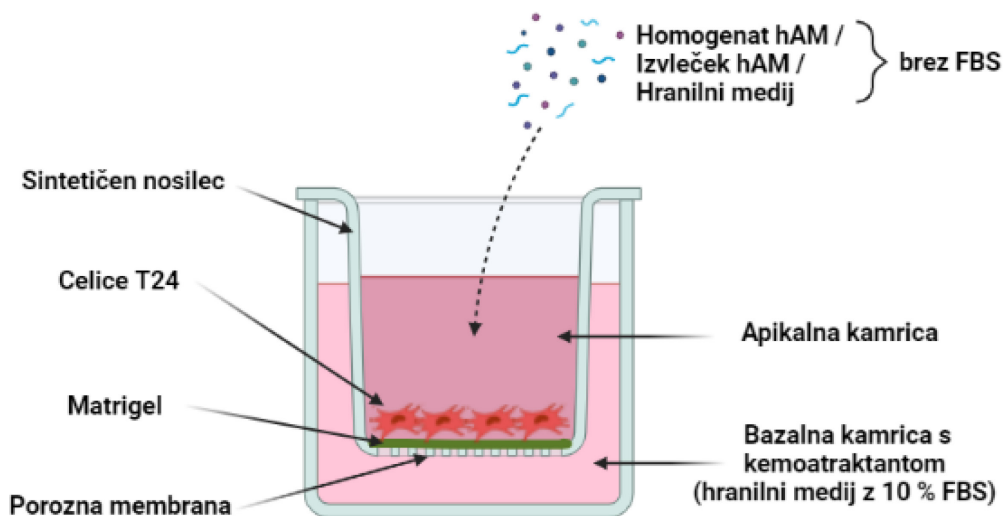
Migracijsko sposobnost normalnih in rakavih urotelijskih celic smo proučili s slikanjem celic T24-eGFP, RT4 in NPU s konfokalnim mikroskopom LSM 900 v realnem času. Celice smo gojili do konfluentnosti v petrijevkah IBIDI s silikonskim insertom. Z odstranitvijo silikonskega inserta smo ustvarili umetno rano in celicam dodali homogenat hAM, izvleček hAM ali gojišče. Nato smo celice prestavili v komoro konfokalnega mikroskopa (pri 37 °C in atmosferi zraka 5 % CO₂) ter nastavili slikanje na vsaj petih različnih mestih vzdolž rane. V času 24 ur in/ali 48 ur smo vsakih 15 minut smo zajeli fluorescenčne in/ali faznokontrastne slike.

3.2.8 *In vitro* test invazivnosti

Z *in vitro* testom invazivnosti smo proučili vpliv homogenata in izvlečka hAM na invazivnost mišično invazivnih rakavih urotelijskih celic T24, ki smo jih gojili v gojišču

brez seruma 16 ur pred začetkom tretiranja. Sledili smo že objavljenemu protokolu (Pijuan in sod., 2019), tako da smo najprej z raztopino Matrigela prekrili zgornji del porozne membrane s premerom por 8 μm (60 minut, 37 °C). Po polimerizaciji Matrigela smo sintetične nosilce sprali z gojiščem brez seruma ter dodali $5,6 \times 10^4$ celic T24 v 500 μl homogenata in izvlečka hAM brez seruma ali gojišča brez seruma (kontrolne celice). V bazalno kamrico smo dodali gojišče z 10 % FBS, ki je deloval kot kemoatraktant. Po 20 urah inkubacije smo sintetične nosilce s celicami dvakrat sprali s sterilnim PBS. Sledila je 15-minutna fiksacija s 4 % formaldehidom v PBS pri sobni temperaturi. Nato smo celice ponovno dvakrat sprali s PBS in jih inkubirali z barvilom Hoechst, ki specifično obarva jedra celic modro. S fluorescenčnim mikroskopom smo nato zajeli 7–10 naključno izbranih slik zgornjega dela porozne membrane in določili število vseh celic. Nato smo z vatirano palčko iz zgornjega dela porozne membrane odstranili celice, zajeli 7–10 naključno izbranih slik spodnjega dela porozne membrane in prešteli število invadirajočih celic. Rezultate *in vitro* testa invazivnosti smo pridobili na podlagi 4 neodvisnih poskusov, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve. Rezultate smo predstavili kot odstotek invadirajočih celic (enačba 2) \pm standardna napaka povprečja (SEM).

$$\% \text{ invadirajočih celic} = \frac{(\text{število invadirajočih celic})}{(\text{število vseh celic})} \times 100 \% \quad \dots (2)$$



Slika 11. Shematski prikaz *in vitro* testa invazivnosti. Zgornji del porozne membrane je prekrit z raztopino Matrigela. Po polimerizaciji Matrigela smo celice T24 nasadili ter dodali ustrezen volumen homogenata hAM, izvlečka hAM ali gojišča brez vsebnosti seruma. V bazalno kamrico smo dodali kemoatraktant in po 20–24 urah ocenili delež celic, ki so invadirale iz zgornjega v spodnji del porozne

membrane. Slika je izrisana s spletnim orodjem BioRender.

3.2.9 Določanje koncentracije celokupnih proteinov z metodo BCA

Koncentracijo celokupnih proteinov smo določili z metodo bicinoninske kisline (BCA). Ta metoda temelji na dejstvu, da peptidne vezi v proteinih reducirajo Cu^{2+} v Cu^+ . Količina zmanjšane Cu^{2+} je sorazmerna količini proteinov, prisotnih v raztopini. Cu^+ nato reagira z dvema molekulama BCA, pri čemer nastane vijoličen produkt, ki absorbira pri valovni dolžini 562 nm (Smith in sod., 1985).

Za določanje koncentracije celokupnih proteinov v vzorcih smo uporabili komplet za določanje proteinov Pierce BCA Protein Assay Kit, ki vsebuje osnovno raztopino BSA, reagent A in reagent B. Najprej smo pripravili standardne raztopine, tako da smo redčili osnovno raztopino BSA (2 mg/ml) po navodilih, prikazanih v Preglednici 13. Nato smo zamešali reagent A in reagent B v razmerju 50:1 in tako pripravili reakcijsko mešanico, ki smo jo dodali standardnim raztopinam in vzorcem v enaki količini (200 μl). Po 30-minutni inkubaciji pri 37 °C smo izmerili absorbanco pri 562 nm ter na podlagi absorbance standardnih vzorcev izrisali umeritveno krivuljo. Iz enačbe, ki opisuje to premico, smo izračunali koncentracijo proteinov v vzorcih.

Preglednica 13. Navodila za pripravo standardnih raztopin BSA za merjenje proteinov.

| Standardna raztopina | Volumen destilirane H_2O | Volumen standardne raztopine | Končna koncentracija BSA |
|----------------------|--|----------------------------------|----------------------------------|
| (A) | 0 μl | 50 μl raztopine (A) | 2000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) |
| (B) | 12,5 μl | 37,5 μl raztopine (A) | 1500 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) |
| (C) | 16,67 μl | 33,3 μl raztopine (B) | 1000 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) |
| (D) | 12,5 μl | 37,5 μl raztopine (C) | 750 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) |
| (E) | 16,67 μl | 33,3 μl raztopine (D) | 500 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) |
| (F) | 25 μl | 25 μl raztopine (E) | 250 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) |
| (G) | 25 μl | 25 μl raztopine (F) | 125 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) |
| (H) | 40 μl | 10 μl raztopine (G) | 25 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) |
| (I) | 50 μl | 0 μl | 0 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) |

3.2.10 Prenos Western

Celice T24, RT4 in NPU smo gojili do konfluentnosti v 60,1 cm^2 petrijevkah in jih tretirali 24 ur s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem (kontrolne celice). Celice T24 smo tretirali še z inhibitorji FAK. Vpliv pripravkov hAM na normalne urotelijske celice

po izzvani poškodbi urotelija, smo ocenili tako, da smo ustvarili umetne rane z 200 μ l pipetnim nastavkom in celice NPU inkubirali 6 ali 24 ur s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem (kontrolni vzorec). Da bi ocenili vpliv pripravkov hAM na normalne urotelijske celice po zacelitvi rane, smo ustvarili umetne rane, počakali, da se rane zacelijo ter nato celice NPU izpostavili za 24 ur homogenatu hAM, izvlečku hAM ali gojišču (kontrolni vzorec).

Po tretiranju smo celice sprali s sterilnim PBS, jih postrgali z gojitvene površine in jih 5 minut centrifugirali pri $200 \times g$ in $4^\circ C$. Po odstranitvi supernatanta smo shranili pelete v skrinji na $-80^\circ C$. Pelete smo odmrznili in jih lizirali (30 min) z ledeno-mrzlim pufrom RIPA, ki smo mu predhodno dodali koktejl fosfataznih in proteaznih inhibitorjev (99 delov pufra RIPA in 1 del koktejl inhibitorjev). Nato smo vzorce centrifugirali 20 minut pri $10000 \times g$ in $4^\circ C$. Nato smo zavrgli pelet in izmerili koncentracijo proteinov v supernatantu po protokolu, ki je opisan v poglavju 3.2.8. Vzorce smo pripravili za nanos na gel tako, da smo jim dodali nanašalni pufer v razmerju 1:4 in jih kuhali 10 minut v vodni kopeli. Enako koncentracijo proteinov (50 $\mu g/ml$) smo nato nanесли na komercialne gele 4–20 % in 6 % Tris-glicinske gele (Invitrogen, ZDA). V aparaturi XCell SureLock® Mini-Cell smo pustili elektroforezo teči v pufru za elektroforezo 45 minut pri konstantni napetosti 225 V. Po končani elektroforezi smo gele prenesli na nitrocelulozno membrano, tako da smo v aparaturi za prenos proteinov XCell II Blot pripravili sendvič za prenos po priporočilih proizvajalca. Prenos proteinov iz gelov na nitrocelulozno membrano smo izvajali v pufru za prenos pri konstantni napetosti 25 V (90 minut). Po končanem prenosu smo membrane inkubirali v blokirnem pufru 90 minut na stresalniku (100 obratov/minuto) pri sobni temperaturi. Nato smo membrane sprali s Tris pufrom s soljo z dodanim 0,1 % Tween® 20 (TBS-T) in jih čez noč pri $4^\circ C$ inkubirali s primarnimi protitelesi na stresalniku (100 obratov/minuto) (Preglednica 14). Naslednji dan smo membrane sprali s TBS-T (3 \times 5minut) in jih nato inkubirali s sekundarnimi protitelesi proti mišjim ali zajčjim antigenom, konjugiranimi s hrenovo peroksidazo (HRP) (Preglednica 15) za 90 minut na stresalniku (100 obratov/minuto) pri sobni temperaturi. Po inkubaciji s sekundarnimi protitelesi smo membrane sprali s TBS-T (3 \times 5min), vizualizirali proteinske lise s kemiluminiscenco s pomočjo kemiluminiscenčnega substrata SuperSignal West Pico, po navodilih proizvajalca. Membrane smo slikali z napravo LAS-4000 (Fujifilm, Japonska) ali IBright 1500 (ThermoFisher, ZDA). Denzitometrična analiza proteinskih lis je bila izvedena s programsko opremo ImageJ (Davarinejad, 2015). Izražanje in količine fosforilrane oblike tarčnih proteinov smo normalizirali na vsebnost α -tubulina. Polega tega smo izražanje in količino fosforilrane oblike tarčnih proteinov v tretiranih vzorcih normalizirali glede na kontrolne vzorce ter te vrednosti predstavili kot kratnik dvojiškega logaritma spremembe (angl. *log₂ fold change (log₂FC)*). Rezultate prenosa Western smo pridobili na podlagi 2–6 neodvisnih poskusov, znotraj katerih je bila izvedena vsaj ena tehnična ponovitev. Natančna sestava in priprava posameznih pufrov sta opisani v Poglavju 3.1.3.

Preglednica 14. Seznam uporabljenih primarnih protiteles za dokazovanje proteinov s prenosom Western.

| Protitelo | Gostitelj | Redčitev | Proizvajalec in kataloška številka | Pričakovana |
|--------------------|-----------|----------|---------------------------------------|-----------------------|
| | | | | molekulska masa (kDa) |
| FAK | zajec | 1:1000 | Cell Signaling Technology #3285 | 125 |
| p-FAK | miš | 1:500 | Santa Cruz Biotechnology #sc-81493 | 125 |
| p-FAK | zajec | 1:1000 | Thermofisher #700255 | 50 (težka veriga) |
| PI3K p110 α | zajec | 1:1000 | Cell Signaling Technology #4249 | 110 |
| Total Akt | zajec | 1:2000 | Cell Signaling Technology #2920 | 60 |
| p-Akt | zajec | 1:2000 | Cell Signaling Technology #4060 | 60 |
| mTOR | zajec | 1:1000 | Cell Signaling Technology #2983 | 289 |
| p-mTOR | zajec | 1:1000 | Cell Signaling Technology #2971 | 289 |
| α -tubulin | miš | 1:2000 | Sigma-Aldrich #T6199 | 50 |
| α -aktinin | zajec | 1:1000 | Cell Signaling Technology #6487 | 100 |
| Paksilin | zajec | 1:1000 | Cell Signaling Technology #12065 | 55 – 70 |
| Tenzin-2 | zajec | 1:1000 | Cell Signaling Technology #11990 | 145 – 155 |
| Vinkulin | zajec | 1:1000 | Cell Signaling Technology #4650 | 124 |
| Talin-1 | zajec | 1:1000 | Cell Signaling Technology #4021 | 270 |
| Kortaktin | zajec | 1:1000 | Cell Signaling Technology #3503 | 85 |
| p-kortaktin | zajec | 1:1000 | Cell Signaling Technology #4569 | 85 |
| RhoA | zajec | 1:1000 | Cell Signaling Technology #2117 | 21 |
| RhoC | zajec | 1:1000 | Cell Signaling Technology #3430 | 21 |
| Cdc42 | zajec | 1:1000 | Cell Signaling Technology #2466 | 21 |
| Rac1/2/3 | zajec | 1:1000 | Cell Signaling Technology #2465 | 21 |
| N-kadherin | zajec | 1:1000 | Abcam #ab18203 | 125 – 135 |
| MMP-2 | zajec | 1:1000 | Cell Signaling Technology #40994 | 72 |

Preglednica 15. Seznam uporabljenih sekundarnih protiteles za dokazovanje proteinov s prenosom Western.

| Protitelo | Gostitelj | Redčitev | Proizvajalec in kataloška številka |
|--|-----------|----------|------------------------------------|
| Mišja sekundarna protitelesa, označena s HRP | | | |
| | koza | 1:2000 | Sigma-Aldrich #A4416 |
| Zajčja sekundarna protitelesa, označena s HRP | | | |
| | koza | 1:2000 | Sigma-Aldrich #A6154 |

3.2.11 Analiza izražanja mRNA z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR)

3.2.11.1 Izolacija RNA

Celice T24, RT4 in NPU smo gojili do konfluentnosti in jih 24 ur inkubirali s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem (kontrolne celice). Po končanem tretiranju smo celice rahlo sprali s sterilnim PBS in nadaljevali z izolacijo RNA z uporabo kompleta reagentov Quick-RNA™ Microprep Kit. Najprej smo celice lizirali v RNA lizirnem pufri, dodali 100 % etanol v razmerju 1:1 (pufer : etanol), mešanico prenesli v kolone in centrifugirali 30 sekund na sobni temperaturi pri $16,000 \times g$. Nato smo kolone sprali s spiralnim pufrom, dodali pufer z DNAzo I in inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi. Nato smo kolonam dodali pufer za prečiščevanje in centrifugirali 30 sekund na sobni temperaturi pri $16,000 \times g$. Zatem smo še dvakrat sprali kolone s spiralnim pufrom ter eluirali RNA v 15 μ l vode brez nukleaz. Koncentracijo izolirane RNA smo izmerili s kompletom reagentov The Qubit™ RNA BR Assay Kits (ThermoFisher, ZDA) po navodilih proizvajalca. Najprej smo pripravili reakcijsko mešanico z mešanjem reagenta A in pufera B v razmerju 1:200, jo dodali standardoma in vzorcem ter inkubirali 2 minuti pri sobni temperaturi. Nato smo s fluorimetrom Qubit 4.0 (ThermoFisher, ZDA) izmerili celokupno koncentracijo RNA. Z nanodropom (Thermo Fisher Scientific, ZDA) smo izmerili absorbance pri treh valovnih dolžinah, in sicer 230 nm, 260 nm in 280 nm. Za oceno čistosti izolirane RNA smo uporabili razmerji A_{260}/A_{230} in A_{260}/A_{280} . Razmerje A_{260}/A_{230} se uporablja za ugotavljanje prisotnosti neželenih organskih spojin (npr. trizol in fenol) in je običajno nizko v vzorcih s slabšo kakovostjo. Vrednost A_{260}/A_{280} se uporablja za določanje razmerja med DNA in RNA v izoliranih vzorcih. Vrednost A_{260}/A_{280} je bila v naših vzorcih 1,8–2,0, kar je v skladu z vrednostjo za čisto RNA.

3.2.11.2 Prepisovanje RNA v cDNA

Reverzno prepisovanje iz RNA v cDNA smo izvedli s komercialnim kompletom reagentov Reverse Transcription System (Promega, ZDA) po navodilih proizvajalca. Reakcijsko mešanico za reverzno prepisovanje RNA v cDNA (Preglednica 16) smo inkubirali 15 minut pri 42 °C in 5 minut pri 95 °C. Prepisovanje RNA v cDNA smo izvedli na cikličnem pomnoževalcu Veriti (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Vzorce cDNA smo hranili pri –20 °C do nadaljnje analize z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času.

Preglednica 16. Reakcijska mešanica za reverzno prepisovanje RNA v cDNA.

| Sestavine | Volumen |
|-------------------------------------|-----------|
| MgCl ₂ , 25 mM | 4 μ l |
| 10x pufer za reverzno transkripcijo | 2 μ l |

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 16

| Sestavine | Volumen |
|---------------------------------------|---------|
| dNTP, 10 mM | 2 µl |
| RNase inhibitor | 0,5 µl |
| AMV reverzna transkriptaza | 0,6 µl |
| Oligo (dT) začetniki | 1 µl |
| 500 ng RNA + voda brez nukelaz | 9,9 µl |

3.2.11.3 Verižna reakcije s polimerazo v realnem času

Verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR) smo izvedli z aparaturom MIC qPCR Cycler (Biomolecular systems, Avstralija). Za inkubacijo reakcijske mešanice za qPCR (Preglednica 17) smo uporabili naslednje pogoje: 20 sekund pri 95 °C in nato 40 ciklov z dvema stopnjama: 3 sekund pri 90 °C ter 30 sekund pri 60 °C.

Preglednica 17. Sestava reakcijske mešanice za qPCR.

| Sestavine | Volumen |
|--|---------|
| Istosmerni (F)- in obratnosmerni (R)- oligonukleotidni začetniki (200 nM) | 2,5 µl |
| Mešanica Fast SYBR® Green Master | 5 µl |
| Voda brez nukleaz | 0,5 µl |
| cDNA (0,5 ng/mL) | 2 µl |

Rezultate smo pridobili na podlagi 3–6 bioloških vzorcev in vsako biološko ponovitev izvedli v triplicatu. Referenčni gen za normalizacijo je bil *GAPDH*. Rezultate smo predstavili kot ΔCt ($Ct_{GAPDH} - Ct_{GOI}$), kar je razlika med *Ct* vrednostmi referenčnega gena (*GAPDH*) in tarčnega gena (angl. *gene of interest (GOI)*). Vrednost *Ct* predstavlja število ciklov PCR, ko fluorescenca vzorca preseže vnaprej določen prag, ki ga program samodejno nastavi. V Preglednici 18 so navedeni oligonukleotidni začetniki, ki smo jih uporabili za izvedbo qPCR.

Preglednica 18. Seznam oligonukleotidnih začetnikov za reakcijo qPCR.

| Gen | Vrsta | Istosmerni (F)-oligonukleotidni začetnik (5'-3') | Obratnosmerni (R)-oligonukleotidni začetnik (5'-3') |
|----------------------|------------|--|---|
| <i>PTK2</i> | Human | CATGCCCTCAACCAGGGATT | CACGCTGTCCGAAGTACAGT |
| | Sus scrofa | GCAGTCCGAGTTCTCCTTGA | TTTGGGTCAAGGTAAGCAGC |
| <i>PIK3CA</i> | Human | AGAGCCCCGAGCGTTT | TCGTGGAGGCATTGTTCTGA |
| | Sus scrofa | CCCAGGTGGAATGAATGGCT | GCCAATGGACAGTGTTCCTCT |

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 18

| Gen | Vrsta | Istosmerni (F)-oligonukleotidni začetnik (5'-3') | Obratnosmerni (R)-oligonukleotidni začetnik (5'-3') |
|--------------|------------|--|---|
| <i>AKT1</i> | Human | ATTTCCTCTTTGGAGGCTGTG | CAGCCAACCCTCCTTCACAAT |
| | Sus scrofa | CTGCACAAACGAGGCGAGT | CGCTCCTTGTAGCCGATGAA |
| <i>MTOR</i> | Human | GAATGCCACCCGAATTGGC | AATTCCACGTACTCAGCGGT |
| | Sus scrofa | TACGACCACCTGACCCTGAT | CGATCAAACCACACCTCGGA |
| <i>CDH2</i> | Human | AACAGCAACGACGGGTTAGT | CAGACACGGTTGCAGTTGAC |
| <i>MMP2</i> | Human | GACCAGAATACCATCGAGACCA | GTGTAGCCAATGATCCTGTATGTG |
| <i>TIMP2</i> | Human | GGAAGTGGACTCTGGAAACGA | CTCAGGCCCTTTGAACATCTTTAT |
| | Sus scrofa | CACCCGCAACAGGCGTT | GGTTGCCGTAGATGTCTGTTT |
| <i>GAPDH</i> | Human | GAAGGTCGGAGTCAACGGAT | TTCCCGTTCTCAGCCATGTAG |
| | Sus scrofa | TCGGAGTGAACGGATTTGGC | TGCCGTGGGTGGAATCATAAC |

3.2.12 Želatinska cimografija

Z metodo želatinske cimografije smo določili koncentracijo in aktivnost MMP, ki so jih v gojišče brez seruma izločile celice T24. Najprej smo konfluentne celice T24 tretirali 24 ur s homogenatom ali izvlečkom hAM. Kot kontrolo smo uporabili celice T24, ki so bile tretirane s hranilnim medijem brez hAM. Nato smo celice sprali s sterilnim PBS, jim dodali gojišče brez seruma ter nato pobrali gojišče (200 µl) v časovni točki 2 in 24 ur po končanem tretiranju. Gojišče smo nato centrifugirali (200 × g, 5 minut) in supernatant zamrznili pri -80 °C. Po odmrznitvi supernatanta smo izmerili celokupno koncentracijo proteinov z metodo BCA, ki je opisana v poglavju 3.2.8. En del supernatantov smo shranili za test ELISA, drugi del smo pripravili za nanos na gel, tako da smo vzorcem dodali nanašalni pufer v razmerju 1:4. Po 5 µg/ml celokupnih proteinov smo ločevali na 10 % poliakrilamidnem gelu z 0,1 % želatino, katerega sestava je prikazana v Preglednici 19. Elektroforeza je potekala v pufru za elektroforezo (120 minut) pri 4 °C in konstantni napetosti 125 V. Po končani elektroforezi smo gele sprali v dH₂O ter jih inkubirali v renaturacijskem pufru (2 × 30 minut) na stresalniku (100 obratov/minuto) pri sobni temperaturi. Nato smo gele prestavili v razvijalni pufer in stresali na stresalniku (100 obratov/minuto) pri sobni temperaturi (30 minut). Zatem smo jim dodali svež razvijalni pufer in jih inkubirali brez stresa še 24 ur pri 37 °C. Po inkubaciji v razvijalnem pufru smo gele sprali z dH₂O ter jih inkubirali v pufru za barvanje (60 minut) na stresalniku (100 obratov/minuto) pri sobni temperaturi. Potem smo poliakrilamidne gele ponovno sprali z dH₂O in jih inkubirali v pufru za razbarvanje (20 minut) na stresalniku (100 obratov/minuto) pri sobni temperaturi. Gele smo vizualizirali z digitalnim fotoaparatom.

Denzitometrična analiza je bila izvedena s programsko opremo ImageJ. Aktivno obliko MMP-2 smo določili na osnovi komercialnega standarda, ki ima velikost 64 kDa. Rezultate želatinske cimografije smo pridobili na podlagi 4–6 neodvisnih poskusov, znotraj katerih je bila izvedena vsaj ena tehnična ponovitev. Sestava posameznih pufrov je opisana v Poglavlju 3.1.3.

Preglednica 19. Sestavine 10 % poliakrilamidnega gela z 0,1 % želatino za želatinsko cimografijo.

| Sestavina | Ločitveni gel | Zbiralni gel |
|-------------------------------|---------------|--------------|
| dH ₂ O | 4,5 ml | 5,5 ml |
| Želatina (1 %) | 1,25 ml | / |
| 1,5 M Tris HCl (pH 8,8) | 2,5 ml | / |
| 1,25M Tris HCl (pH 6,8) | / | 1 ml |
| Akrlamid | 4,15 ml | 1 ml |
| Natrijev dodecilsulfat (20 %) | 62,5 µl | 50 µl |
| Amonijev persulfat (10 %) | 37,5 µl | 37,5 µl |
| TEMED | 7,5 µl | 5 µl |

3.2.13 Encimsko imunski test ELISA

Z encimsko imunskim testom ELISA smo izmerili koncentracijo TIMP-2, ki so jo v gojišče brez seruma izločile normalne in rakave urotelijske celice. Najprej smo konfluentne celice T24, RT4 in NPU tretirali 24 ur s homogenatom ali izvlečkom hAM. Gojišče brez hAM smo uporabili kot kontrolni vzorec. Po zaključenem tretmaju smo celice sprali s sterilnim PBS ter jim dodali ustrezno gojišče brez seruma. Po 2 in po 24 urah smo pobrali gojišče (200 µl), ga centrifugirali (200 × g, 5 min) ter shranili supernatant pri –80 °C. Za določanje koncentracije TIMP-2 smo uporabili komercialen komplet reagentov proizvajalca R&D. Najprej smo prekrili mikrotitrsko ploščico z mišjimi lovilnimi protitelesi proti človeškemu TIMP-2, ki so bili redčeni v sterilnem PBS, čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo odstranili lovilna protitelesa, sprali mikrotitrsko ploščico z izpiralnim pufrom ter dodali blokirni pufer za 60 minut pri sobni temperaturi. Nato smo sprali mikrotitrsko ploščico, dodali standardne raztopine, ki smo jih predhodno pripravili po navodilih proizvajalca in vzorce inkubirali 120 minut pri sobni temperaturi. Po spiranju z izpiralnim pufrom smo dodali raztopino biotininiranih detekcijskih protiteles in jih inkubirali 120 minut pri sobni temperaturi. Nato smo mikrotitrsko ploščico sprali, dodali s HRP-označen streptavidin in inkubirali 120 minut pri sobni temperaturi. Zatem smo mikrotitrsko ploščico ponovno sprali ter dodali raztopino substrata. Mikrotitrsko ploščico smo inkubirali 20 minut v temi pri sobni temperaturi. Reakcijo smo zaustavili z dodatkom zaustavitvene raztopine ter izmerili absorbanco nastalega rumenega produkta pri valovnih dolžinah 450 nm in 540 nm. Vrednosti, ki smo jih dobili pri 540 nm smo odšteli od vrednosti, ki smo jih dobili pri 450 nm in s tem popravili vse morebitne optične pomanjkljivosti na mikrotitrski ploščici. Na podlagi izmerjene absorbance standardnih raztopin smo izrisali umeritveno krivuljo ter iz

enačbe, ki opisuje to premico izračunali koncentracijo TIMP-2 v naših vzorcih. Rezultate smo dodatno normalizirali na celokupno koncentracijo proteinov v supernatantih. Rezultate testa ELISA smo pridobili na podlagi 4–5 neodvisnih poskusov, znotraj katerih sta bili izvedeni dve tehnični ponovitvi.

3.2.14 Priprava vzorcev za vrstično elektronsko mikroskopijo

Konfluentne kulture celic T24, RT4 in NPU smo tretirali 24 oz. 72 ur s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali ustreznim gojiščem (kontrolni vzorci). Vzorce smo nato pripravili za vrstično elektronsko mikroskopijo, tako da smo jih 3 ure fiksirali v fiksativu (3 % FA, 3 % GA v 0,1 M kakodilatnem pufu), v temi in pri 4 °C. Zatem smo jih čez noč inkubirali v 0,2 M kakodilatnem pufu, v temi, pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo vzorce inkubirali 120 minut v 1 % raztopini osmijevega tetroksida v 0,1 M kakodilatnem pufu, v temi in pri sobni temperaturi, čemur je sledilo spiranje v 0,2 M kakodilatnem pufu (trikrat po 30 minut), v temi in pri sobni temperaturi. Nato smo vzorce dehidrirali v vrsti alkoholov z naraščujočimi koncentracijami (20 minut v 30 %, 50 %, 70 % in 90 % etanolu ter dvakrat po 20 minut v 100 % etanolu). Potem je sledila inkubacija v 100 % acetonu (dvakrat po 20 minut), v 1:1 mešanici 100 % acetona in heksametildisilazana (HMDS) (20 minut) ter v 100 % HMDS (dvakrat po 20 minut). Vzorce smo preko noči sušili v digestoriju, jih nalepili na kovinske nosilce in v aparaturi za napraševanje prekrili s tanko plastjo zlata. Preparate smo nato poslikali z vrstičnim elektronskim mikroskopom Tescan Vega 3 pri napetosti 30 kV.

3.2.15 Priprava vzorcev za presevno elektronsko mikroskopijo

Konfluentne kulture celic T24, RT4 in NPU smo tretirali 24 oz. 72 ur s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali ustreznim gojiščem (kontrolni vzorci). Vzorce smo nato pripravili za presevno elektronsko mikroskopijo, tako da smo jih fiksirali 3 ure v fiksativu (3 % FA, 3 % GA v 0,1 M kakodilatnem pufu), v temi in pri 4 °C. Nato smo jih čez noč inkubirali v 0,1 M kakodilatnem pufu z 0,33 M saharazo, v temi, pri 4 °C. Naslednji dan smo vzorce inkubirali 60 minut v 2 % osmijevem tetraoksidu, v temi in pri sobni temperaturi, čemur je sledila 60 minutna inkubacija v 2 % raztopini uranil acetata v temi pri sobni temperaturi. Zatem smo vzorce dehidrirali v vrsti alkoholov z naraščajočimi koncentracijami (15 minut 50 % etanolu in 70 % etanolu, 30 minut v 90 % etanolu ter dvakrat po 30 minut v 100 % etanolu). Dehidrirane vzorce smo nato 60 minut prepajali v 1:1 mešanici 100 % etanola in umetne smole Epon, pri sobni temperaturi ter jih zatem inkubirali trikrat po 10 minut in enkrat po 30 minut v 100 % Eponu. Vzorce smo nato prenesli v termostat za 5 dni, kjer se je temperatura postopoma stopnjevala (1. dan 35 °C, 2. dan 45 °C, 3. dan 60 °C, 4. dan 70 °C in 5. dan 80 °C). Po polimerizaciji smo z ultramikrotomom (Leica, Nemčija) narezali poltanke rezine debeline 1 mm ter jih obarvali s toluidinskim modrilom. Ko smo slike pregledali s svetlobnim mikroskopom in prešteli število plasti celic, smo izbrali mesto, ki smo ga nadalje narezali na ultratanke

rezine debeline 65 nm, jih prenesli na bakrene mrežice ter kontrastirali 20 minut z nasičeno raztopino uranil acetata pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje mrežic z dH₂O in dodatno 10-minutno kontrastiranje z 10 % raztopino svinčevega citrata pri sobni temperaturi. Preparate smo nato poslikali s presevnim elektronskim mikroskopom Philips CM100 pri napetosti 80 kV.

3.2.16 Statistična analiza

Vse statistične analize so bile izvedene s programsko opremo GraphPad Prism 8, Microsoft Excel ali SigmaPlot 12.0. Normalno porazdeljeni podatki so bili predstavljeni kot povprečje \pm standardna napaka povprečja (SEM). Podatki, ki niso bili normalno porazdeljeni, so bili predstavljeni kot mediana z interkvartilnim razponom ali samo kot mediana. Za statistično analizo podatkov med dvema skupinama smo uporabili parametrični Studentov t-test ali neparametrični Mann-Whitneyjev test. Za statistično analizo podatkov med vsaj tremi eksperimentalnimi skupinami smo uporabili test ANOVA, ki ji je sledil post hoc test Tukey ali test Kruskal-Wallis, ki mu je sledil post hoc test Dunn ali Dunnet. Število bioloških neodvisnih poskusov in število tehničnih ponovitev smo navedli v posameznih metodah, ki so del poglavja 3.2 ter v vseh legendah slik. Statistično značilne razlike med vzorci smo označili z *, kadar je bila p-vrednost manjša ali enaka 0,05.

3.2.17 Izjava o dostopnosti podatkov

Vsi pridobljeni in analizirani podatki, ki podpirajo zaključke doktorske naloge, so na voljo pri avtorju v soglasju z mentorjem.

4 REZULTATI

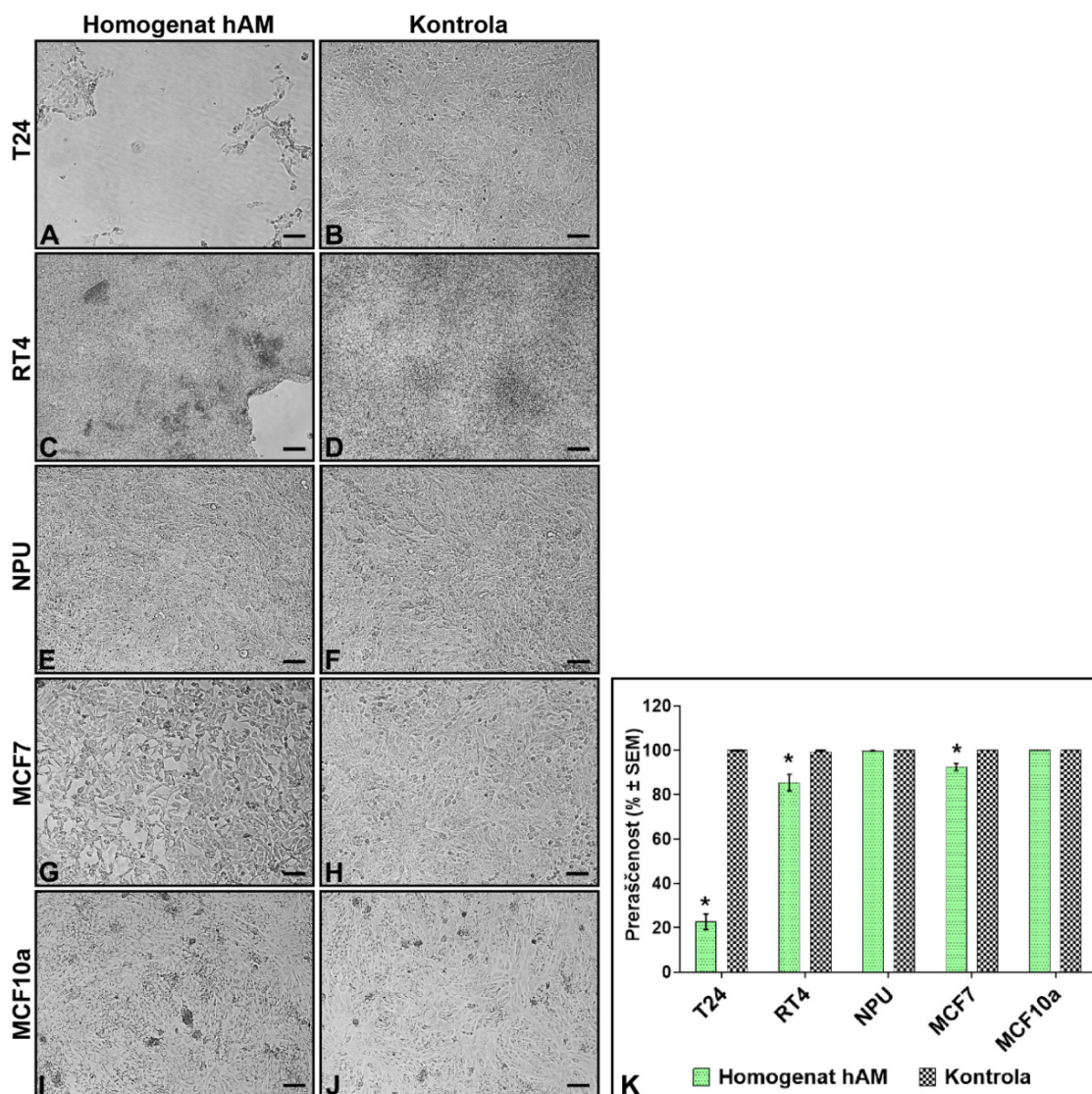
4.1 VPLIV PRIPRAVKOV HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE NA LUŠČENJE NORMALNIH IN RAKAVIH CELIC

4.1.1 Homogenat hAM povzroči luščenje rakavih celic, vendar ne normalnih celic

Da bi preverili vpliv homogenata hAM na luščenje normalnih in rakavih celic, smo konfluentne kulture celic T24, RT4, NPU, MCF7 in MCF10 tretirali 24 ur s homogenatom hAM ali gojiščem (kontrolni vzorci) (Slika 12A–F). Celice smo po zaključenem tretiranju trikrat sprali z gojiščem in ocenili povprečje preraščenosti podlage s celicami.

Ugotovili smo, da je homogenat hAM povzročil luščenje rakavih celičnih linij. Preraščenost podlage z mišično invazivnimi urotelijskimi celicami T24 je namreč znašala $22,7 \pm 3,5$ % (Slika 12A, K). Čeprav v manjši meri, smo zaznali tudi zmanjšanje preraščenosti podlage z neinvazivnimi urotelijskimi celicami papiloma RT4 ($85,0 \pm 3,7$ %; (Slika 12C, K)). Ugotovili smo, da homogenat hAM ne povzroča luščenja normalnih urotelijskih celic NPU (preraščenost podlage 100,0 %; Slika 12E, K). Opazili smo, da poleg vpliva na rakave urotelijske celice, homogenat hAM povzroči luščenje tudi rakavih celic dojke MCF7 (preraščenost podlage $92,5 \pm 1,6$ % (Slika 12G, K)). Tako kot celice NPU so tudi netumorigene celice dojke MCF10, tretirane s homogenatom hAM, ostale pritrjene na podlago (preraščenost podlage 100,0 %; Slika 12I, K). Preraščenost podlage s celicami, ki so bile tretirane z gojiščem brez homogenata hAM, se ni spreminjala in je ostala 100,0 % (Slika 12B, D, H, F, J, K).

Pridobljeni rezultati kažejo, da so mišično invazivne urotelijske celice T24 in urotelijske celice papiloma RT4 bolj občutljive na homogenat hAM kot celice raka dojke (MCF7). Iz tega razloga, smo v naših nadaljnjih raziskavah uporabili biomimetične *in vitro* modele rakavega in normalnega urotelija.



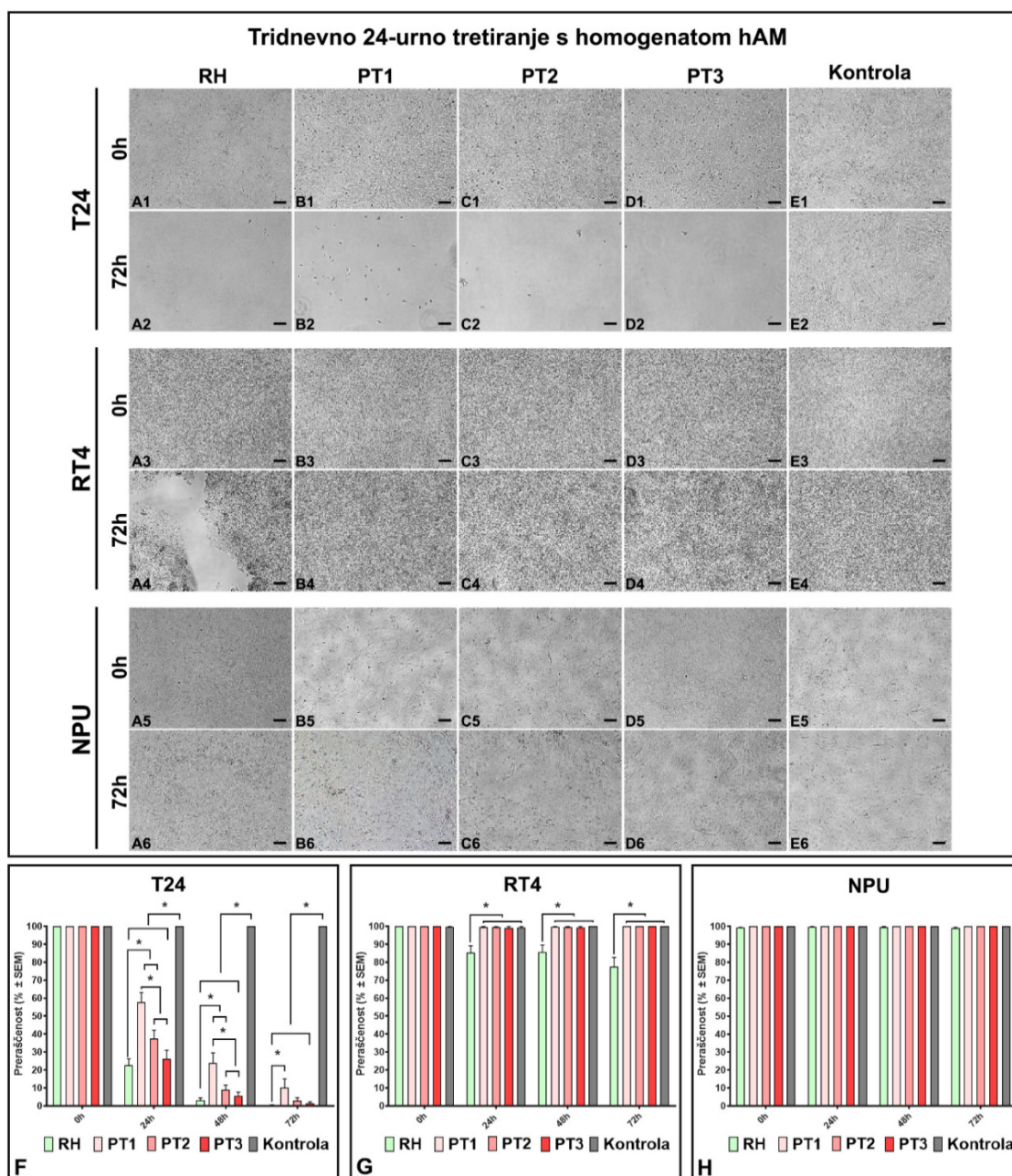
Slika 12. Homogenat hAM povzroča luščenje rakavih celic, ne pa tudi normalnih celic. (A, C, G) 24-urna inkubacija s homogenatom hAM povzroča luščenje rakavih celic T24, RT4 in MCF7 od podlage. (E, F, H, J) Homogenat hAM ne povzroča luščenja normalnih celic NPU in MCF10a. (B, D, F, H, J) Kontrolne celice, ki so bile izpostavljene gojišču brez homogenata hAM, so ostale pritrjene na podlago. (K) Graf predstavlja odstotek priraščanosti podlage ± standardna napaka povprečja (SEM). Rezultate smo pridobili na podlagi 3–6 bioloških vzorcev, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve. Merilca 100 μm . * $p \leq 0,05$.

4.1.2 Način priprave in čas tretiranja s homogenatom hAM vplivata na odstotek odlučenih rakavih urotelijskih celic

Da bi preverili, v kakšni meri vplivata način priprave in čas tretiranja s homogenatom hAM na luščenje celic, smo konfluentne celice T24 (Slika 13A1–E1), RT4 (Slika 13A3–E3) in NPU (Slika 13A5–E5) tretirali z različnimi pripravki homogenata hAM ali gojiščem brez homogenata hAM (kontrolni vzorec) 24 ur tri dni zaporedoma.

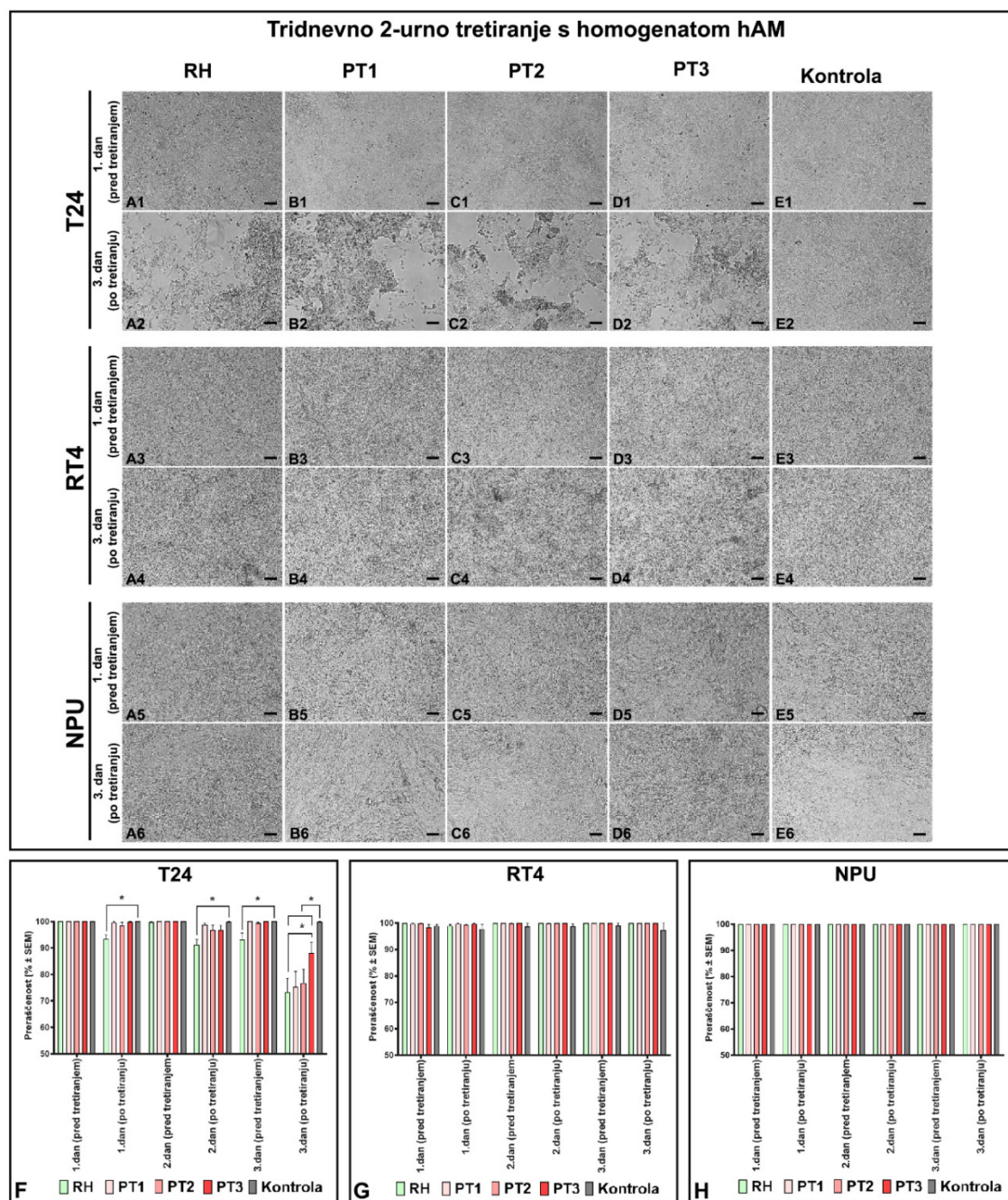
Ugotovili smo, da se je po 24-urnem tretiranju z RH, PT1, PT2 in PT3, površina, preraščena s celicami T24 močno zmanjšala, in sicer na $22,7 \pm 3,5 \%$, $52,6 \pm 5,3 \%$, $37,4$

$\pm 4,8 \%$ oziroma $26,2 \pm 4,8 \%$ (Slika 13F). Po 48-urnem tretiranju z različnimi pripravki homogenata hAM je prišlo do nadaljnjega luščenja celic T24. Preraščenost podlage po tretiranju z RH, PT1, PT2 in PT3 je znašala le $3,1 \pm 1,3 \%$, $1,8 \pm 5,1 \%$, $9,0 \pm 2,6 \%$, oziroma $5,5 \pm 2,2 \%$ (Slika 13F). Največje luščenje celic T24 smo opazili po 72-urnem tretiranju z različnimi pripravki homogenata hAM. Preraščenost podlage s celicami T24, tretiranih z RH (Slika 13A2,F), PT1 (Slika 13B2, F), PT2 (Slika 13C2, F), PT3 (Slika 13D2, F) je znašala $0,5 \pm 0,1 \%$, $10,0 \pm 4,4 \%$, $2,7 \pm 1,7 \%$, oziroma $1,4 \pm 0,8 \%$. Celice T24, ki so bile tretirane z gojiščem brez homogenata hAM, so ostale pritrjene na podlago med celotnim trajanjem tretmaja (72 ur). Kar izstopa na Sliki 13G je to, da je samo homogenat hAM, pripravljen z RH povzročil luščenje urotelijskih celic papiloma RT4. Naši rezultati so pokazali, da se je površina, prekrita s celicami RT4, po 24-urnem, 48-urnem oziroma 72-urnem tretiranju z RH zmanjšala na $85,4 \pm 3,7 \%$, $85,5 \pm 4,0 \%$, $77,5 \pm 5,1 \%$ (Slika 13A4, G). Nasprotno so celice RT4, tretirane s PT1, PT2 in PT3 ostale pritrjene na podlago (Slika 13B4–D4, G), prav tako celice RT4, ki so bile izpostavljene gojišču brez hAM homogenata (Slika 13E4, G) med celotnim trajanjem tretmaja (72 ur). V nasprotju z rakavimi urotelijskimi celicami so normalne urotelijske celice NPU ostale pritrjene na gojitveno površino po 24-urnem, 48-urnem in 72-urnem tretiranju z RH, PT1, PT2, PT3 ali ustreznim gojiščem brez homogenata hAM (Slika 13A6–E6, H).



Slika 13. Način priprave in čas tretiranja s homogenatom hAM vplivata na odstotek odluščenih rakavih urotelijskih celic. (A1–D1; A2–D2) Konfluentne celice T24, ki so izpostavljene različnim pripravkom homogenata hAM so se v veliki meri odluščile od podlage med tridnevno 24-urnim tretiranjem. (A3–A4) Samo homogenat hAM, pripravljen z RH, povzroči luščenje celic RT4 v času tridnevnega 24-urnega tretiranja. (B3–D3; B4–D4) Homogenati hAM, pripravljene s Polytronom ne povzročajo luščenja celic RT4 med celotnim trajanjem tretmaja (24 ur, 3 dni zapored). (A5–D5; A6–D6) Tridnevno 24-urno tretiranje s pripravki homogenata hAM ne vpliva na preraščenost podlage s celicami NPU. (E1–E6) Kontrolne celice T24, RT4 in NPU, ki so tretirane z gojiščem brez homogenata hAM ostanejo pritrjene na podlago po tridnevno 24-urnem tretiranju. (F, G, H) Grafi predstavljajo odstotek preraščenosti podlage s celicami T24, RT4 oz. NPU po tridnevno 24-urnem tretiranju z izvlečkom hAM. Rezultate smo predstavili kot odstotek preraščenosti ± standardna napaka povprečja (SEM). Pridobili smo jih na podlagi treh bioloških vzorcev, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve. Merilca 100 µm. * $p < 0,05$.

Nato smo želeli ugotoviti, ali tudi krajše tretiranje s homogenatom hAM povzroči luščenje celic. V ta namen smo tretirali konfluentne kulture celic T24 (Slika 14A1–E1), RT4 (Slika 14A3–E3) in NPU (Slika 14A5–E5) tri dni zapored po 2 uri s prej omenjenimi pripravki homogenata hAM ali gojiščem brez homogenata hAM. Ugotovili smo, da se je prvi dan po 2-urnem tretiranju z RH, površina s celicami T24 znižala na $93,4 \pm 1,7$ % (Slika 14F). Preraščenost se je zmanjšala tudi drugi dan po 2-urnem tretiranju z RH in je znašala $91,3 \pm 2,0$ % (Slika 14F). Največje zmanjšanje v površini preraščeni s celicami T24 smo opazili tretji dan po tretiranju z RH (Slika 14A2), ko je preraščenost podlage znašala $73,2 \pm 5,3$ % (Slika 14F). Homogenati hAM, pripravljene s Polytronom, so povzročili luščenje celic T24 le tretji dan 2-urnega tretmaja (Slika 14B2–D2). Preraščenost podlage s celicami T24 se je po tretiranju s PT1, PT2 in PT3 znižala na $75,4 \pm 5,8$ %, $76,8 \pm 5,2$ % oziroma $88,2 \pm 4,2$ % (Slika 14F). Celice T24, ki so bile tretirane z gojiščem, so ostale pritrjene na podlago skozi celo obdobje tretiranja (Slika 14E2, F). Ugotovili smo, da uporabljeni tretma ni povzročil luščenja celic RT4. Tako celice RT4, tretirane z RH, PT1, PT2 in PT3 (Slika 14A4–D4, G) kot tudi celice RT4, izpostavljene gojišču brez hAM homogenata (Slika 14E4), so ostale pritrjene na podlago. Preraščenost podlage s celicami RT4 se ni zmanjšala pod 97,8 % v nobenem trenutku med celotnim obdobjem 2-urnega tretiranja z različnimi pripravki homogenata hAM ali gojiščem (Slika 14G). Podobno kot pri tridnevem 24-urnem tretiranju, tudi tridnevno 2-urno tretiranje s pripravki homogenata hAM ali gojiščem, ni vplivalo na preraščenost podlage s celicami NPU (Slika 14A6–E6, H).



Slika 14. Tridnevno 2-urno tretiranje z različnimi pripravki homogenata hAM povzroča luščenje mišično invazivnih urotelijskih celic, vendar ne vpliva na luščenje urotelijskih celic papiloma in normalnih urotelijskih celic. (A1–D1; A2–D2) Različni pripravki homogenata hAM, povzročijo luščenje celic T24 tretji dan od začetka 2-urnega tretiranja. (A3–D3; A4–D4) Tridnevno 2-urno tretiranje s pripravki homogenata hAM ne vpliva na preraščenost podlage s celicami RT4. (A5–D5; A6–D6) Celice NPU ostanejo pritrjene na podlago po tridnevnem 2-urnem tretiranju z različnimi pripravki homogenata hAM. (E1–E6) Kontrolne celice T24, RT4 in NPU, ki so izpostavljene gojišču brez homogenata hAM ostanejo pritrjene na podlago po tridnevnem 2-urnem tretiranju. (F, G, H) Grafi predstavljajo odstotek preraščenosti podlage s celicami T24, RT4 oz. NPU po tridnevnem 2-urnem tretiranju z izvlečkom hAM. Rezultate smo predstavili kot odstotek preraščenosti ± standardna napaka povprečja (SEM). Pridobili smo jih na podlagi

treh bioloških vzorcev, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve. Merilca 100 μm . * $p \leq 0,05$.

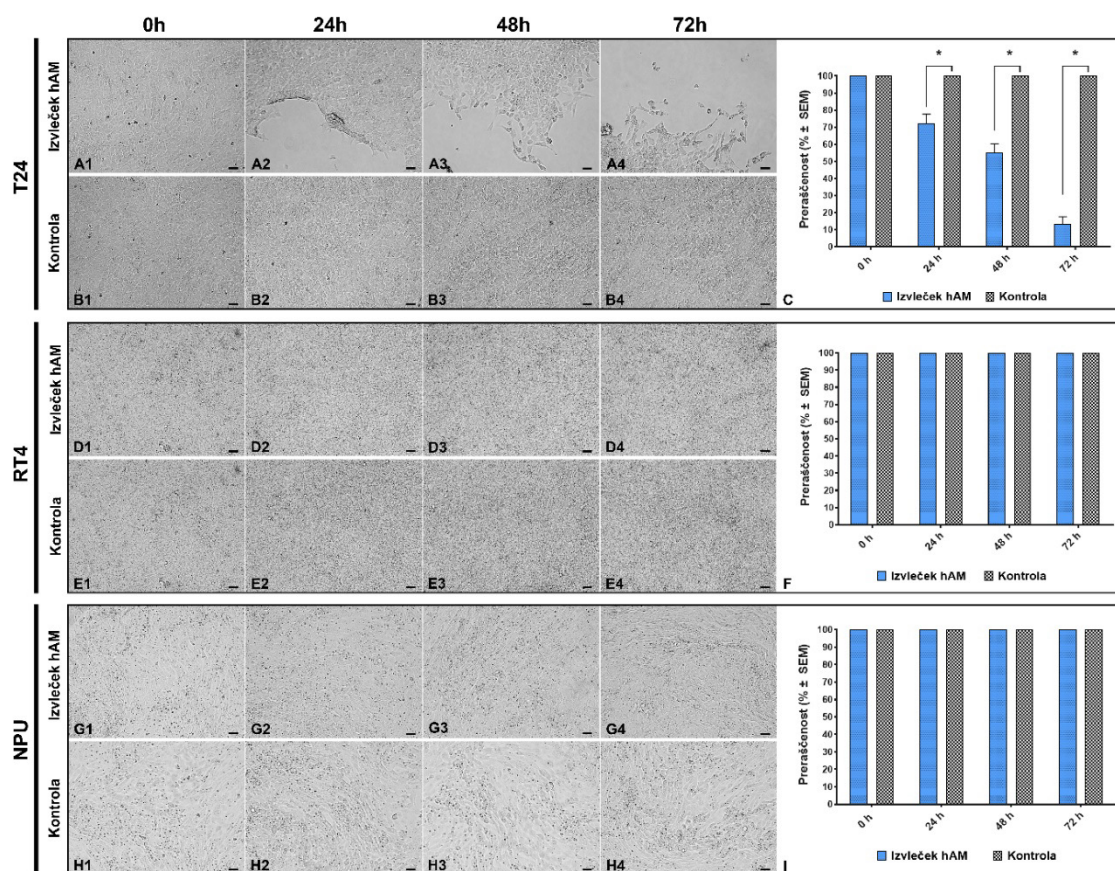
S temi eksperimenti smo dokazali, da je vpliv homogenata hAM različen na različne tipe rakavih celic ter, da je luščenje rakavih celic odvisno tudi od načina priprave homogenata hAM in časa tretiranja. Homogenat hAM, pripravljen z RH, je povzročil največji odstotek luščenja mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in urotelijskih celic papiloma RT4 in smo ga zato uporabljali za vse nadaljnje poskuse.

4.1.3 Izvleček hAM povzroči luščenje mišično invazivnih urotelijskih celic po 24-urni inkubaciji

Da bi proučili, ali je luščenje rakavih celic posledica vezave sestavin homogenata hAM na površino celic ali topnih snovi, ki jih izloča hAM, smo rakave in normalne urotelijske celice tretirali tri dni zaporedoma po 24 ur z izvlečkom hAM.

Ugotovili smo, da se je preraščenost podlage s celicami T24 zmanjšala na $72,3 \pm 5,4 \%$, $55,0 \pm 5,3 \%$ in $13,3 \pm 4,3 \%$ po 24-urnem, 48-urnem oziroma 72-urnem tretiranju z izvlečkom hAM (Slika 15A1–A4, C). Po drugi strani, tridnevno 24-urno tretiranje z izvlečkom hAM, ni vplivalo na preraščenost podlage s celicami RT4 (Slika 15D1–D4, F) ali NPU (Slika 15G1–G4, I). Celice T24 (Slika 15B1–B4), RT4 (Slika 15E1–D4) in NPU (Slika 15H1–H4), tretirane z gojiščem brez izvlečka hAM, so ostale med tridnevnim 24-urnim tretiranjem pritrjene na podlago.

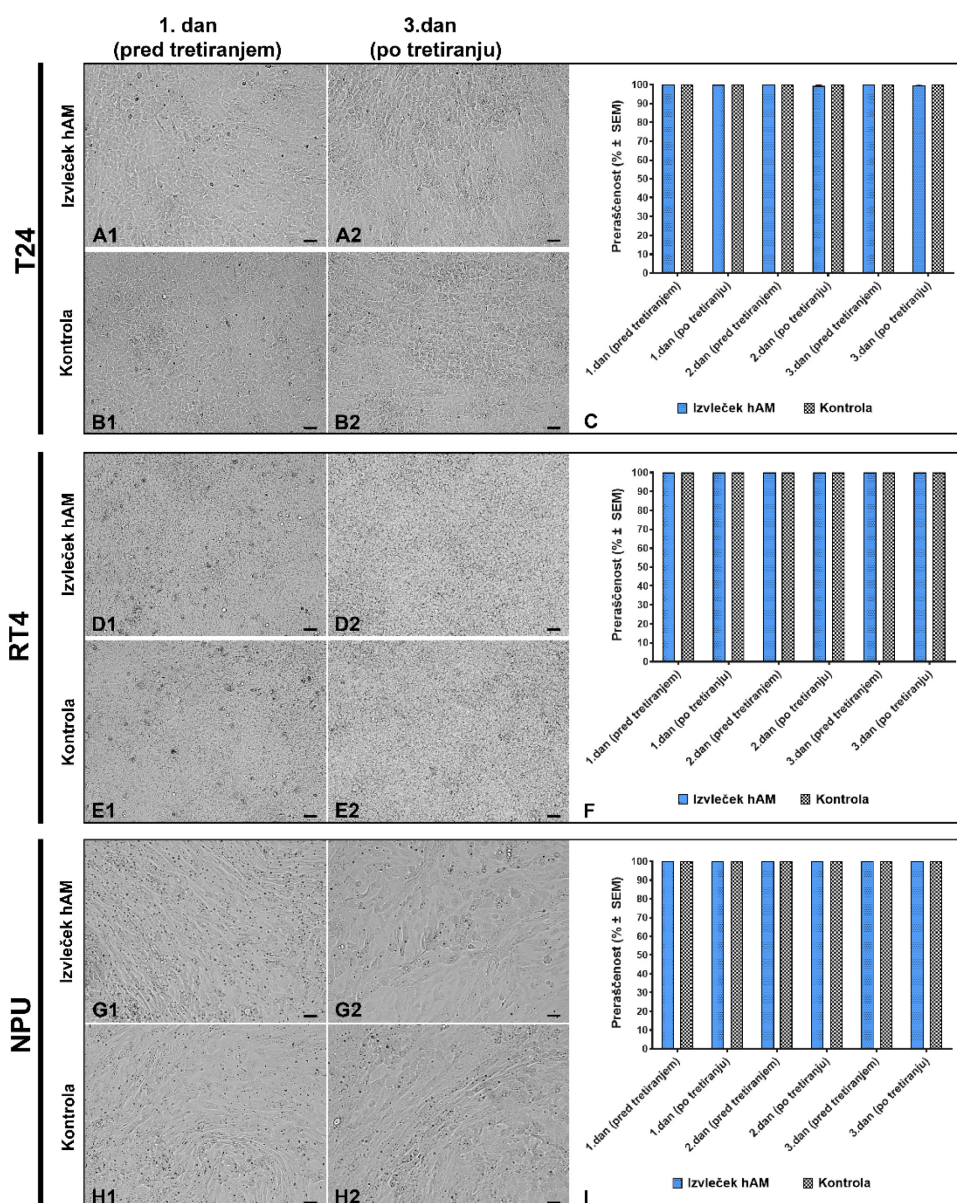
Tridnevno 24-urno tretiranje z izvlečkom hAM



Slika 15. Izvleček hAM povzroči luščenje mišično invazivnih urotelijskih celic T24 po 24-urnem, tridnevnem tretiranju. (A1–A4) Celice T24, tretirane z izvlečkom hAM, se odluščijo od podlage med tridnevним 24-urnim tretiranjem. (D1–D4) Celice RT4, tretirane z izvlečkom hAM, ostanejo pritrjene na podlago med celotnim obdobjem tridnevnega 24-urnega tretiranja. (G1–G4) Tridnevno 24-urno tretiranje z izvlečkom hAM ne vpliva na preraščenost podlage s celicami NPU. (B1–B4; E1–E4; H1–H4) Kontrolne celice T24, RT4 in NPU, tretirane z gojiščem brez izvlečka hAM, ostanejo pritrjene na podlago po tridnevnem 24-urnem tretiranju. (C, F, I) Grafi predstavljajo odstotek preraščenosti podlage s celicami T24, RT4 oz. NPU po 24-urnem tretiranju z izvlečkom hAM, tri dni zapored. Rezultate smo predstavili kot odstotek preraščenosti \pm standardna napaka povprečja (SEM). Pridobili smo jih na podlagi treh bioloških vzorcev, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve. Merilca 50 μ m. * $p \leq 0,05$.

Nato smo ovrednotili, ali 2-urno tretiranje tri dni zapored z izvlečkom hAM povzroči luščenje celic. Ugotovili smo, da se preraščenost podlage s celicami T24 (Slika 16A1–B2, C), RT4 (Slika 16D1–E2, F) in NPU (Slika 16G1–H2, I), tretiranih z izvlečkom kot tudi z gojiščem, ni spreminjala med celotnim obdobjem 2-urnega tretiranja (100,0 %).

Tridnevno 2-urno tretiranje z izvlečkom hAM

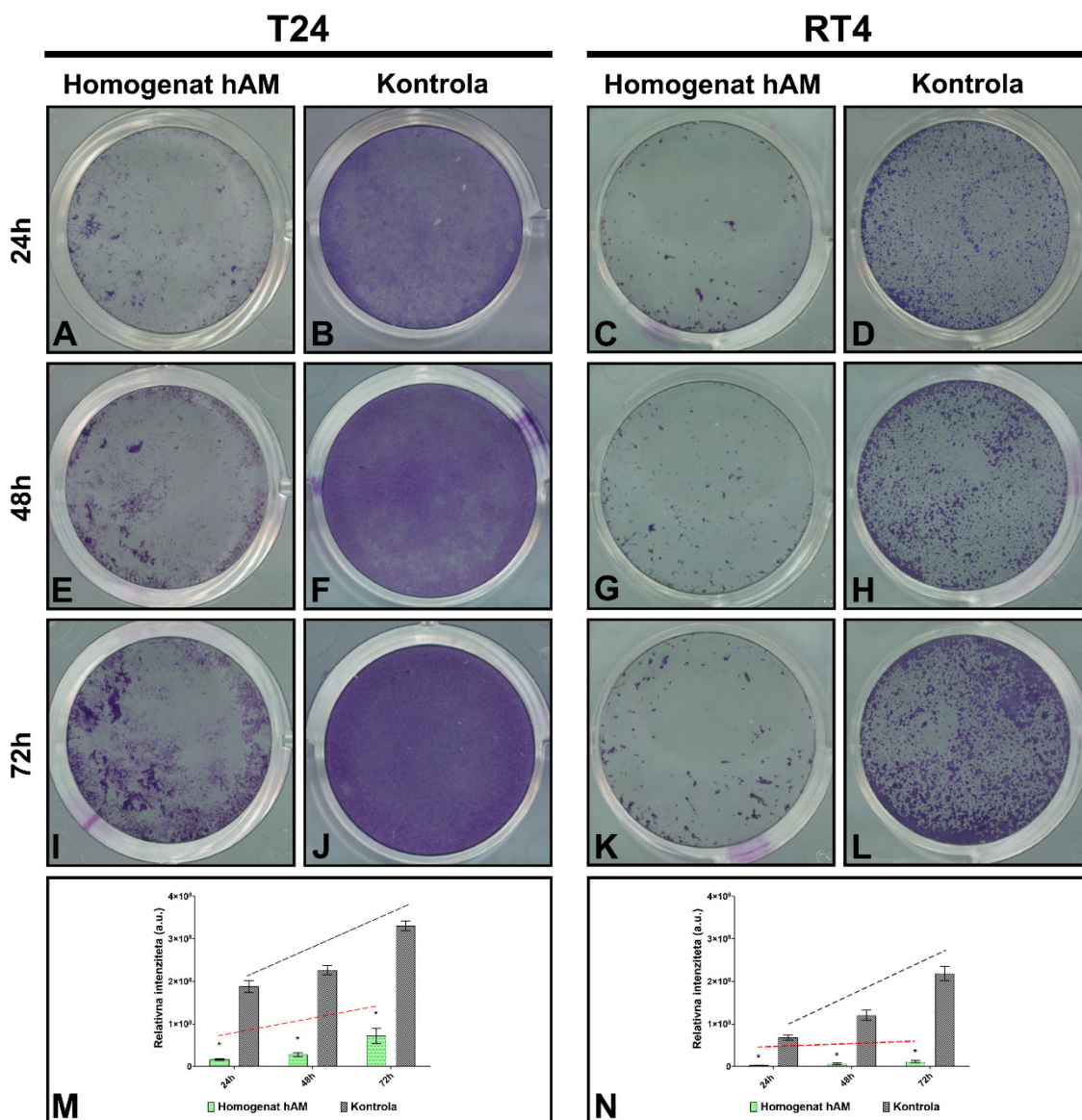


Slika 16. Tridnevno 2-urno tretiranje z izvlečkom hAM ne povzroča luščenja rakavih in normalnih urotelijskih celic. (A1–H2) Celice T24, RT4 in NPU so ostale pritrjene na podlago med celotnim obdobjem 2-urnega tretiranja z izvlečkom hAM. (C, F, I) Grafi predstavljajo odstotek preraščenosti celic T24, RT4 oz. NPU po 2-urnem tretiranju z izvlečkom hAM tri dni zapored. Rezultate smo predstavili kot odstotek preraščenosti ± standardna napaka povprečja (SEM). Pridobili smo jih na podlagi treh bioloških vzorcev, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve. Merilca 50 μ m. * $p \leq 0,05$.

4.2 VPLIV HOMOGENATA HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE NA PRITRJEVANJE IN PROLIFERACIJO RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC

4.2.1 Homogenat hAM zmanjša zmožnost pritrjevanja rakavih urotelijskih celic

Da bi proučili učinek homogenata hAM na sposobnost pritrjevanja rakavih urotelijskih celic, smo celice T24 in RT4 tri dni tretirali s homogenatom hAM ali gojiščem brez hAM (kontrolni vzorci). Z merjenjem intenzitete obarvanja pritrjenih celic smo pokazali, da se celice T24 in RT4 pritrjujejo na površino gojivne posodice po 24-urnem gojenju v homogenatu hAM v bistveno manjšem deležu, kot celice, gojene v gojišču brez homogenata hAM (Slika 17A–D, M, N). Nato smo še 48 in 72 ur spremljali dinamiko rasti celic T24 in RT4 po njihovi pritrditvi (Slika 17E–N). S primerjanjem naklonov regresijskih premic smo dokazali, da homogenat hAM upočasni dinamiko rasti rakavih urotelijskih celic in tako prepreči njihovo razraščanje po podlagi. Ta zaviralni učinek homogenata hAM je bil še zlasti opazen pri neinvazivnih urotelijskih celicah papiloma RT4.



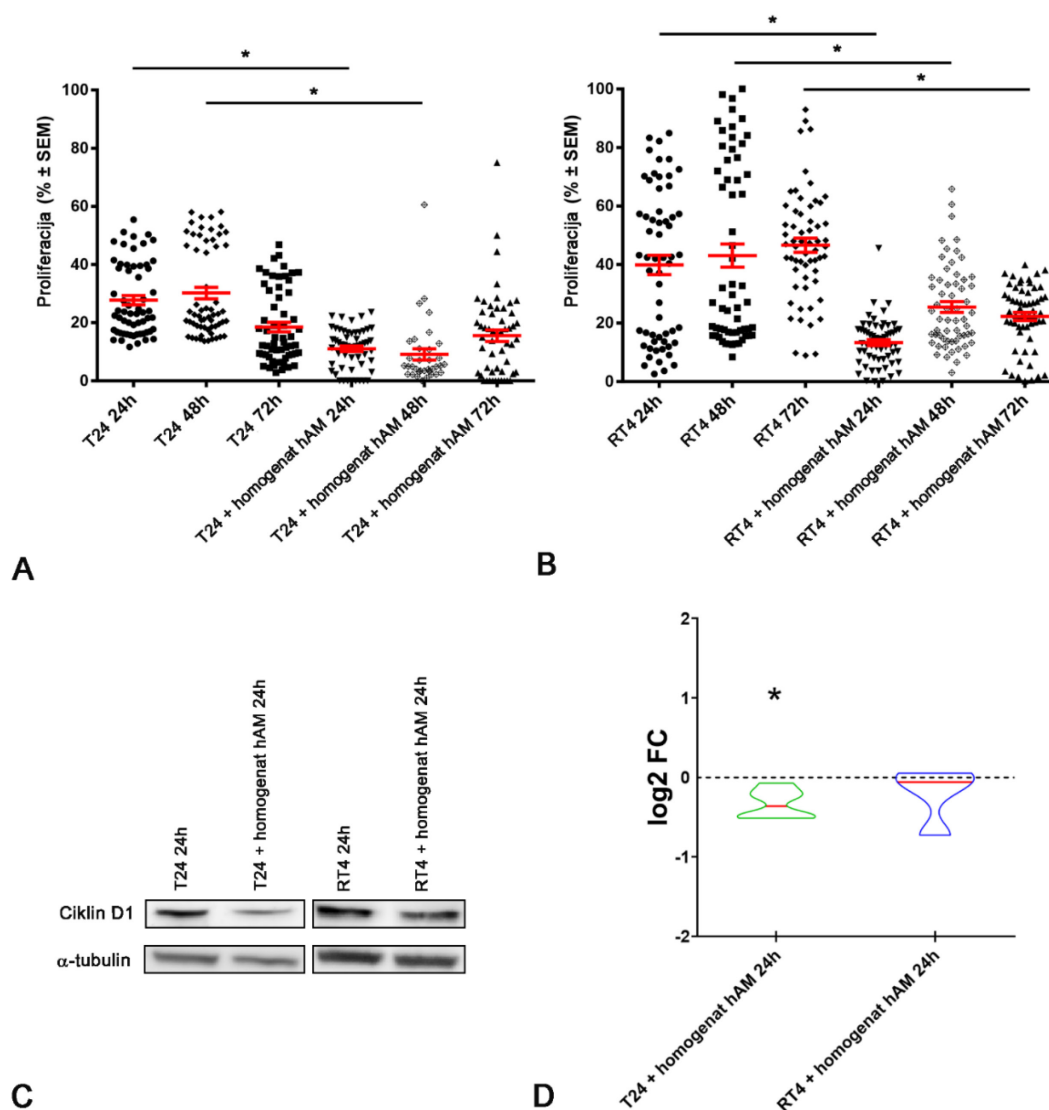
Slika 17. Homogenat hAM zmanjša zmožnost pritrjevanja in dinamiko rasti rakavih urotelijskih celic. (A–D) Celice T24 in RT4, ki so nasajene v homogenatu hAM se pritrdijo na podlago v bistveno manjšem deležu kot kontrolne celice, ki so bile nasajene v gojišču brez homogenata hAM. (E–H) Celice T24 in RT4, ki so nasajene in gojene v homogenatu hAM 48 ur, rastejo počasneje kot kontrolne celice, ki so nasajene in gojene v gojišču brez homogenata hAM. (I–L) Celice T24 in RT4, ki so nasajene in gojene v homogenatu hAM neprekinjeno 72 ur, rastejo bistveno počasneje kot kontrolne celice, ki so nasajene in gojene v gojišču brez homogenata hAM. (M, N) Grafa predstavljata relativno intenziteto obarvanja pritrjenih celic T24 oz. RT4. Regresijska premica (črna črtkana črta) kontrolnih vzorcev, ki so tretirani z gojiščem, ima strmejši nagib navzgor v primerjavi z regresijsko premico tretiranih vzorcev (rdeča črtkana črta). Rezultate smo predstavili kot povprečno relativno intenziteto \pm standardna napaka povprečja (SEM). Rezultate smo pridobili na podlagi treh bioloških ponovitev, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve. * $p \leq 0,05$.

4.2.2 Homogenat hAM zavira proliferacijo rakavih urotelijskih celic preko regulacije izražanja ciklina D1

Z namenom, da bi ugotovili vpliv homogenata hAM na proliferacijo rakavih urotelijskih celic, smo konfluentne celice T24 in RT4 izpostavili homogenatu hAM ali samemu gojišču (kontrolni vzorci) tri zaporedne dni (brez vmesnega menjavanja homogenata hAM ali gojišča). Proliferacijo rakavih urotelijskih celic smo ocenili z uporabo EdU. Gre za analog timidina, ki se med sintezo DNA vgrajuje v njeno strukturo.

Ugotovili smo, da je homogenat hAM zavrl proliferacijo mišično invazivnih urotelijskih celic T24 v prvih 24 urah za 16,7 %, po 48 urah za 21,1 % ter po 72 urah za 3,0 % v primerjavi s kontrolo ob istih časovnih točkah (Slika 18A). Prav tako smo ugotovili, da je homogenat hAM upočasnil proliferacijo celic papiloma RT4, in sicer v prvih 24 urah za 26,6 %, po 48 urah za 17,6 % ter po 72 urah za 24,3 % v primerjavi s kontrolo ob istih časovnih točkah (Slika 18B).

S prenosom Western smo ugotovili, da se je znižalo izražanje ciklina D1 v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24 po 24-urnem tretiranju s homogenatom hAM (Slika 18C,D). Prav tako je v celicah papiloma RT4 prišlo do manjšega znižanja v izražanju ciklina D1, vendar razlika ni bila statistično značilna v primerjavi s kontrolnimi celicami, ki so bile tretirane z gojiščem brez homogenata hAM (Slika 18C, D).



Slika 18. Homogenat hAM zavira proliferacijo mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in urotelijskih celic papiloma RT4 ter zmanjša izražanje ciklina D1 pri prvih. (A) Proliferacija mišično invazivnih urotelijskih celic T24 se močno zniža po 24-, 48- in 72-urnem tretiranju s homogenatom hAM. (B) Proliferacija urotelijskih celic papiloma RT4 se značilno zniža po 24-, 48- in 72-urnem tretiranju s homogenatom hAM. Vsaka točka na grafih A in B prikazuje odstotek proliferirajočih celic na vidno polje/sliko. Rdeča barva na stolpcnem grafu predstavlja povprečje \pm standardna napaka povprečja (SEM). Rezultate proliferacije smo pridobili na podlagi treh bioloških ponovitev, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve. (C) Analiza izražanje ciklina D1 in α -tubulina s prenosom Western po 24-urni inkubaciji celic T24 in RT4 s homogenatom hAM ali gojiščem (kontrolni vzorci) brez pripravkov hAM. (D) Kvantifikacija podatkov prenosa Western na sliki 17C. Izražanje ciklina D1 se značilno zniža v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24, ki so tretirane s homogenatom hAM. Prav tako homogenat hAM zmanjša izražanje ciklina D1 v urotelijskih celicah papiloma RT4, a v manjši meri kot v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24. Izražanje ciklina D1 smo normalizirali na vsebnost α -tubulina. Poleg tega smo izražanje ciklina D1 v tretiranih vzorcih normalizirali glede na kontrolne vzorce ter te vrednosti predstavili kot kratnik dvojiškega logaritma spremembe (angl. *log₂ fold change (log₂FC)*). Vsaka točka na grafu predstavlja vrednost enega biološkega vzorca. Polna rdeča črta (D) označuje mediano. Črtkana črna črta predstavlja normalizirano vrednost kontrolnega vzorca. Rezultate prenosa Western smo pridobili na podlagi 4–6 bioloških ponovitev, znotraj katerih je bila izvedena ena tehnična ponovitev. * $p < 0,05$.

4.3 VPLIV PRIPRAVKOV HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE NA MIGRACIJO IN INVAZIJO NORMALNIH IN RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC

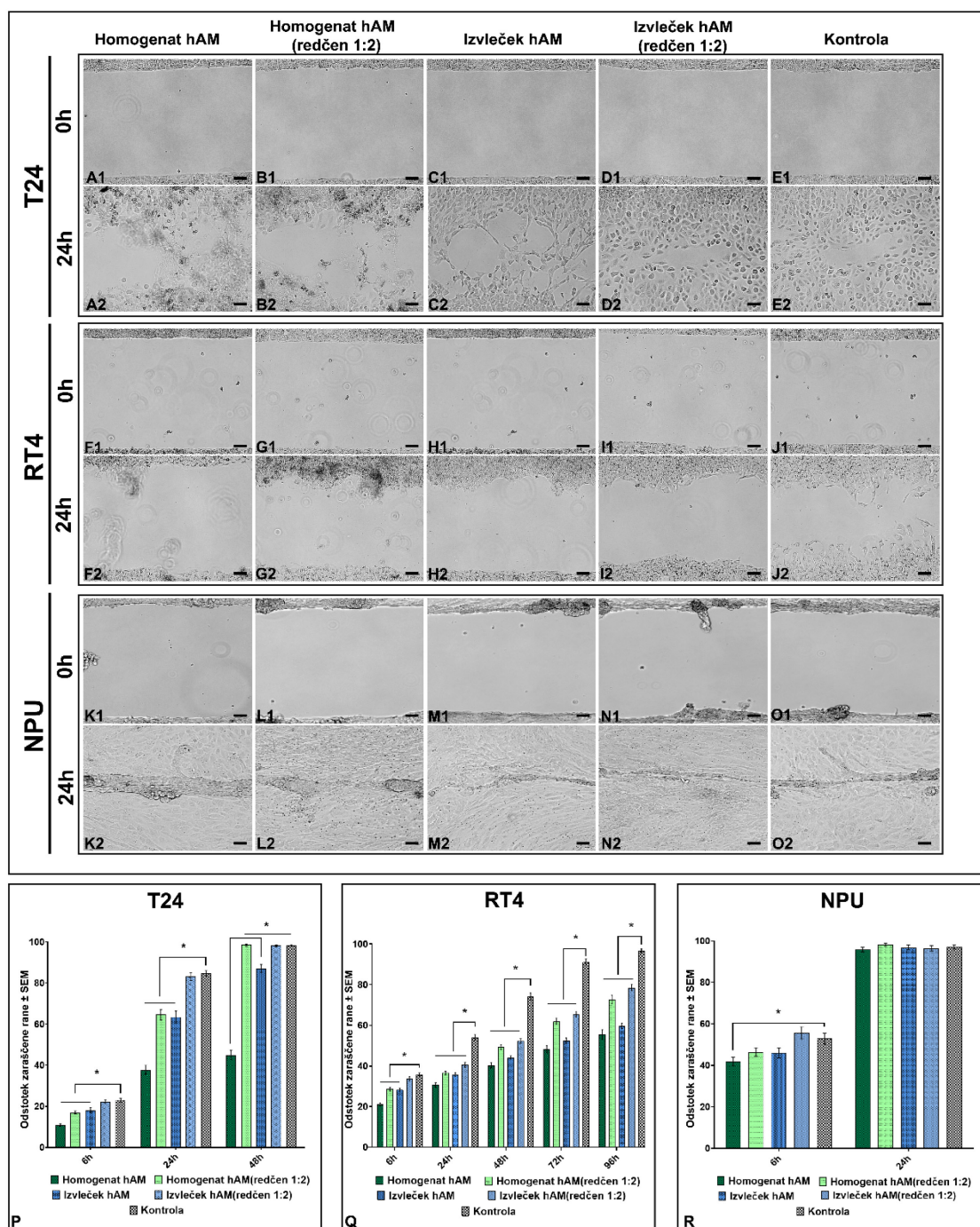
4.3.1 Homogenat in izvleček hAM zavirata migracijo rakavih urotelijskih celic

S spremljanjem preraščanja rane smo ocenili stopnjo migracije celic T24, RT4 in NPU po tretiranju z različnimi pripravki hAM ali gojiščem (kontrolni vzorci). Ugotovili smo, da se je rana po 6-urnem tretiranju celic T24 s homogenatom hAM, redčenim homogenatom, izvlečkom hAM ali redčenim izvlečkom hAM, zarasla za $10,9 \pm 0,6$ %, $17,0 \pm 0,7$ %, $18,0 \pm 1,5$ % oziroma $22,1 \pm 1,0$ % glede na površino rane ob času 0 ur (Slika 19F). Odstotek zaraščene rane pri kontrolnih celicah T24, ki so bile 6 ur tretirane z gojiščem brez pripravkov hAM, je bil $23,0 \pm 0,9$ (Slika 19F). Po 24-urnem tretiranju celic T24 z različnimi pripravki hAM smo opazili podoben trend zaraščanja rane. Rana pri celicah T24, ki so bile 24 ur izpostavljene homogenatu hAM (Slika 19A1–A2, F), redčenemu homogenatu hAM (Slika 19B1–B2, F), izvlečku hAM (Slika 19C1–C2, F) ali redčenemu izvlečku hAM (Slika 19D1–D2, F) se je zarasla za $37,7 \pm 2,2$ %, $64,6 \pm 2,5$ %, $63,5 \pm 2,9$ % oziroma $83,1 \pm 2,0$ % glede na površino rane ob času 0 ur. Odstotek zaraščene rane pri kontrolnih celicah T24, ki so bile 24 ur tretirane z gojiščem brez pripravkov hAM (Slika 19E1–E2, F), je bil $84,7 \pm 1,3$. Po 48-urnem tretiranju celic T24 s homogenatom hAM, redčenim homogenatom, izvlečkom hAM, redčenim izvlečkom hAM ali gojiščem se je rana zarasla za $45,0 \pm 2,3$ %, $98,5 \pm 0,5$ %, $87,1 \pm 1,9$ %, $98,2 \pm 0,3$ % oziroma $98,4 \pm 0,3$ % (Slika 19F) glede na površino rane ob času 0 ur.

Podoben zaviralni učinek na zaraščanje rane po tretiranju z različnimi pripravki hAM smo opazili pri celicah RT4. Ugotovili smo, da se je rana po 6-urnem tretiranju celic RT4 s homogenatom hAM, redčenim homogenatom, izvlečkom hAM, redčenim izvlečkom hAM ali gojiščem zarasla za $21,0 \pm 0,7$ %, $28,6 \pm 0,9$ %, $28,3 \pm 0,8$ %, $33,6 \pm 1,0$ % oziroma $35,8 \pm 0,8$ % (Slika 19L) glede na površino rane ob času 0 ur. Rana pri celicah RT4, ki so bile 24 ur izpostavljene homogenatu hAM (Slika 19G1–G2, L), redčenemu homogenatu hAM (Slika 19H1–H2, L), izvlečku hAM (Slika 19I1–I2, L) ali redčenemu izvlečku hAM (Slika 19J1–J2, L) se je zarasla za $30,6 \pm 1,2$ %, $36,5 \pm 0,9$ %, $35,7 \pm 0,9$ % oziroma $40,6 \pm 1,2$ % glede na površino rane ob času 0 ur. Odstotek zaraščene rane pri kontrolnih celicah RT4, ki so bile 24 ur tretirane z gojiščem brez pripravkov hAM (Slika 19K1–K2, L), je bil $54,1 \pm 1,5$. Po 48-urnem tretiranju celic RT4 s homogenatom hAM, redčenim homogenatom, izvlečkom hAM, redčenim izvlečkom hAM ali gojiščem se je rana zarasla za $40,3 \pm 1,4$ %, $49,3 \pm 1,1$ %, $44,1 \pm 0,8$ %, $52,3 \pm 1,1$ % oziroma $74,2 \pm 1,8$ % (Slika 19L) glede na površino rane ob času 0 ur. Polega tega smo ugotovili, da se je rana po 72-urnem tretiranju celic RT4 s homogenatom hAM, redčenim homogenatom, izvlečkom hAM, redčenim izvlečkom hAM ali gojiščem zarasla za $48,3 \pm 1,7$ %, $62,0 \pm 1,4$ %, $52,5 \pm 1,2$ %, $65,4 \pm 1,3$ % oziroma $91,0 \pm 1,6$ % (Slika 19L) glede na površino rane ob času 0 ur. Po 96-urnem tretiranju celic RT4 s homogenatom hAM, redčenim homogenatom, izvlečkom hAM, redčenim izvlečkom hAM ali gojiščem se je rana zarasla

za $55,5 \pm 2,4$ %, $72,7 \pm 2,2$ %, $59,8 \pm 1,4$ %, $78,6 \pm 1,5$ % oziroma $96,6 \pm 1,0$ % (Slika 19L) glede na površino rane ob času 0 ur.

Pri celicah NPU je bil učinek različnih pripravkov na migracijo drugačen. Ugotovili smo, da je bil odstotek zaraščene rane po 6-urnem tretiranju s homogenatom hAM, redčenim homogenatom, izvlečkom hAM oziroma redčenim izvlečkom hAM (Slika 19R) $41,8 \pm 2,1$ %, $46,4 \pm 2,1$ %, $46,0 \pm 2,4$ % in $55,6 \pm 3,0$ % glede na površino rane ob času 0 ur. Po drugi strani je odstotek zaraščene rane pri kontrolnih celicah NPU, ki so bile 6 ur tretirane z gojiščem brez pripravkov hAM (Slika 19E1–E2, R), znašal $52,9 \pm 2,7$. Po 24-urnem tretiranju z različnimi pripravki ali gojiščem je zaviralni učinek na migracijo celic NPU izzvenel. Naši rezultati so pokazali, da se je rana po 24-urnem tretiranju celic NPU s homogenatom hAM (Slika 19M1–M2, R), redčenim homogenatom (Slika 19N1–N2, R), izvlečkom hAM (Slika 19O1–O2, R), redčenim izvlečkom hAM (Slika 19P1–P2, R) ali gojiščem brez pripravkov hAM (Slika 19Q1–Q2, R) zarasla za $95,8 \pm 1,2$ %, $98,1 \pm 0,7$ %, $96,8 \pm 1,2$ %, $96,3 \pm 1,5$ % oziroma $97,0 \pm 1,0$ % glede na površino rane ob času 0 ur.



Slika 19. Homogenat in izvleček hAM zavirata migracijo rakavih urotelijskih celic. (A1–E2) Celice T24, tretirane 24 ur z različnimi pripravki hAM imajo zmanjšano stopnjo migracije v primerjavi s kontrolnimi celicami T24, ki so tretirane z gojiščem brez pripravkov hAM. (F1–J2) Celice RT4, ki so 24 ur izpostavljene različnim pripravkom hAM migrirajo počasneje kot kontrolne celice RT4, ki so tretirane z gojiščem. (K1–O2) Celice NPU, tretirane z različnimi pripravki hAM ali gojiščem (kontrolni vzorci) prerastejo rano v 24 urah. (P, Q, R) Na grafih je prikazano povprečje zaraščanja rane v različnih časovnih točkah. Rezultate smo predstavili kot odstotek zaraščanja rane \pm standardna napaka povprečja (SEM) glede na površino rane ob času 0 ur. Rezultate smo pridobili na podlagi 3–6 bioloških ponovitev, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve. Merilca 50 μ m. * $p < 0,05$.

4.3.2 Homogenat in izvleček hAM vplivata na način migracije rakavih urotelijskih celic ter na njihovo morfologijo

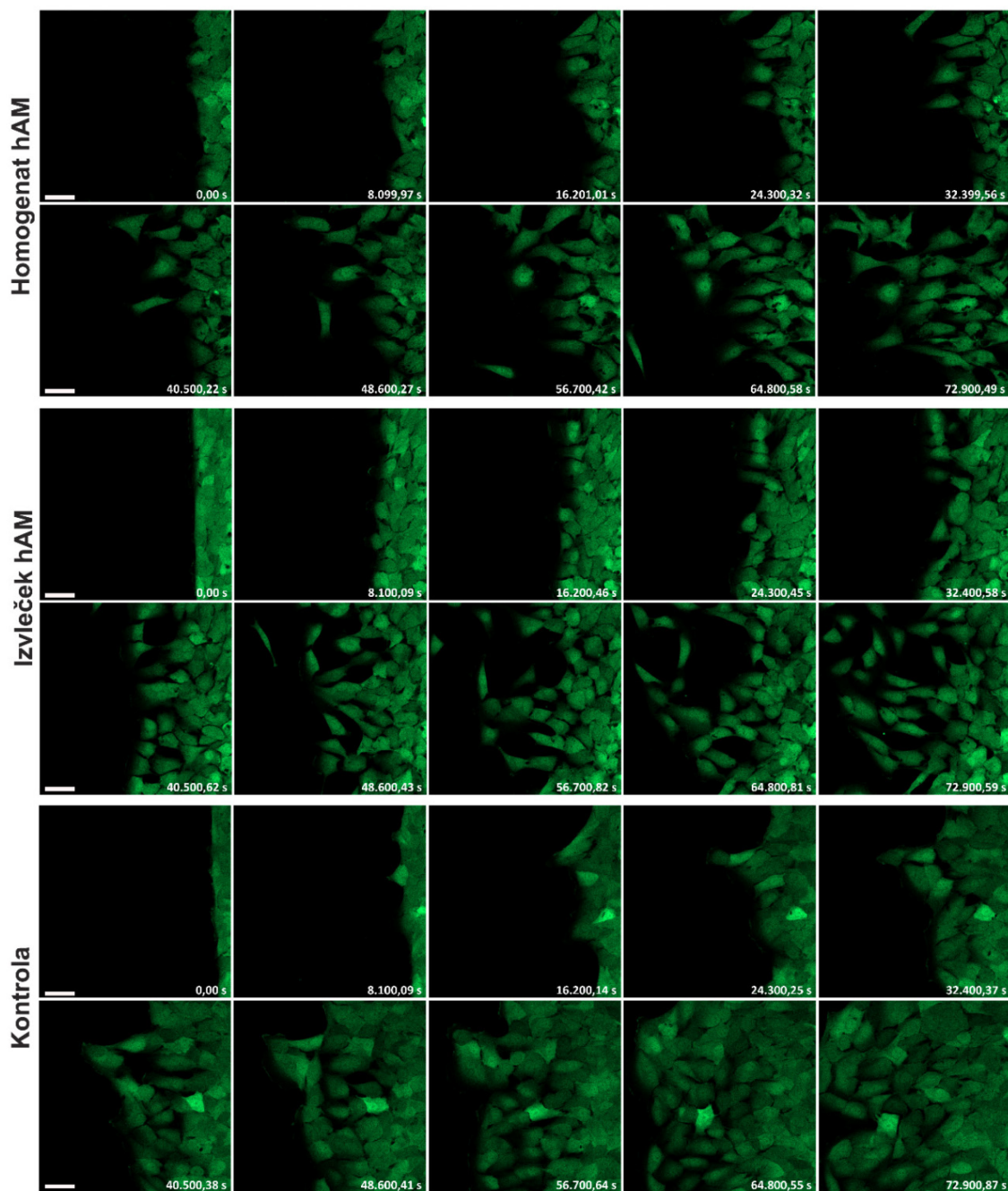
Ko smo ugotovili, da homogenat in izvleček hAM zavirata migracijo rakavih urotelijskih celic, smo skušali preveriti, ali pripravka iz hAM vplivata na način migracije in morfologijo migrirajočih celic. Zaraščanje rane v kulturi celic T24-eGFP, RT4 in NPU smo spremljali s konfokalnim mikroskopom v realnem času.

Ugotovili smo, da so celice T24-eGFP, ki so bile tretirane s homogenatom hAM, migrirale posamezno, ena za drugo. Imele so podolgovato obliko, med njimi so bili večji medcelični prostori. Podobno situacijo opazili tudi pri celicah T24-eGFP, ki so bile tretirane z izvlečkom hAM. Te celice so prav tako migrirale posamezno, vendar med njimi ni bilo večjih medceličnih prostorov. Nasprotno so kontrolne celice T24-eGFP, ki so bile tretirane z gojiščem brez pripravkov hAM, ohranile značilno mezenhimsko kolektivno migracijo. Pri njih nismo opazili medceličnih prostorov. Predvidevamo, da so bili med temi celicami medcelični stiki ohranjeni skozi celotno obdobje migracije (Slika 20).

Celice RT4, ki so bile tretirane s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem, so migrirale kolektivno ter ohranile epiteljsko morfologijo. Pri kontrolnih celicah RT4, ki so bile tretirane z gojiščem brez pripravkov hAM, smo opazili več lamelopodijev in filopodijev vzdolž vodilnega roba migrirajočih celic kot pri celicah RT4, ki so bile tretirane s homogenatom ali izvlečkom hAM (Slika 21).

Pripravki iz hAM niso vplivali na morfologijo in način migracije celic NPU, saj so celice ohranile epiteljsko morfologijo ter pri uporabljenih tretmajih migrirale kolektivno (Slika 22).

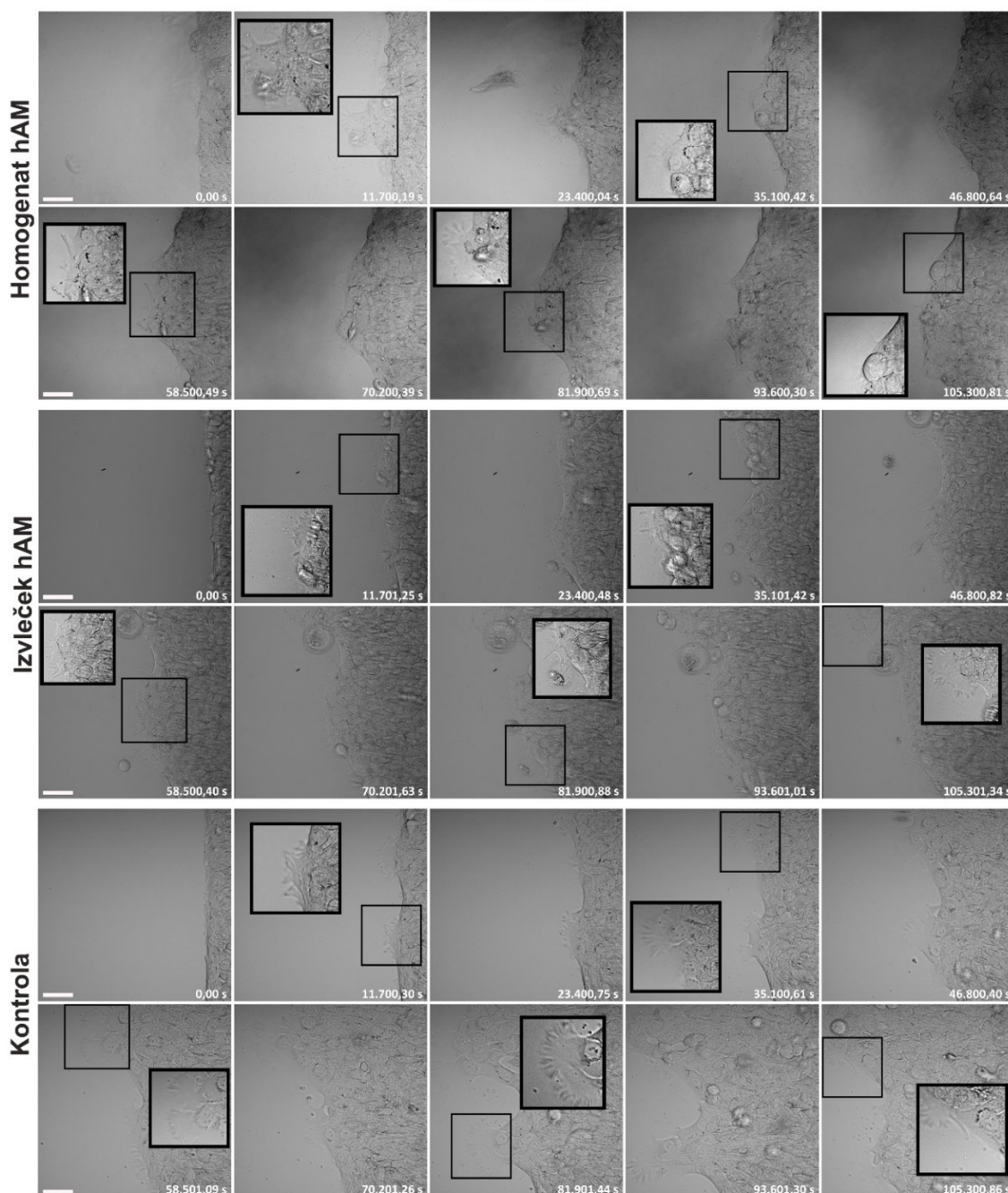
Celice T24-eGFP



Slika 20. Homogenat in izvleček hAM vplivata na način migracije mišično invazivnih urotelijskih celic. Celice T24-eGFP, tretirane s homogenatom hAM, migrirajo individualno, imajo podolgovato obliko, vidni so večji medcelični prostori. Celice T24-eGFP, tretirane z izvlečkom hAM, migrirajo posamezno, med celicami je manj medceličnih prostorov. Za kontrolne celice T24-eGFP, izpostavljene gojišču je značilna mezenhimska kolektivna celična migracija. Med njimi ni medceličnih prostorov, saj so celice med

seboj dobro povezane. Merilca 50 μ m.

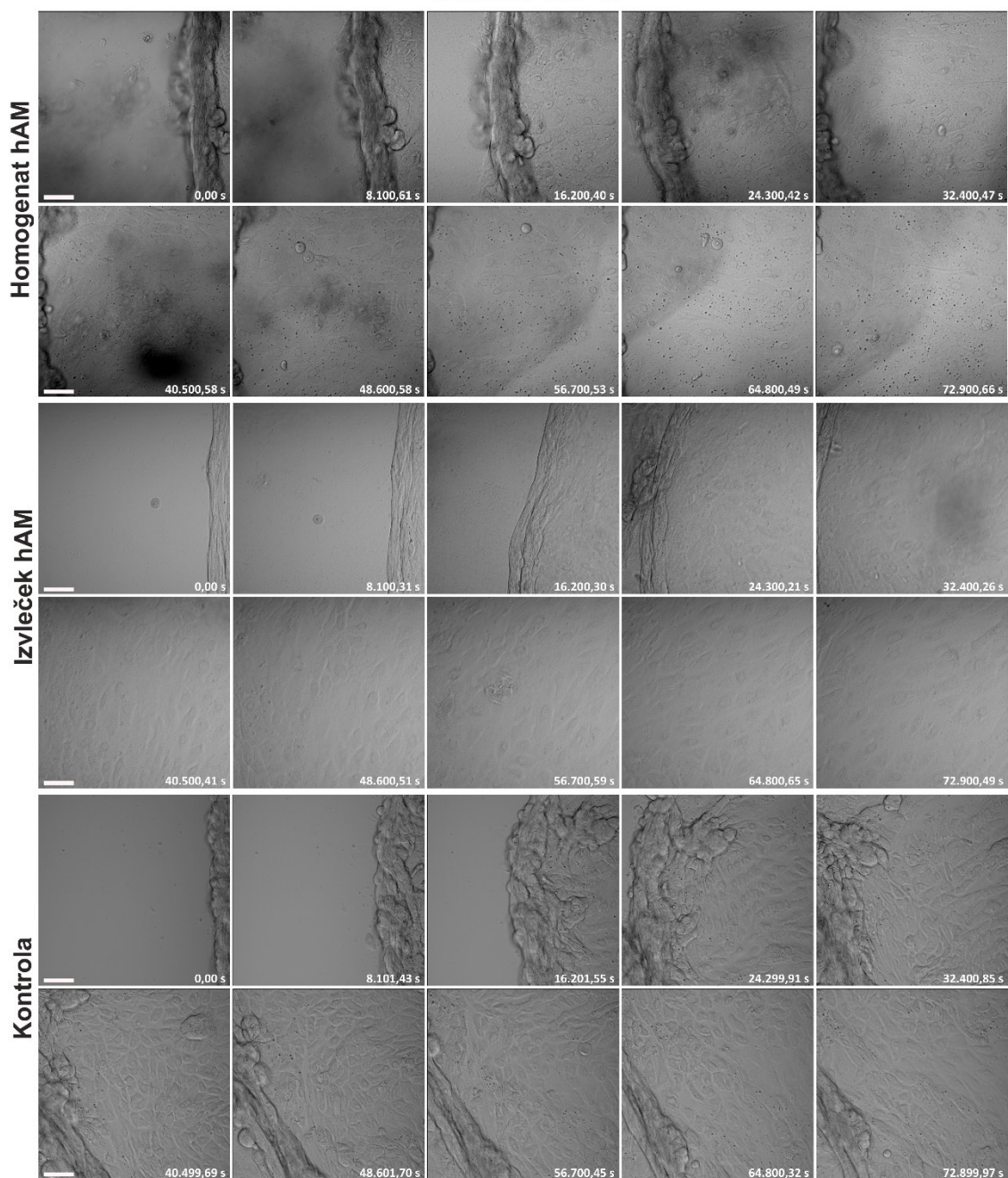
Celice RT4



Slika 21. Homogenat in izvleček hAM zmanjšata količino lamelopodijev in filopodijev vzdolž vodilnega roba urotelijskih celic papiloma. Celice RT4, tretirane s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem (kontrolni vzorci), ohranijo epitelijsko kolektivno migracijo. Kontrolne celice RT4, tretirane z gojiščem, vsebujejo več filopodijev vzdolž vodilnega roba, v primerjavi s celicami RT4, tretiranimi s pripravki hAM. Za njih je značilna epitelijska kolektivna migracija. Črni okvirji kažejo povečave manjših

črnih okvirjev. Merilca 50 μ m.

Celice NPU

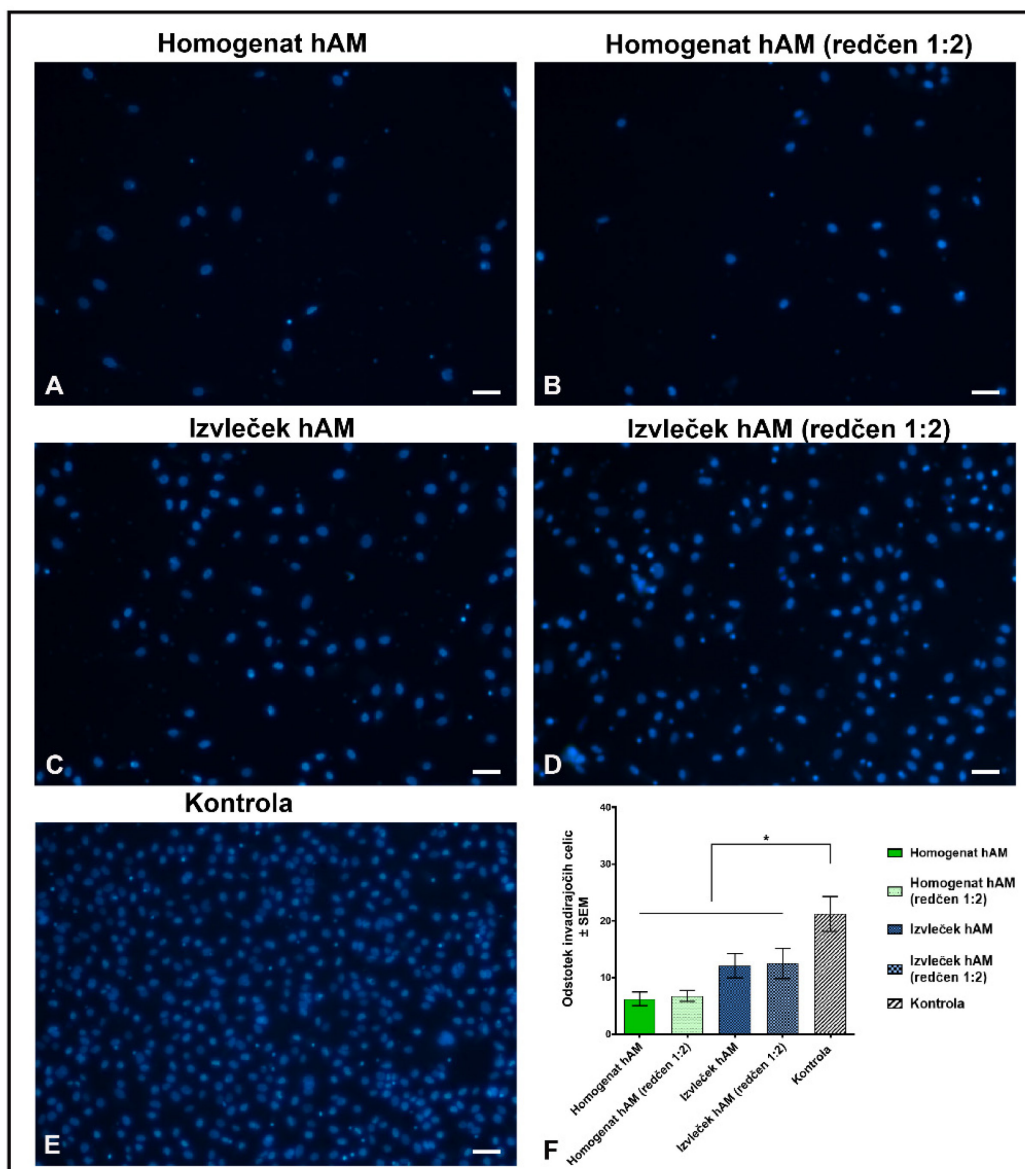


Slika 22. Homogenat in izvleček hAM ne vplivata na morfologijo ter način migracije normalnih urotelijskih celic. Za celice NPU, tretirane s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem (kontrolni vzorci), je značilna epitelijska kolektivna migracija. Merilca 50 μ m.

4.3.3 Homogenat in izvleček hAM zmanjšata stopnjo invazije mišično invazivnih urotelijskih celic

Vpliv pripravkov hAM na invazivnost mišično invazivnih celic T24 smo ocenili z *in vitro* testom invazivnosti. Ugotovili smo, da različni pripravki hAM zmanjšajo stopnjo invazije

rakavih celic T24. Povprečni odstotek invadirajočih celic T24 je namreč znašal $6,2 \pm 1,2$ % po tretiranju s homogenatom hAM (Slika 23A, F); $6,74 \pm 0,96$ % po tretiranju z redčenim homogenatom hAM (Slika 23B, F); $12,1 \pm 2,2$ % po tretiranju z izvlečkom hAM (Slika 23C, F) in $12,5 \pm 2,7$ % po tretiranju z redčenim izvlečkom hAM (Slika 23, F). Najbolj invadirajoče celice T24 so bile tiste, ki so bile izpostavljene gojišču brez pripravkov hAM (kontrolni vzorci) (Slika 23E,F), in sicer povprečje invadirajočih celic je znašalo $21,2 \pm 3,1$ %.



Slika 23. Homogenat in izvleček hAM zmanjšata stopnjo invazije mišično invazivnih urotelijskih celic. (A-E) Celice T24, izpostavljene 20 ur različnim pripravkom hAM, invadirajo v spodnji del porozne membrane v manjšem deležu kot kontrolne celice T24, tretirane z gojiščem. (F) Na grafu je prikazano povprečje invadirajočih celic (%) ± standardna napaka povprečja (SEM). Rezultate smo pridobili na podlagi štirih bioloških ponovitev, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve. Merilca 50 μ m. * $p \leq 0,05$.

4.4 VLOGA PRIPRAVKOV IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE PRI URAVNAVANJU SPECIFIČNIH MOLEKUL SIGNALNIH POTI, KI VODIJO EPITELIJSKO-MEZENHIMSKI PREHOD RAKAVIH IN NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC

4.4.1 Homogenat in izvleček hAM zmanjšata izražanje FAK in nekaterih genov in proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR v rakavih urotelijskih celicah

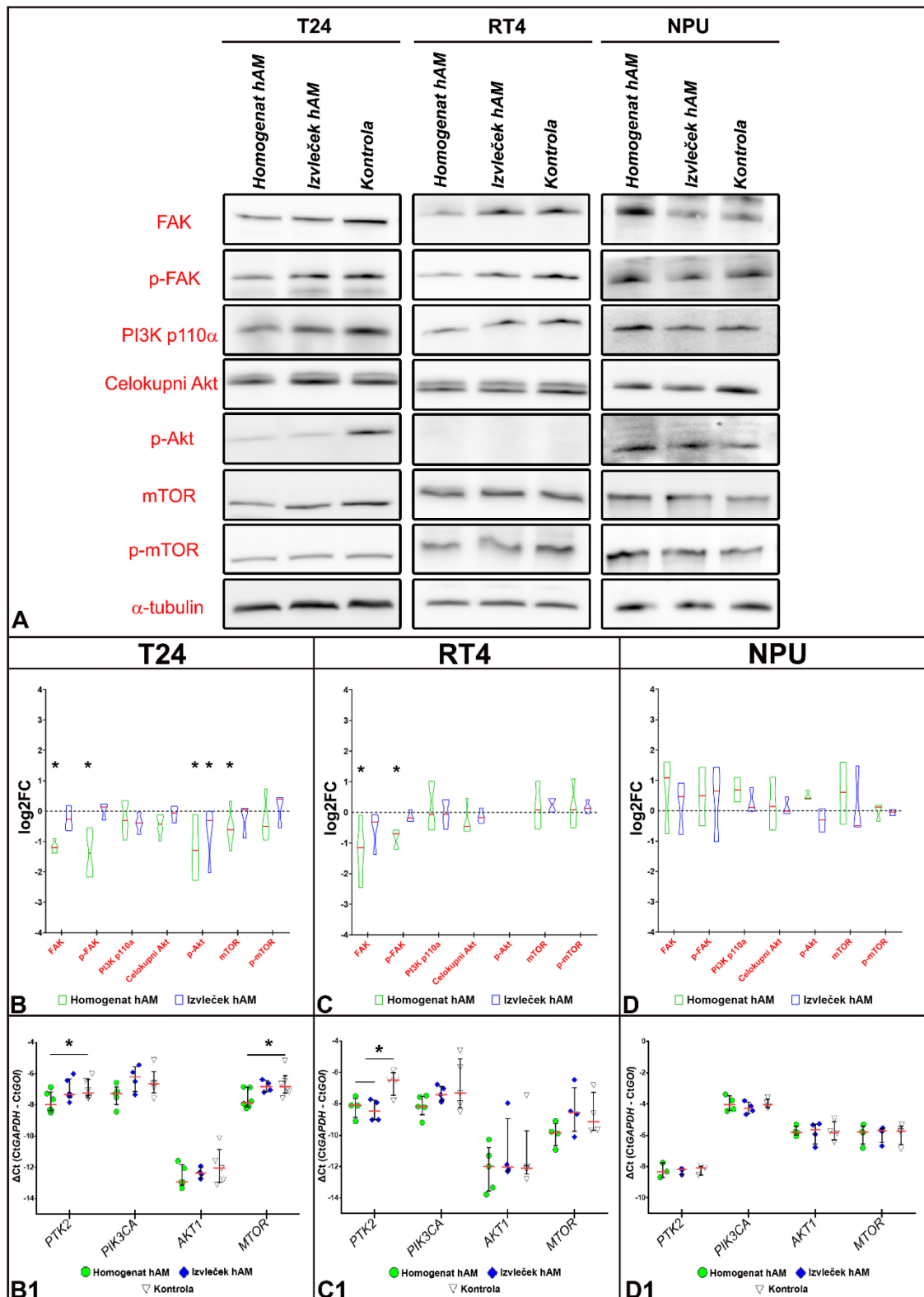
S prenosom Western smo najprej ovrednotili učinek pripravkov hAM na izražanje proteinov FAK, PI3K p110 α , Akt, mTOR in količine fosforiliranih proteinov FAK, Akt ter mTOR. Nato smo z metodo qPCR preverili, ali homogenat in izvleček hAM vplivata tudi na izražanje genov, ki nosijo zapis za te proteine. V ta namen smo celice T24, RT4 in NPU tretirali 24 ur s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem (kontrolni vzorci).

S prenosom Western smo pokazali, da se je značilno znižalo izražanje proteinov FAK in mTOR v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24, ki so bile tretirane s homogenatom hAM. Čeprav v manjši meri, smo zaznali tudi znižanje v izražanju proteina PI3K p110 α in celokupnih proteinov Akt. Ugotovili smo, da je homogenat hAM značilno zmanjšal količino fosforiliranih proteinov FAK, Akt in v manjši meri tudi fosforiliranega proteina mTOR. Prav tako se je rahlo znižalo izražanje proteina FAK v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24, ki so bile tretirane z izvlečkom hAM. Poleg tega je izvleček hAM zmanjšal izražanje proteina PI3K p110 α , ni pa vplival na izražanje celokupnih proteinov Akt in proteina mTOR. Izvleček hAM je značilno zmanjšal količino fosforiliranega proteina Akt, medtem ko je količina fosforiliranega proteina FAK in mTOR ostala nespremenjena (Slika 24A, B). Z metodo qPCR smo ugotovili, da se je značilno znižalo izražanje genov *PTK2* in *MTOR* v celicah T24, ki so bile tretirane s homogenatom hAM. Prav tako smo opazili, da je homogenat hAM v manjši meri zmanjšal izražanje genov *PIK3CA* in *AKT1*. Nasprotno izvleček hAM ni vplival na izražanje genov *PTK2*, *PIK3CA*, *AKT1* in *MTOR* v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24 (Slika 24B1).

V urotelijskih celicah papiloma RT4 je prišlo do znižanja tako v izražanju kot tudi v fosforilaciji proteina FAK po 24-urnem tretiranju s homogenatom hAM (Slika 24A,C). Ugotovili smo, da je homogenat hAM rahlo zmanjšal izražanje celokupnega Akt v urotelijskih celicah papiloma RT4. Zmanjšanje izražanja FAK in p-FAK smo opazili tudi po tretiranju celic RT4 z izvlečkom hAM, vendar razlika ni bila statistično značilna v primerjavi s kontrolnimi celicami RT4, ki so bile tretirane z gojiščem. Poleg tega smo opazili, da sta homogenat hAM in izvleček hAM rahlo znižala izražanje celokupnih proteinov Akt, vendar ne statistično značilno. Niti homogenat hAM niti izvleček hAM nista vplivala na izražanje proteinov PI3K p110 α in mTOR ter na fosforilacijo slednjega.

V urotelijskih celicah papiloma RT4 nismo zaznali fosforilirane oblike Akt. Z metodo qPCR smo potrdili, da sta homogenat in izvleček hAM značilno znižala izražanje gena *PTK2* v urotelijskih celicah papiloma RT4. Prav tako smo opazili, da je samo homogenat hAM v manjši meri zmanjšal izražanje genov *PIK3CA* in *MTOR*, vendar razlika v izražanju teh genov ni bila statistično v primerjavi s kontrolnimi celicami RT4, ki so bile tretirane z gojiščem brez vsebnosti pripravkov iz hAM. Poleg tega smo ugotovili, da niti homogenat hAM niti izvleček hAM nista vplivala na izražanje gena *AKT1* (Slika 24C1)

Homogenat hAM in izvleček hAM sta imela ravno nasprotni učinek pri normalnih celicah v primerjavi z rakavimi urotelijskimi celicami. Dokazali smo, da sta pri normalnih urotelijskih celicah homogenat in izvleček rahlo povišala izražanje proteinov FAK in PI3K p110 α , vendar nista vplivala na izražanje celokupnih proteinov Akt. Ugotovili smo tudi, da je pri normalnih urotelijskih celicah homogenat hAM rahlo povišal količino fosforiliranega proteina Akt in izražanje proteina mTOR. Nasprotno so celice NPU, tretirane z izvlečkom hAM imele rahlo znižano raven fosforiliranega proteina Akt in izražale nekoliko manj proteina mTOR, a ta razlika ni bila statistično značilna v primerjavi s kontrolnimi celicami NPU, ki so bile tretirane z gojiščem. Prav tako smo opazili, da niti homogenat hAM niti izvleček hAM nista vplivala na količino fosforiliranega proteina mTOR (Slika 24A, D). Z metodo qPCR smo dokazali, da homogenat in izvleček hAM nista vplivala na izražanje genov *PTK2*, *PIK3CA*, *AKT1* in *MTOR* v normalnih urotelijskih celicah NPU (Slika 24D1).



Slika 24. Homogenat in izvleček hAM v rakavih urotelijskih celicah zmanjšata izražanje FAK in nekaterih genov in proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR. (A–D) Analiza izražanja proteinov FAK, PI3K p110α, Akt, mTOR, α-tubulin in količine fosforiliranih proteinov FAK, Akt in mTOR z metodo Western po 24-urni inkubaciji celic T24, RT4 in NPU s homogenatom hAM, izvlečkom

hAM ali gojiščem brez pripravkov hAM (kontrolni vzorci). Homogenat hAM zniža izražanje proteinov FAK, PI3K p110 α , celokupnih Akt, mTOR ter zmanjša količino fosforiliranih proteinov FAK, Akt in mTOR v mišično invazivnih celicah T24. Izvleček hAM zmanjša izražanje proteinov FAK in PI3K p110 α ter zniža količino fosforiliranega proteina Akt v mišično invazivnih celicah T24. Izražanje FAK in p-FAK sta zmanjšana po tretiranju urotelijskih celic papiloma RT4 s homogenatom hAM, v manjši meri pa tudi z izvlečkom hAM. Homogenat in izvleček hAM rahlo znižata izražanje celokupnih proteinov Akt v urotelijskih celicah papiloma RT4. Za razliko od rakavih urotelijskih celic, homogenat in izvleček hAM ne znižata izražanja in količino fosforiliranih proteinov FAK, PI3K p110 α , Akt in mTOR. Izražanje in količino fosforilirane oblike tarčnih proteinov smo normalizirali na vsebnost α -tubulina. Polega tega smo izražanje in količino fosforilirane oblike tarčnih proteinov v tretiranih vzorcih normalizirali glede na kontrolne vzorce ter te vrednosti predstavili kot kratnik dvojiškega logaritma spremembe (angl. *log₂ fold change (log₂FC)*). (B1–C1) Analiza izražanja genov *PTK2*, *PIK3CA*, *AKT1* in *MTOR* z metodo qPCR po 24-urni inkubaciji celic T24, RT4 in NPU s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem brez pripravkov hAM (kontrolni vzorci). Samo homogenat hAM zniža izražanje genov *PTK2*, *PIK3CA*, *AKT1* in *MTOR* v mišično invazivnih celicah T24. Homogenat in izvleček hAM močno znižata izražanje gena *PTK2* v urotelijskih celicah papiloma RT4. Homogenat hAM v manjši meri zmanjša izražanje genov *PIK3CA* in *MTOR*. Homogenat in izvleček hAM ne vplivata na izražanje genov *PTK2*, *PIK3CA*, *AKT1* in *MTOR* v celicah NPU. Izražanje tarčnih genov (angl. *gene of interest (GOI)*) smo normalizirali na vsebnost *GAPDH*. Rezultate qPCR smo predstavili kot Δ Ct (Ct*GAPDH* – Ct*GOI*). Rezultate prenosa Western (A–D) smo pridobili na osnovi 3-6 bioloških ponovitev, znotraj katerih je bila izvedena ena tehnična ponovitev. Rezultate qPCR (B1–D1) smo pridobili na osnovi 3–5 bioloških vzorcev, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve. Črtkana črna črta (B–D) predstavlja normalizirano vrednost kontrolnega vzorca. (B1–D1) Vsaka točka na grafih predstavlja vrednost enega biološkega vzorca. Polna rdeča črta (B–D1) označuje mediano, polne črne črte (B1–D1) predstavljajo interkvartilni razpon. * $p \leq 0,05$.

4.4.2 Homogenat humane amnijske membrane v rakavih urotelijskih celicah zmanjša izražanje proteinov, ki so vpleteni v reorganizacijo aktinskega citoskeleta

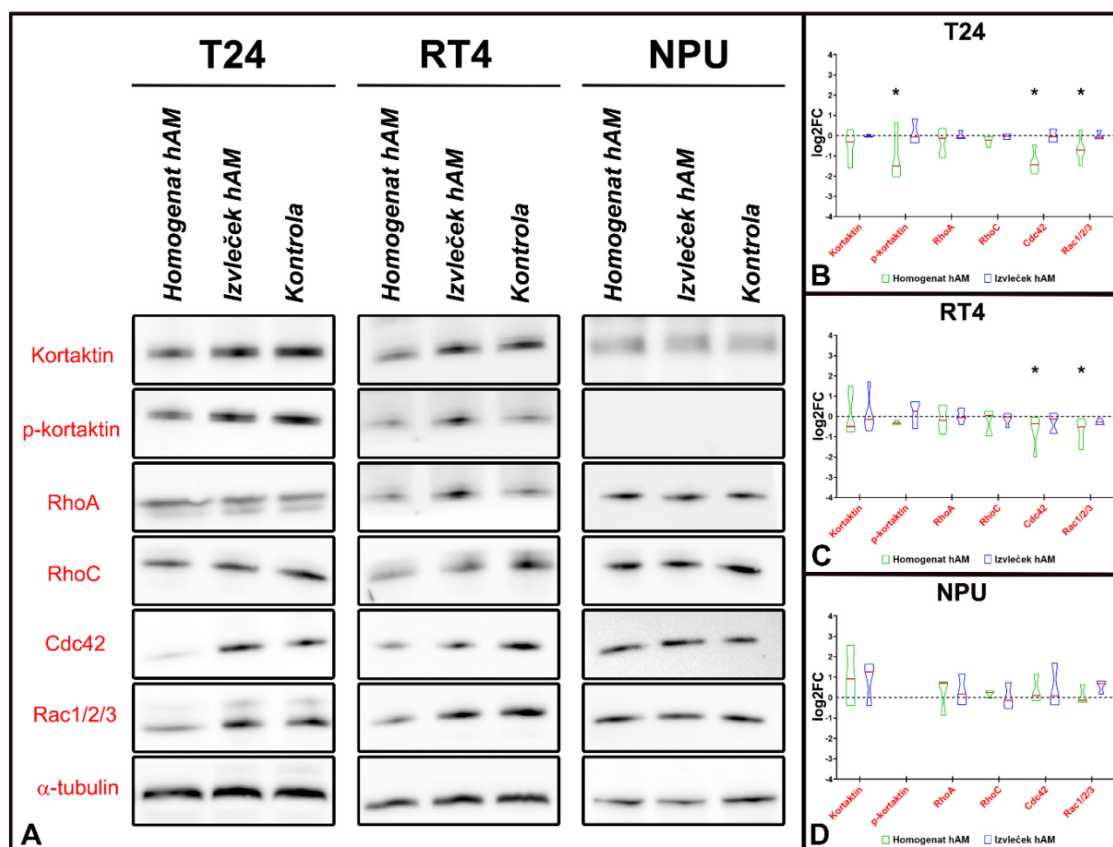
S prenosom Western smo proučevali vpliv homogenata in izvlečka hAM na izražanje kortaktina, p-kortaktina, RhoA, RhoC, Cdc42 ter Rac1/2/3. To so proteini, ki so vpleteni v reorganizacijo aktinskega citoskeleta rakavih in urotelijskih celic.

Dokazali smo, da je homogenat hAM značilno znižal izražanje proteinov Cdc42 in Rac1/2/3 v celicah T24. Prav tako smo dokazali, da je homogenat hAM zmanjšal količino fosforiliranega kortaktina in v manjši meri tudi njegovo izražanje. Izvleček hAM v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24 ni vplival na izražanje proteinov, ki sodelujejo pri reorganizaciji aktinskega citoskeleta (Slika 25A, B).

V urotelijskih celicah papiloma RT4 je prišlo do rahlega znižanja v izražanju kortaktina po 24-urnem tretiranju s homogenatom hAM. Ugotovili smo, da je homogenat hAM značilno zmanjšal izražanje Cdc42 in Rac1/2/3. Izvleček hAM je le v manjši meri znižal izražanje Cdc42 in Rac1/2/3 v urotelijskih celicah papiloma RT4 ter ni vplival na izražanju ostalih proteinov, ki sodelujejo pri reorganizaciji aktinskega citoskeleta (Slika 25A, C).

Naši rezultati kažejo, da homogenat in izvleček hAM ne znižata izražanja zgoraj naštetih

proteinov, medtem ko povišata izražanje kortaktina v celicah NPU (Slika 25A, D).



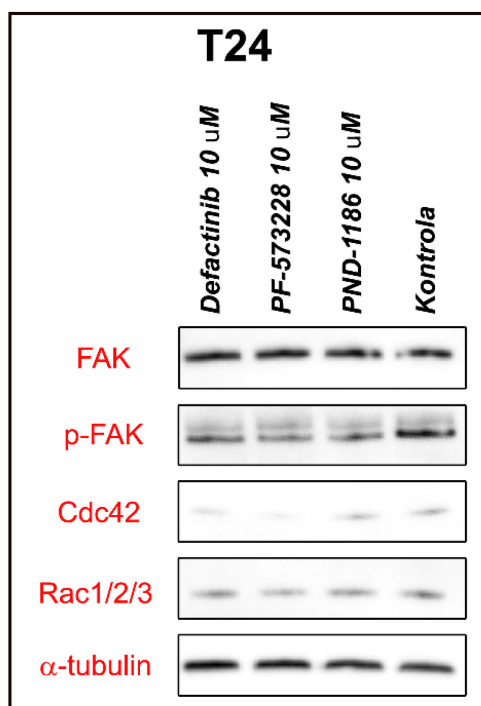
Slika 25. Homogenat hAM v rakavih urotelijskih celicah hAM zmanjša izražanje nekaterih proteinov, ki so vpleteni v reorganizacijo aktinskega citoskeleta. (A–D) Analiza izražanja kortaktina, p-kortaktina, RhoA, RhoC, Cdc42, Rac1/2/3 in α -tubulina z metodo Western po 24-urni inkubaciji celic T24, RT4 in NPU s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem brez pripravkov hAM (kontrolni vzorci). Homogenat hAM rahlo zniža izražanje kortaktina v celicah T24 in RT4. Homogenat hAM zmanjša količino fosforiliranega kortaktina v celicah T24. Homogenat zniža izražanje proteinov Cdc42 in Rac1/2/3 v celicah T24 in RT4. Izvleček hAM rahlo zniža izražanje proteinov Cdc42 in Rac1/2/3 v celicah RT4. Homogenat in izvleček hAM povišata izražanje kortaktina v celicah NPU. Izražanje in količino fosforilirane oblike tarčnih proteinov smo normalizirali na vsebnost α -tubulina. Polega tega smo izražanje in količino fosforilirane oblike tarčnih proteinov v tretiranih vzorcih normalizirali glede na kontrolne vzorce ter te vrednosti predstavili kot kratnik dvojiškega logaritma spremembe (angl. *log₂ fold change (log₂FC)*). Rezultate prenosa Western smo pridobili na osnovi 3–6 bioloških ponovitev, znotraj katerih je bila izvedena ena tehnična ponovitev. (B–D) Polna rdeča črta označuje mediano. Črtna črna črta predstavlja normalizirano vrednost kontrolnega vzorca. * $p \leq 0,05$.

4.4.3 Kombinirano tretiranje s homogenatom hAM in inhibitorji FAK najbolj učinkovito zavira migracijo mišično invazivnih urotelijskih celic v danih eksperimentalnih pogojih

Da bi ugotovili, ali homogenat hAM deluje na iste molekularne tarče kot inhibitorji FAK, smo konfluentne kulture celic T24 tretirali 24-ur z različnimi inhibitorji FAK (defactinib, PF-573228 in PND-1186). S prenosom Western smo analizirali izražanje FAK, p-FAK,

Cdc42, Rac1/2/3 in α -tubulina.

Ugotovili smo, da so defactinib, PF-573228 in PND-1186 znižali le količino fosforiliranega proteina FAK in ne njegovo izražanje. Poleg vpliva na fosforilirani FAK smo ugotovili, da se je zaradi delovanja inhibitorjev v celicah T24 znižalo izražanje dveh proteinov, in sicer Cdc42 in Rac1/2/3 (Slika 26).

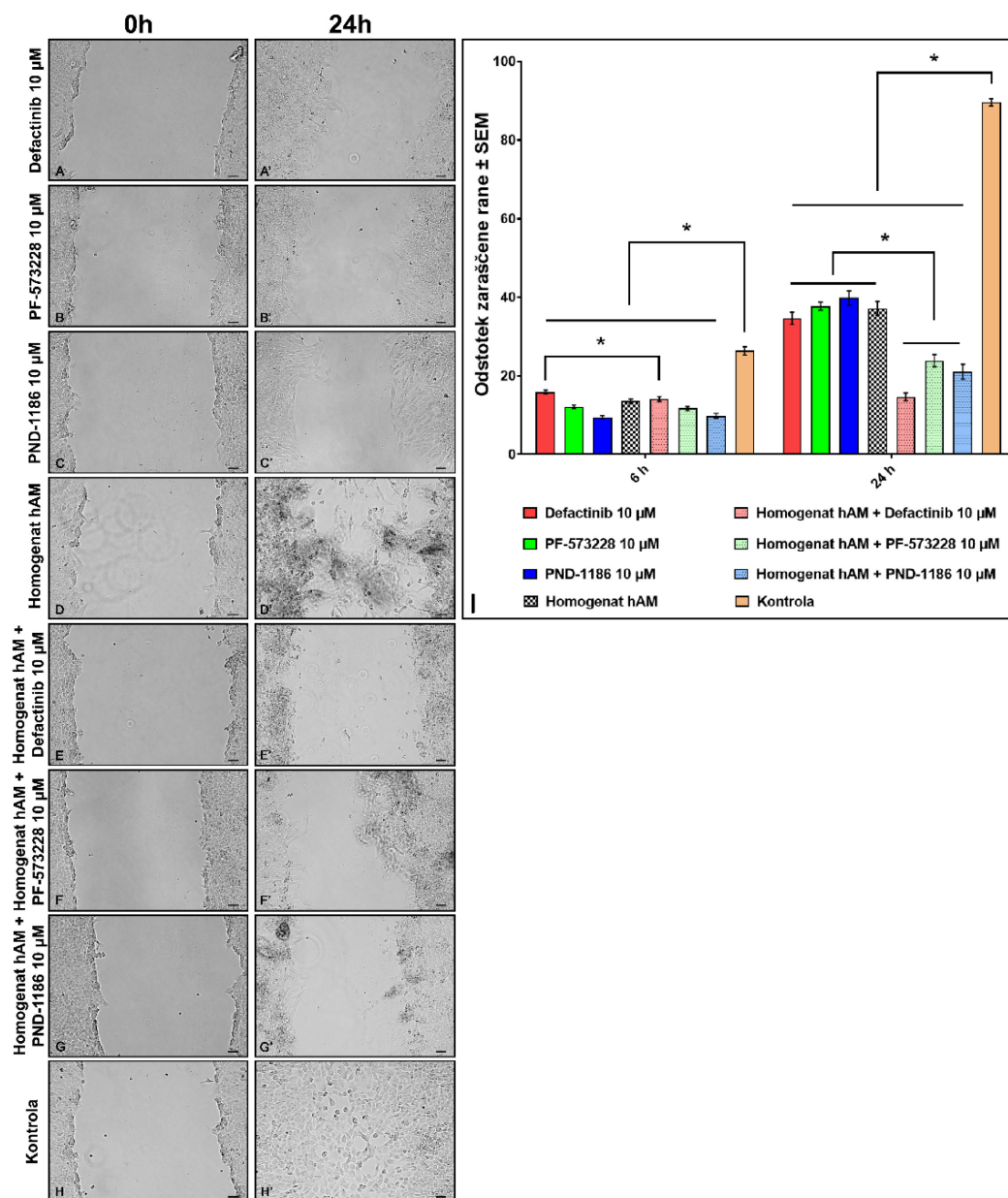


Slika 26. Inhibitorji FAK podobno kot homogenat hAM vplivajo na izražanje proteinov p-FAK, Cdc42, Rac1/2/3. Analiza izražanja proteinov FAK, p-FAK, Cdc42, Rac1/2/3 in α -tubulina s prenosom Western po 24-urni inkubaciji celic T24 z defactinibom, PF-573228, PND-1186 ali gojiščem brez inhibitorjev FAK. Inhibitorji FAK znižajo količino fosforiliranega FAK. Inhibitorji FAK znižajo tudi izražanje Cdc42 in Rac1/2/3. Rezultate smo pridobili na podlagi enega biološkega vzorca, znotraj katerega sta bili izvedeni dve tehnični ponovitvi.

Nato smo poskušali ugotoviti, kako inhibitorji FAK skupaj s homogenatom hAM vplivajo na migracijo mišično invazivnih urotelijskih celic. S spremljanjem preraščanja rane smo analizirali stopnjo migracije celic T24 po tretiranju z različnimi inhibitorji FAK (defactinib, PF-573228, PND-1186), homogenatom hAM, kombinacijo homogenata hAM in inhibitorjev FAK ali gojiščem, ki ni vsebovalo niti homogenata hAM niti inhibitorjev FAK (kontrolni vzorec). V poskusih smo uporabili 10 μ M koncentracijo inhibitorjev FAK, ki smo jo določili na osnovi preliminarnih poskusov, v katerih smo dokazali, da ima 10 μ M koncentracija inhibitorjev FAK podoben zaviralni učinek na migracijo rakavih celic T24 kot homogenat hAM. V preliminarnih poskusih smo tudi ugotovili, da visoka koncentracija inhibitorjev (100 μ M) lahko povzroči celično smrt, kar ni v skladu z učinkom homogenata hAM.

Ugotovili smo, da se je rana po 6-urnem tretiranju celic T24 z defactinibom, PF-573228 in PND-1186, zarasla za $15,9 \pm 0,5$ %, $12,2 \pm 0,5$ % oziroma $9,5 \pm 0,4$ % glede na površino rane ob času 0 ur. Odstotek zaraščene rane pri celicah T24, ki so bile 6 ur tretirane s homogenatom hAM (Slika 27I), homogenatom hAM in defactinibom (Slika 27I), homogenatom hAM in PF-573228 (Slika 27I) ter homogenatom hAM in PND-1186 (Slika 27I) je bil $13,6 \pm 0,6$ %, $14,1 \pm 0,6$ %, $11,7 \pm 0,5$ % oziroma $9,8 \pm 0,6$ %. Rana se je pri kontrolnih celicah T24, ki so bile 6 ur tretirane z gojiščem, zarastla za $26,3 \pm 1,1$ % (Slika 27I) glede na površino rane ob času 0 ur.

Rana pri celicah T24, ki so bile 24 ur tretirane z defactinibom (Slika 27A–A', I), PF-573228 (Slika 27B–B', I) in PND-1186 (Slika 27C–C', I) se je zarastla za $34,6 \pm 1,5$ %, $37,7 \pm 1,0$ % oziroma $39,8 \pm 1,8$ % glede na površino rane ob času 0 ur. Odstotek zaraščanja rane pri celicah T24, ki so bile 24 ur tretirane s homogenatom hAM (Slika 27D–D', I) homogenatom hAM in defactinibom (Slika 27E–E', I), homogenatom hAM in PF-573228 (Slika 27F–F', I) ter s homogenatom hAM in PND-1186 (Slika 27G–G', I) je znašal $37,1 \pm 1,8$ %, $14,62 \pm 1,0$ %, $23,9 \pm 1,6$ % oziroma $21,4 \pm 1,9$ %. Rana se je pri kontrolnih celicah T24, ki so bile 24 ur tretirane z gojiščem brez homogenata hAM ali inhibitorjev FAK (Slika 27H–H', I), zarastla za $90,0 \pm 1,0$ % glede na površino rane ob času 0 ur.



Slika 27. Kombinirano tretiranje s homogenatom hAM in inhibitorji FAK ima največji zaviralni učinek na migracijo mišično invazivnih urotelijskih celic T24. (A–C') Celice T24, ki so 24 ur tretirane z različnimi inhibitorji FAK, imajo zmanjšano stopnjo migracije v primerjavi s kontrolnimi celicami T24, ki so tretirane z gojiščem (H–H'). (D–G') Celice T24, ki so 24 ur izpostavljene različnim kombinacijam hAM homogenata in inhibitorjev FAK, migrirajo počasneje kot celice T24, ki so tretirane le s homogenatom hAM ali z različnimi inhibitorji FAK. (I) Na grafu je prikazano povprečje zaraščene rane v različnih časovnih točkah \pm standardna napaka povprečja (SEM) glede na površino rane ob času 0 ur. Rezultate smo pridobili na podlagi treh bioloških ponovitev, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve. Merilca 50 μm . * $p < 0,05$.

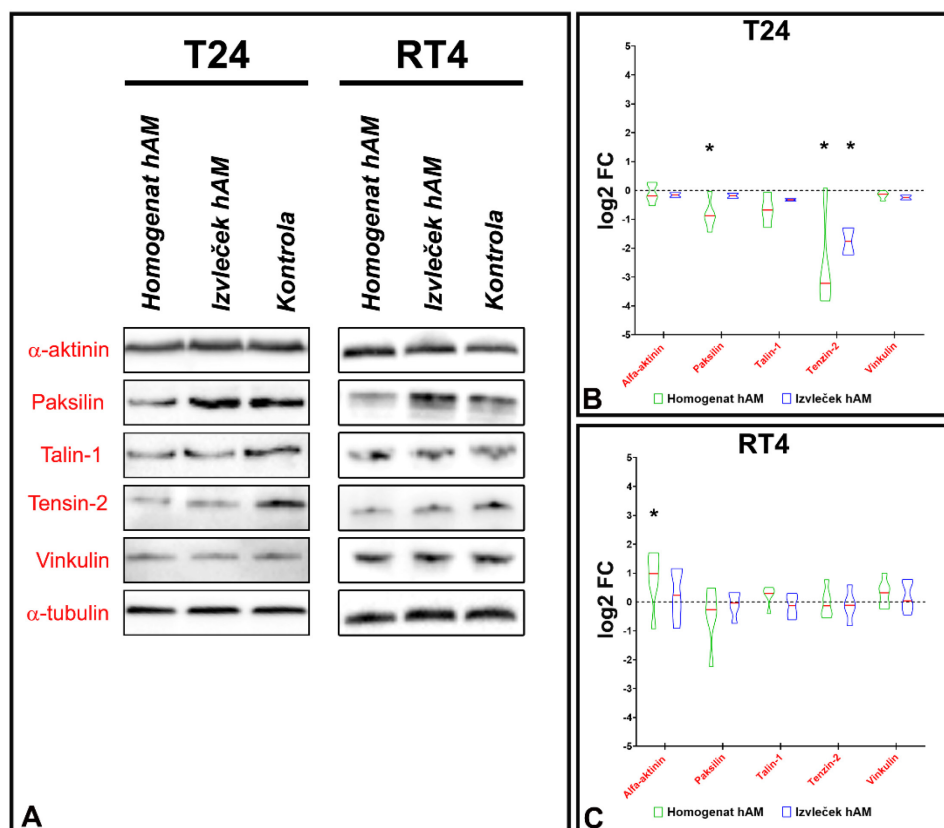
4.4.4 Homogenat in izvleček hAM znižata izražanje proteinov fokalnih stikov v mišično invazivnih urotelijskih celicah

Ker homogenat in izvleček hAM predvsem vplivata na izražanje in količino

fosforiliranega FAK v rakavih urotelijskih celicah, smo želeli ovrednotiti učinek pripravkov hAM na izražanje proteinov, ki so poleg FAK del fokalnih stikov. V ta namen smo celice T24 in RT4 tretirali 24 ur s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem (kontrolni vzorci) ter analizirali izražanje α -aktinina, paksilina, talina-1, tenzina-2 in vinkulina.

Ugotovili smo, da sta homogenat in izvleček hAM značilno znižala izražanje tenzina-2 v celicah T24. Prav tako smo ugotovili, da je homogenat hAM, vendar ne izvleček hAM, močno zmanjšal izražanje paksilina v celicah T24. Zaznali smo tudi zmanjšanje v izražanju talina-1 v celicah T24 po tretiranju s homogenatom in izvlečkom, vendar razlika v izražanju ni bila statistično značilna v primerjavi s kontrolnimi celicami T24, ki so bile izpostavljene gojišču brez pripravkov hAM. Nenazadnje, ugotovili smo, da niti homogenat hAM niti izvleček hAM nista vplivala na izražanje α -aktinina in vinkulina (Slika 28A, B).

Ugotovili smo, da je v celicah RT4 učinek homogenata in izvlečka hAM na izražanje proteinov, ki so del fokalnih stikov, nekoliko drugačen. Zaznali smo povišanje v izražanju α -aktinina po tretiranju celic RT4 s homogenatom in izvlečkom hAM. Ugotovili smo, da je homogenat hAM v celicah RT4 v manjši meri znižal izražanje paksilina kot v celicah T24, medtem ko izvleček hAM ni vplival na njegovo izražanje (Slika 28A, C).



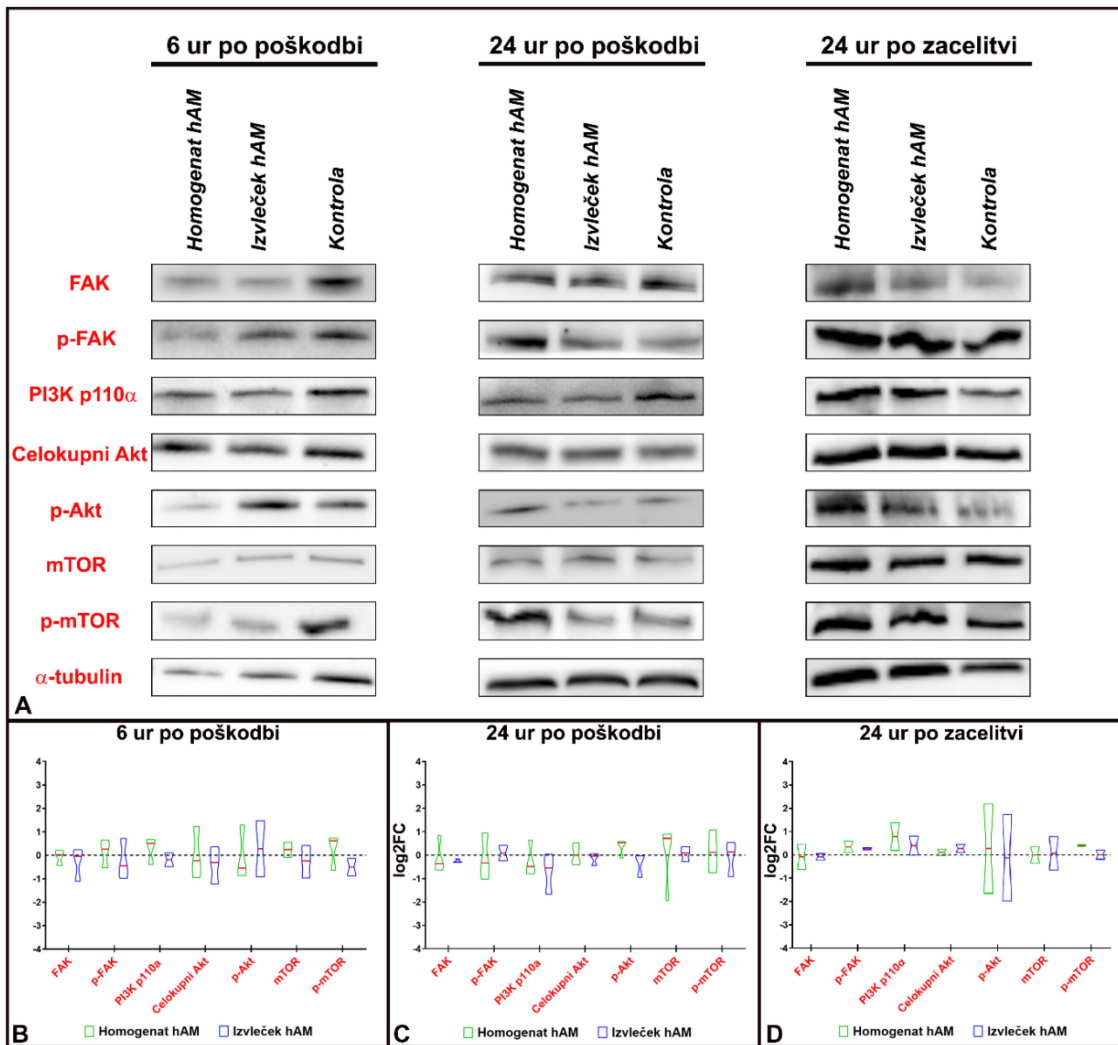
Slika 28. Homogenat in izvleček hAM znižata izražanje proteinov fokalnih stikov v mišično

invazivnih urotelijskih celicah. (A–C) Analiza izražanja α -aktinina, paksilina, talina-1, tenzina-2, vinkulina in α -tubulina z metodo prenos Western po 24-urni inkubaciji celic T24 s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem brez pripravkov hAM (kontrolni vzorci). (B) Izražanje paksilina se značilno zniža v celicah T24, ki so tretirane s homogenatom hAM. V celicah T24, homogenat in izvleček hAM značilno znižata izražanje tenzina-2, v manjši meri tudi izražanje talina-1. Niti homogenat hAM niti izvleček hAM ne vplivata na izražanje α -aktinina in vinkulina. (C) Po tretiranju celic RT4 s homogenatom in izvlečkom se zviša izražanje α -aktinina. Homogenat hAM zniža izražanje paksilina, medtem ko izvleček hAM ne vpliva na njegovo izražanje. Izražanje tarčnih proteinov smo normalizirali na vsebnost α -tubulina. Izražanje tarčnih proteinov v tretiranih vzorcih smo dodatno normalizirali glede na kontrolne vzorce ter te vrednosti predstavili kot kratnik dvojiškega logaritma spremembe (angl. *log₂ fold change (log₂FC)*). Rezultate smo pridobili na podlagi 2–5 bioloških ponovitev, znotraj katerih je bila izvedena ena tehnična ponovitev. (B, C) Polna rdeča črta predstavlja mediano. Črtkana črna črta predstavlja normalizirano vrednost kontrolnega vzorca. * $p \leq 0,05$.

4.4.5 V normalnih urotelijskih celicah po izzvani poškodbi ali že po zacelitvi rane tako homogenat kot tudi izvleček hAM ne vplivata niti na izražanje FAK in p-FAK niti na izražanje proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR

Želeli smo ovrednotiti hipotezo, ali pripravka hAM vplivata na signalno kaskado PI3K/Akt/mTOR v normalnih urotelijskih celicah po izzvani poškodbi ter zacelitvi rane. V ta namen smo na modelu diferenciranega normalnega urotelija naredili poškodbo in nato celice izpostavili homogenatu in izvlečku hAM za 6 in 24 ur ali počakali, da se rane zacelijo in nato celice NPU izpostavili pripravkom hAM za 24 ur. Kot kontrolni vzorec smo uporabili celice NPU, ki smo jih gojili v gojišču. Nato smo s prenosom Western ovrednotili izražanje proteinov FAK, PI3K p110 α , Akt, mTOR, α -tubulin in količine fosforiliranih proteinov FAK, Akt in mTOR.

Ugotovili smo, da 6 ur po poškodbi kulture celic NPU niti homogenat hAM niti izvleček hAM nista značilno vplivala na izražanje FAK in p-FAK ter proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR. Podoben trend smo opazili tudi 24 ur po poškodbi, saj ni bilo razlike v izražanju in količini fosforiliranih proteinov, ki so del zgoraj omenjene signalne poti, po tretiranju s homogenatom ali izvlečkom hAM. Naši rezultati so pokazali, da 24 ur po zacelitvi rane, izražanje proteinov FAK, PI3K p110 α , celokupnih Akt, mTOR in količina fosforiliranih proteinov FAK, Akt ter mTOR ostaneta nespremenjena po tretiranju s homogenatom hAM ali izvlečkom hAM (Slika 29A–D).



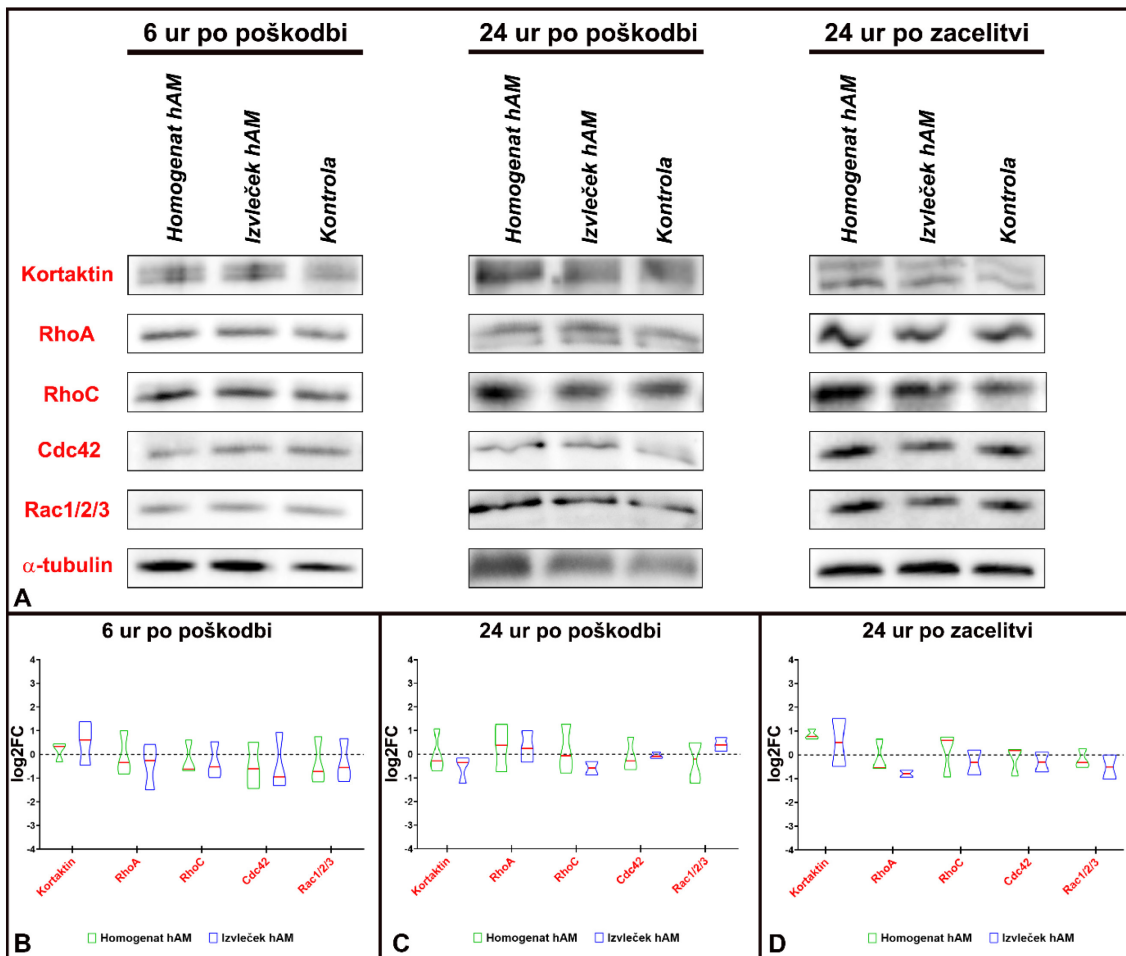
Slika 29. V normalnih urotelijskih celicah po izzvani poškodbi ali že po zacelitvi rane tako homogenat kot tudi izvleček hAM ne vplivata niti na izražanje FAK in p-FAK niti na proteine, ki so del signalne PI3K/Akt/mTOR. (A–D) Analiza izražanja FAK, PI3K p110 α , Akt, mTOR, α -tubulina, in količine fosforiliranih proteinov FAK, Akt in mTOR z metodo Western v normalnih urotelijskih celicah po izzvani poškodbi ter zacelitvi rane. Niti homogenat hAM niti izvleček hAM ne vplivata značilno na izražanje in količino fosforiliranega FAK niti na proteine, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR, 6 in 24 ur po izzvani poškodbi ali 24 ur po zacelitvi rane. Izražanje in količino fosforilirane oblike tarčnih proteinov smo normalizirali na vsebnost α -tubulina. Polega tega smo izražanje in količino fosforilirane oblike tarčnih proteinov v tretiranih vzorcih normalizirali glede na kontrolne vzorce ter te vrednosti predstavili kot kratnik dvojiškega logaritma spremembe (angl. *log₂ fold change (log₂FC)*). Rezultate prenosa Western smo pridobili na osnovi 2–3 bioloških ponovitev, znotraj katerih je bila izvedena vsaj ena tehnična ponovitev. (B–D) Polna rdeča črta označuje mediano. Črtkana črna črta predstavlja normalizirano vrednost

kontrolnega vzorca.

4.4.6 Homogenat in izvleček hAM v normalnih urotelijskih celicah vplivata na izražanje proteinov, ki so vpleteni v reorganizacijo aktinskega citoskeleta po poškodbi in zacelitvi rane

Ker smo ugotovili, da priprava hAM v manjši meri vplivata na migracijo celic NPU, vendar ne preko signalne poti PI3K/Akt/mTOR, smo želeli podrobneje raziskati molekularni mehanizem, ki je vpleten v migracijo celic. V ta namen smo s prenosom Western ovrednotili učinek homogenata in izvlečka hAM na izražanje proteinov, ki sodelujejo pri reorganizaciji aktinskega citoskeleta, in sicer kortaktin, RhoA, RhoC, Cdc42, Rac1/2/3. Po izzvani poškodbi smo celice NPU tretirali 6 in 24 ur s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem. Da bi ocenili vpliv pripravkov hAM po zacelitvi rane, smo ustvarili rano in počakali, da se rane zacelijo in nato celice NPU izpostavili pripravkom hAM ali gojišču za 24 ur. Kot kontrolni vzorec smo uporabili celice NPU, ki smo jih gojili v gojišču.

Dokazali smo, da sta 6 ur po poškodbi tako homogenat kot izvleček hAM znižala izražanje proteinov RhoA, RhoC, Cdc42 in Rac1/2/3 v celicah NPU, vendar razlika ni bila statistično značilna. Prav tako smo ugotovili, da priprava hAM rahlo povišata izražanje kortaktina, vendar ne značilno. Dodatno smo ugotovili, da je 24 ur po poškodbi izzvenel učinek homogenata in izvlečka hAM, saj ni bilo razlike v izražanju proteinov, ki so vpleteni v reorganizacijo aktinskega citoskeleta normalnih urotelijskih celic po tretiranju s pripravki hAM. 24 ur po zacelitvi rane smo opazili, da sta homogenat in izvleček hAM povišala izražanje kortaktina. Nasprotno sta priprava hAM rahlo znižala izražanje RhoA in Rac1/2/3, vendar razlika v izražanju v primerjavi s kontrolnimi celicami NPU, ki so bile tretirane z gojiščem, ni bila statistično značilna (Slika 30A–D).



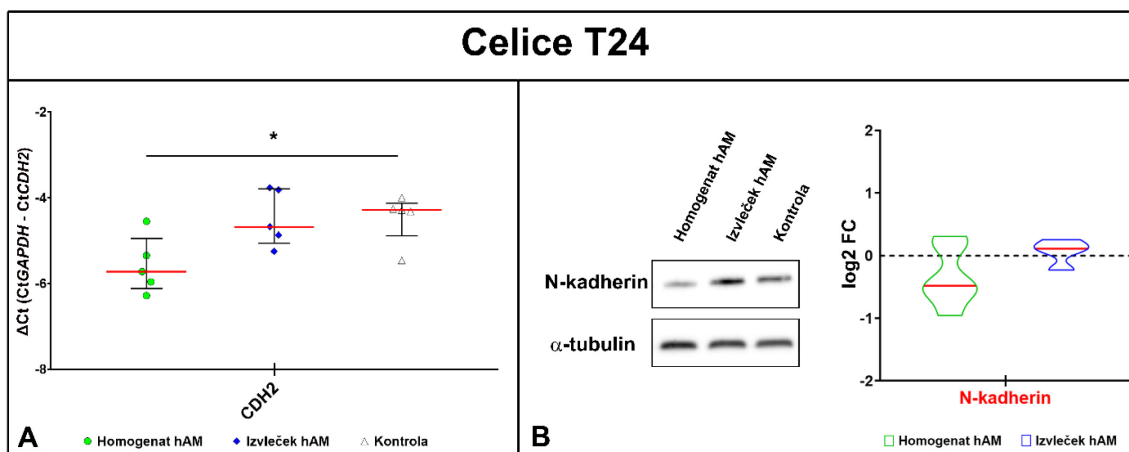
Slika 30. V prvih 6 urah po izzvani poškodbi v normalnih urotelijskih celicah tako homogenat kot tudi izvleček hAM zmanjšata izražanje proteinov, ki so vpleteni v reorganizacijo aktinskega citoskeleta. (A–D) Analiza izražanja kortaktina, RhoA, RhoC, Cdc42, Rac1/2/3 in α -tubulina s prenosom Western v normalnih urotelijskih celicah po izzvani poškodbi in zacelitvi rane. 6 ur po izzvani poškodbi, homogenat in izvleček hAM znižata izražanje RhoA, RhoC, Cdc42 in Rac1/2/3 v celicah NPU. 24 ur po poškodbi, pripravka hAM ne vplivata na izražanje le teh. Po drugi strani, 24 ur po zacelitvi rane, le izvleček hAM rahlo zniža izražanje proteinov RhoA in Rac1/2/3 v celicah NPU, vendar razlika v izražanju ni statistično značilna v primerjavi s kontrolnimi celicami NPU, ki so izpostavljene gojišču. Izražanje tarčnih proteinov smo normalizirali na vsebnost α -tubulina. Izražanje tarčnih proteinov v tretiranih vzorcih smo dodatno normalizirali glede na kontrolne vzorce ter te vrednosti predstavili kot kratnik dvojiškega logaritma spremembe (angl. *log₂ fold change (log₂FC)*). Rezultate prenosa Western smo pridobili na osnovi 2–3 bioloških ponovitev, znotraj katerih je bila izvedena vsaj ena tehnična ponovitev. (B–D) Polna rdeča črta označuje mediano. Črtna črna črta predstavlja normalizirano vrednost kontrolnega vzorca.

4.5 VPLIV PRIPRAVKOV HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE NA OZNAČEVALCE EPITELIJSKO-MEZENHIMSKEGA PREHODA NORMALNIH IN RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC

4.5.1 Homogenat hAM znižuje izražanje N-kadherina v mišično invazivnih urotelijskih celicah

Nato smo želeli ugotoviti, ali pripravka hAM vplivata na izražanje označevalcev EMP v rakavih urotelijskih celicah. Da bi proučili njun vpliv, smo celice T24 inkubirali 24 ur s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem brez pripravkov hAM (kontrolni vzorci). Na genski in proteinski ravni smo s pomočjo molekularnih metod qPCR oziroma prenosom Western analizirali izražanje gena *CDH2* in njegovega proteinskega produkta N-kadherina. V poskusih smo uporabili le mišično invazivne urotelijske celice T24, ki so sposobne invadirati in izražajo N-kadherin, za razliko od neinvazivnih urotelijskih celic papiloma RT4, ki predvsem izražajo E-kadherin in niso invadirajoče.

Izražanje gena *CDH2* je bilo statistično značilno znižano v celicah T24, ki so bile tretirane s homogenatom hAM v primerjavi s kontrolnimi celicami, ki so bile tretirane z gojiščem (Slika 31A). V celicah T24, ki so bile tretirane z izvlečkom hAM je prišlo do manjšega znižanja v izražanju *CDH2*, vendar razlika ni bila statistično značilna v primerjavi s kontrolami (Slika 31A). Na proteinski ravni smo opazili podoben trend izražanja N-kadherina. Rezultati prenosa Western so pokazali, da je izražanje N-kadherina znižano v celicah T24, ki so bile tretirane s homogenatom hAM v primerjavi s kontrolnimi celicami T24, ki so bile izpostavljene gojišču brez pripravkov hAM (Slika 31B). Nasprotno pa izvleček hAM ni vplival na izražanje N-kadherina (Slika 31B).



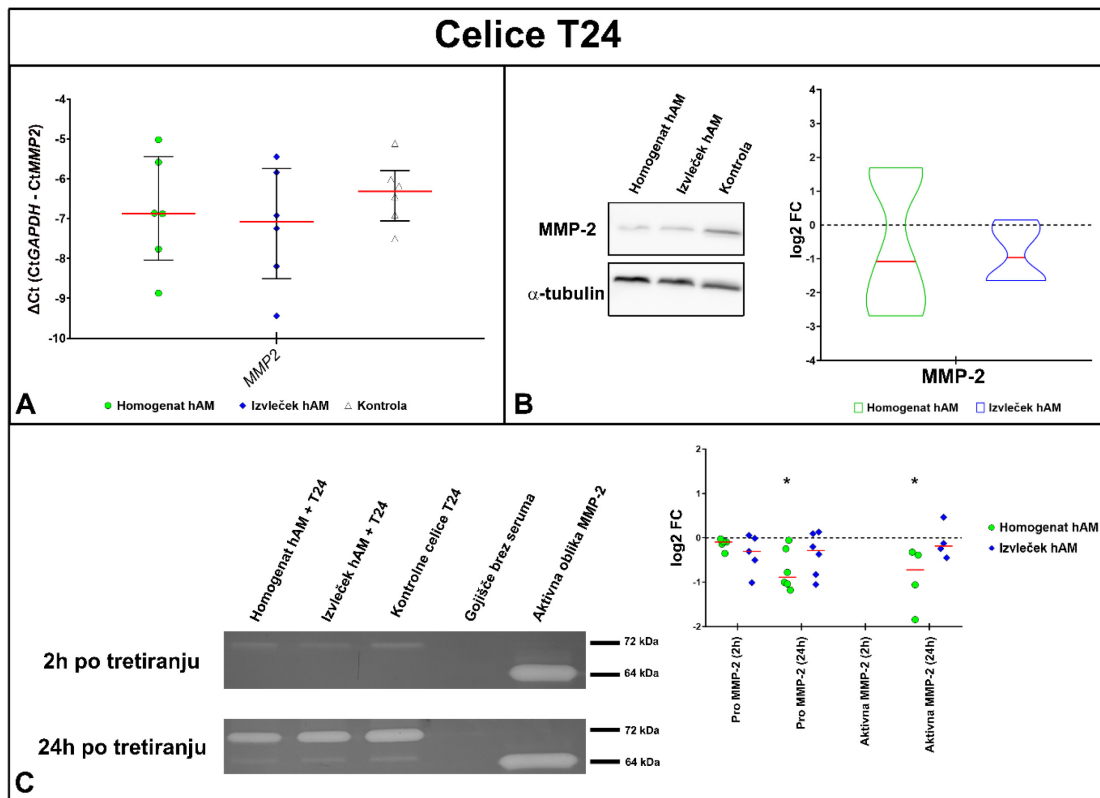
Slika 31. Homogenat hAM znižuje izražanje N-kadherina v mišično invazivnih urotelijskih celicah. (A) Analiza izražanja *CDH2* z metodo qPCR po 24-urni inkubaciji celic T24 s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem (kontrolni vzorci). Izražanje *CDH2* se statistično značilno znižuje v celicah T24 po tretiranju s homogenatom hAM. Po drugi strani, izvleček hAM vpliva na izražanje *CDH2* le v manjši meri. Izražanje *CDH2* smo normalizirali na vsebnost *GAPDH*. Rezultate qPCR smo predstavili kot ΔCt ($CtGAPDH - CtCDH2$). (B) Analiza izražanja N-kadherina in α -tubulina z metodo Western po 24-urni inkubaciji celic T24 s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem brez pripravkov hAM (kontrolni

vzorci). Izražanje N-kadherina se zniža v celicah T24, ki so tretirane s homogenatom hAM. Po drugi strani, izvleček hAM ne vpliva na izražanje N-kadherina v rakavih celicah T24. Izražanje N-kadherina smo normalizirali na vsebnost α -tubulina. Polega tega smo izražanje N-kadherina v tretiranih vzorcih normalizirali glede na kontrolne vzorce ter te vrednosti predstavili kot kratnik dvojiškega logaritma spremembe (angl. *log2 fold change (log2FC)*). Rezultate qPCR (A) smo pridobili na osnovi petih bioloških vzorcev, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve. Rezultate prenosa Western (B) smo pridobili na podlagi 4–6 bioloških ponovitev, znotraj katerih je bila izvedena ena tehnična ponovitev. (A) Vsaka točka na grafu A predstavlja vrednost enega biološkega vzorca. Polna rdeča črta (A, B) predstavlja mediano, polne črne črte (A) pa interkvartilni razpon. Črtna črna črta (B) predstavlja normalizirano vrednost kontrolnega vzorca. * $p \leq 0,05$.

4.5.2 Homogenat in izvleček hAM zmanjšata izražanje in aktivnost MMP-2 v mišično invazivnih urotelijskih celicah

Tako kot N-kadherin ima tudi MMP-2 osrednjo vlogo pri invaziji rakavih urotelijskih celic. Da bi ocenili vpliv različnih pripravkov hAM na izražanje in aktivnost MMP-2, smo celice T24 inkubirali 24 ur s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem brez pripravkov hAM. S pomočjo metode qPCR smo ugotovili, da homogenat in izvleček hAM znižata izražanje *MMP2*, vendar razlika v izražanju ni bila statistično značilna v primerjavi s kontrolnimi celicami, ki so bile tretirane z gojiščem brez pripravkov hAM (Slika 32A). Podoben trend znižanja smo opazili tudi na proteinski ravni. Rezultati prenosa Western so pokazali, da se izražanje MMP-2 zniža v celicah, ki so bile tretirane s homogenatom in izvlečkom hAM, vendar razlika v izražanju ni bila statistično značilna v primerjavi s kontrolnimi celicami T24, ki so bile izpostavljene gojišču brez pripravkov hAM (Slika 32B).

Ker MMP-2 deluje predvsem zunaj celic, smo nato poskušali ugotoviti vpliv pripravkov hAM na izločanje MMP-2. Celicam T24 smo pobrali gojišče v časovni točki 2 in 24 ur po končanem tretiranju z različnimi pripravki hAM ali gojiščem ter z želatinsko cimografijo analizirali izražanje in aktivnost MMP-2. Dokazali smo, da so 2 uri po končanem tretiranju celice T24, ki so bile izpostavljene homogenatu ali izvlečku hAM, izločale manj pro-oblike MMP-2 (72 kDa), vendar razlika v izražanju ni bila statistično značilna v primerjavi s kontrolnimi celicami T24, ki so bile izpostavljene gojišču brez pripravkov hAM. 24 ur po končanem tretiranju s homogenatom hAM smo zaznali statistično značilen upad v izražanju pro-oblike MMP-2. Čeprav v manjši meri, smo zmanjšano količino pro-oblike MMP-2 dokazali tudi pri celicah T24, ki so bile tretirane z izvlečkom hAM. Rezultati želatinske cimografije so pokazali, da celice T24 niso izločale aktivne oblike MMP-2 (64 kDa) 2 uri po končanem tretiranju z različnimi pripravki hAM ali z gojiščem (kontrolni vzorci). Aktivno obliko MMP-2 smo zaznali šele 24 ur po končanem tretiranju, in sicer se je količina izločene aktivne oblike MMP-2 statistično značilno zmanjšala po tretiranju celic T24 s homogenatom hAM. Celice T24, tretirane z izvlečkom hAM, so izločale manj aktivne oblike MMP-2 kot kontrolne celice T24, ki so bile tretirane z gojiščem (Slika 32C).



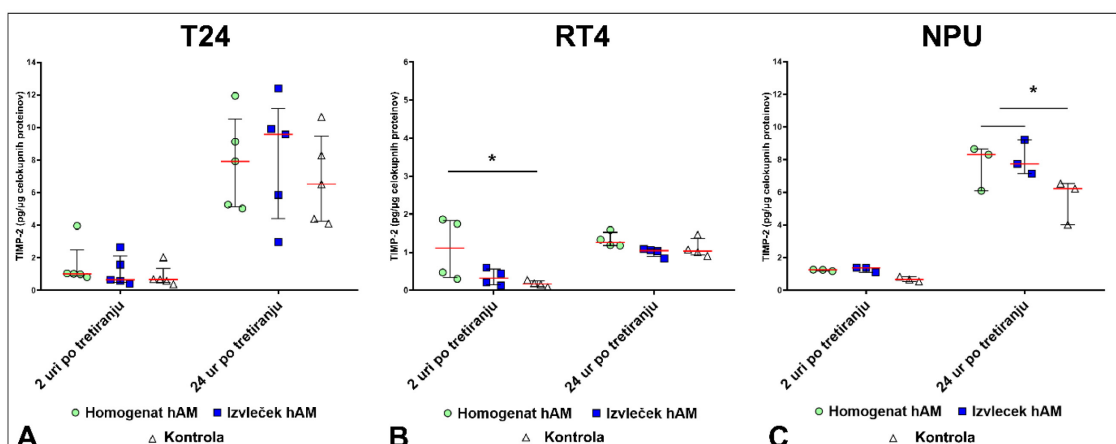
Slika 32. Homogenat in izvleček hAM zmanjšata izražanje in aktivnost MMP2 v mišično invazivnih urotelijskih celicah. Po 24-urni inkubaciji celic T24 s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem (kontrolni vzorci) smo z molekularnimi metodami qPCR, prenos Western in želatinska cimografija analizirali izražanje MMP2. (A) Analiza izražanja *MMP2* z metodo qPCR je pokazala, da homogenat in izvleček hAM znižata izražanje *MMP2* v manjši meri. Izražanje *MMP2* smo normalizirali na vsebnost *GAPDH*. Rezultate qPCR smo predstavili kot ΔCt (CtGAPDH – CtMMP2). (B) Analiza izražanja MMP2 in α -tubulina z metodo Western. Izražanje MMP-2 se rahlo zniža v celicah T24, ki so tretirane s homogenatom ali izvlečkom hAM. Izražanje MMP-2 smo normalizirali na vsebnost α -tubulina. Polega tega smo izražanje MMP-2 v tretiranih vzorcih normalizirali glede na kontrolne vzorce ter te vrednosti predstavili kot kratnik dvojiškega logaritma spremembe (angl. *log₂ fold change* (*log₂FC*)). (C) Analiza pro in aktivne oblike MMP-2 z želatinsko cimografijo. Količina pro-oblike MMP2 (72 kDa) se rahlo zmanjša 2 uri po končanem tretiranju z različnimi pripravki hAM. Količina pro-oblike MMP-2 se nadalje zmanjša 24 ur po končanem tretiranju s pripravki iz hAM, še zlasti s homogenatom hAM. 2 uri po končanem tretiranju z različnimi pripravki hAM ali gojiščem (kontrolni vzorci), celice T24 ne izločajo aktivne oblike MMP2 (64 kDa). Po drugi strani, 24 ur po zaključenem tretiranju s homogenatom hAM, celice T24 izločajo statistično značilno manj aktivne MMP-2 v primerjavi s kontrolnimi celicami T24, ki so tretirane z gojiščem. Celice T24, tretirane z izvlečkom hAM izločajo manj aktivne oblike MMP-2, vendar razlika ni statistično značilna v primerjavi s kontrolnimi celicami T24, ki so tretirane z izvlečkom brez pripravkov hAM. Rezultate qPCR (A) smo pridobili na osnovi petih bioloških vzorcev, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve. Rezultate prenosa Western (B) in želatinske cimografije (C) smo pridobili na osnovi 4–6 bioloških ponovitev, znotraj katerih je bila izvedena ena tehnična ponovitev. (A, C) Vsaka točka na grafih predstavlja vrednost enega biološkega vzorca. Polna rdeča črta (A, B, C) predstavlja mediano, polne črne črte (A, B) pa interkvartilni razpon. Črtkana črna črta (B, C) predstavlja normalizirano vrednost

kontrolnega vzorca. * $p \leq 0,05$.

4.5.3 Homogenat in izvleček hAM rahlo povečata količino TIMP-2, izločenega iz rakavih in normalnih urotelijskih celic

Ko smo ugotovili, da homogenat in izvleček hAM zmanjšata izražanje aktivne oblike MMP-2 smo želeli preveriti, ali je ta vpliv povezan s količino izločenega proteina TIMP-2. V ta namen smo po 24-urnem tretiranju s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem, v dveh časovnih točkah (2 in 24 ur) zbrali vzorce gojišča, v katerem so rastle celice T24, RT4 ali NPU ter z metodo ELISA določili koncentracijo TIMP-2 (Slika 33A–C).

Ugotovili smo, da so celice T24, ki so bile izpostavljene homogenatu hAM, 2 uri po končanem tretiranju izločale več TIMP-2 kot celice, ki so bile tretirane z izvlečkom hAM ali gojiščem (kontrolni vzorci). Dokazali smo, da so 24 ur po končanem tretiranju s homogenatom in izvlečkom hAM, celice T24 izločale večjo količino TIMP-2, kot kontrolne celice T24, ki so bile tretirane z gojiščem, vendar razlika v količini izločenega TIMP-2 ni bila statistično značilna (Slika 33A). Prav tako smo dokazali, da celice RT4, ki so bile tretirane s homogenatom hAM že po 2 urah od zaključka tretiranja izločajo značilno več TIMP-2 kot kontrolne celice RT4, ki so bile tretirane z gojiščem. Nasprotno pa nismo ugotovili razlike v izločanju TIMP-2 med celicami RT4, ki so bile tretirane z izvlečkom hAM in kontrolnimi celicami RT4, ki so bile izpostavljene gojišču (Slika 33B). Opazili smo, da po 24 urah od zaključka tretiranja, učinek pripravkov iz hAM izzveni, saj so celice RT4, ki so bile tretirane s homogenatom in izvlečkom hAM, izločale približno enako količino TIMP-2 kot kontrolne celice RT4, ki so bile tretirane z gojiščem (Slika 33B). Ugotovili smo, da so 2 uri po zaključenem tretmaju, celice NPU, ki so bile tretirane z različnimi pripravki hAM, izločale večjo količino TIMP-2 kot kontrolne celice NPU, ki so bile tretirane z gojiščem, vendar razlika v količini izločenega TIMP-2 ni bila statistično značilna (Slika 33C). Količina izločenega TIMP-2 se je povečala 24 ur po zaključku tretiranja, saj so celice NPU, ki so bile tretirane s homogenatom hAM in izvlečkom hAM, izločale značilno več TIMP-2 kot kontrolne celice, tretirane z gojiščem brez pripravkov iz hAM (Slika 33C).



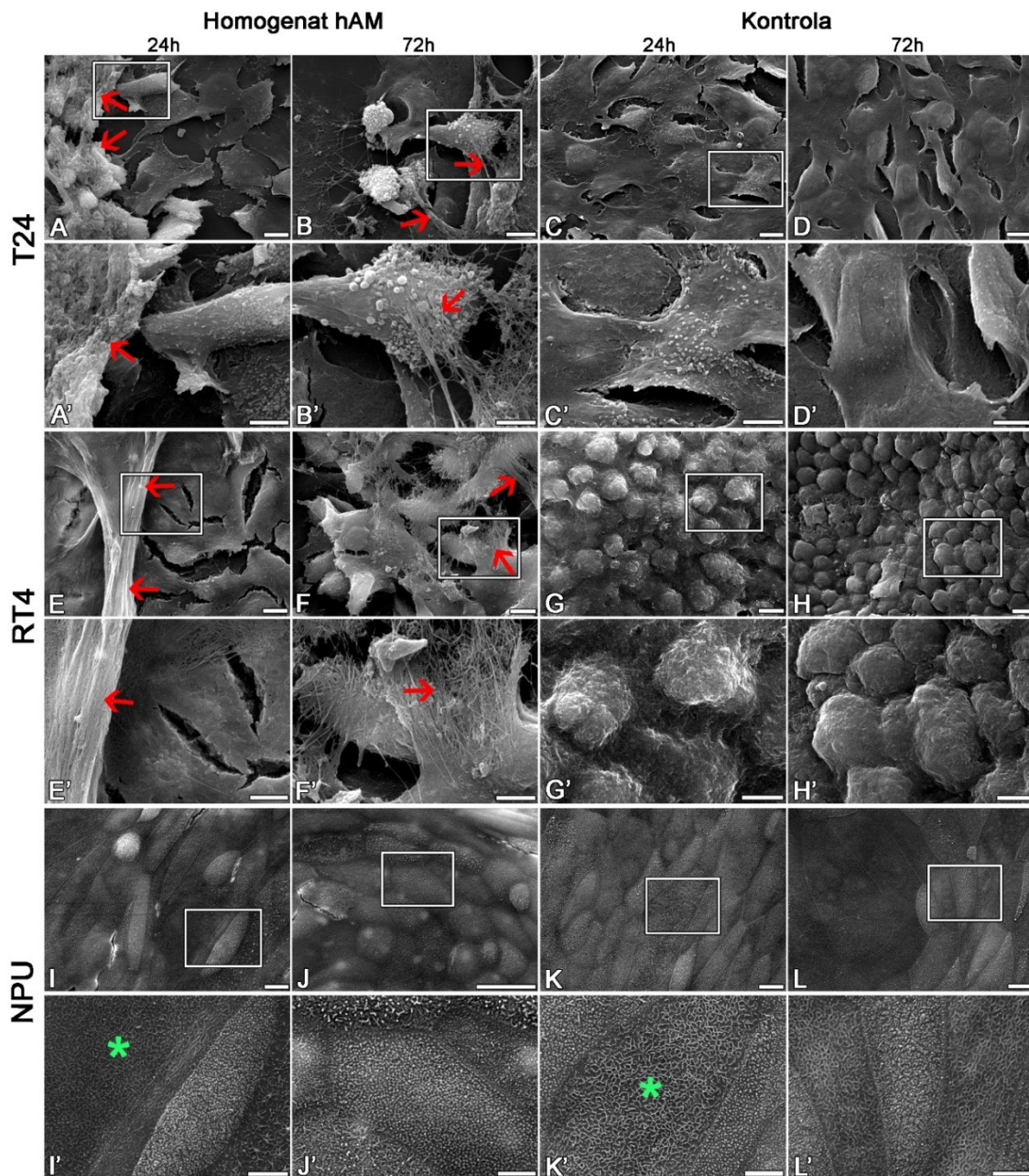
Slika 33. Homogenat in izvleček hAM rahlo povečata količino TIMP-2, izločenega iz rakavih in normalnih urotelijskih celic. Po končani 24-urni inkubaciji celic T24 s homogenatom hAM, izvlečkom hAM ali gojiščem (kontrolni vzorci) smo z metodo ELISA analizirali količino izločenega TIMP-2 iz rakavih in normalnih urotelijskih celic v dveh časovnih točkah (2 in 24 ur) (A) 2 uri po zaključku tretiranja so celice T24, ki so bile izpostavljene homogenatu hAM, izločale približno enako količino TIMP-2, kot celice T24, ki so bile tretirane z izvlečkom hAM ali gojiščem. 24 ur po zaključenem tretmaju so celice T24, ki so tretirane s pripravki iz hAM izločajo večjo količino TIMP-2 kot kontrolne celice T24, ki so bile tretirane z gojiščem. (B) 2 uri po zaključku tretiranja so celice RT4, ki so bile izpostavljene homogenatu hAM, izločale značilno več TIMP-2 kot celice kontrolne RT4, ki so bile tretirane z gojiščem. V isti časovni točki, so celice RT4, ki so bile tretirane z izvlečkom hAM, izločale približno enako količino TIMP-2 kot kontrolne celice RT4, tretirane z gojiščem brez pripravkov hAM. 24 ur po zaključenem tretiranju so celice RT4, ki so bile tretirane s pripravki iz hAM, izločale enako količino TIMP-2, kot kontrolne celice RT4, ki so bile tretirane z gojiščem. (C) 2 uri po zaključenem tretiranju so celice NPU, ki so bile izpostavljene pripravkom iz hAM, izločale večjo količino TIMP-2 kot kontrolne celice NPU, ki so bile tretirane z gojiščem. 24 ur po zaključenem tretmaju so celice NPU, ki so bile tretirane s homogenatom ali izvlečkom hAM, izločale signifikantno več TIMP-2 kot kontrolne celice NPU, ki so tretirane le z gojiščem. (A–C) Rezultate testa ELISA smo pridobili na osnovi 4–5 bioloških vzorcev, znotraj katerih sta bili izvedeni dve tehnični ponovitvi. Rezultate testa ELISA smo normalizirali na celokupno koncentracijo proteinov v vzorcih in jih tako predstavili. Vsaka točka na grafih predstavlja vrednost enega biološkega vzorca. Polna rdeča črta označuje mediano, črne črte predstavljajo interkvartilni razpon. * $p \leq 0,05$.

4.6 ANALIZA ULTRASTRUKTURE NORMALNIH IN RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC, TRETIRANIH S HOMOGENATOM HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE

4.6.1 Homogenat hAM se pritrudi na površino rakavih urotelijskih celic, vendar ne na površino normalnih urotelijskih celic

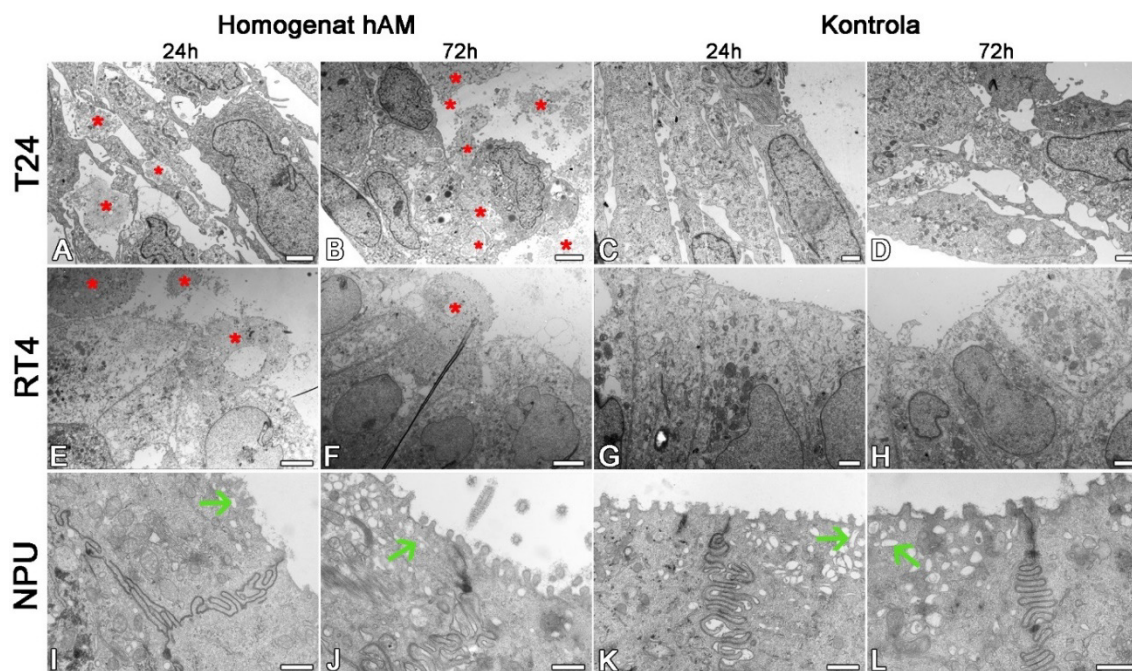
Nato smo raziskali učinek homogenata hAM na morfologijo in ultrastrukturo T24, RT4 in NPU. Z vrstičnim elektronskim mikroskopom smo opazili, da so celice T24, ki so bile 24 ali 72 ur izpostavljene homogenatu hAM, ohranile mezenhimsko morfologijo, vendar med njimi so bili večji medcelični prostori kot med kontrolnimi celicami T24, ki so bile tretirane le z gojiščem. Homogenat hAM se je pritrnil na površino celic T24 in tako v veliki meri prekril njihovo površino, kljub temeljitemu izpiranju celic pred kemijsko fiksacijo (Slika 34A–D' in Slika 35A–D). Kontrolne celice RT4, ki so bile inkubirane v

gojišču 24 ali 72 ur, so imele epitelijsko morfologijo, rastle so v več plasteh in so bile med seboj dobro povezane, brez večjih medceličnih prostorov (Slika 34G–H' in Slika 35G, H). Celice RT4, ki so bile 24 ali 72 ur izpostavljene homogenatu hAM, so ohranile epitelijsko morfologijo. Na njihovo površino je bil mestoma pritrjen homogenat, kljub večkratnemu izpiranju (Slika 34E–F' in Slika 35E–F). Na posameznih mestih smo po tretiranju s homogenatom hAM opazili luščenje površinske plast celic RT4 (Slika 34E–F'). Celice NPU, ki so bile 24 ali 72 ur tretirane s homogenatom hAM ali gojiščem (kontrolni vzorci), so ohranile epitelijsko tomografijo in apikalno topografijo dobro diferenciranih normalnih urotelijskih celic (Slika 34I–L' in Slika 35I–L). Apikalna plazmalema NPU je namreč vsebovala vrvičaste in zaokrožene grebene, posamezne celice NPU pa so vsebovale tudi mikrogrebene. Poleg tega smo opazili, da se homogenat hAM ne pritrži na površino NPU, kar je v nasprotju z učinkom na rakave urotelijske celice.



Slika 34. Homogenat hAM se pritrdi na površino rakavih urotelijskih celic, vendar ne na površino normalnih urotelijskih celic. (A–B') Med celicami T24, ki so bile tretirane 24 ali 72 ur s homogenatom hAM, so večji medcelični prostori. Homogenat hAM se pritrdi in prekrije večji del površine T24. (C–D') Kontrolne celice T24, ki so 24 in 72 ur izpostavljene gojišču brez homogenata hAM imajo mezenhimsko morfologijo in med njimi so manjši medcelični prostori. (E–F') 24- in 72-urna inkubacija s homogenatom hAM povzroči luščenje površinske plasti celic RT4. Poleg tega se homogenat hAM pritrdi in prekrije večji del površine celic RT4. (G–H') Kontrolne celice RT4, ki so bile tretirane 24 in 72 ur z gojiščem imajo epitelijsko morfologijo, saj so dobro povezane med seboj. (I–J') 24- in 72-urna inkubacija s homogenatom hAM ne vpliva na morfologijo celic NPU. Homogenat hAM se ne pritrdi na apikalno površino celic NPU. (K–L') Kontrolne celice NPU, ki so bile 24 in 72 ur izpostavljene gojišču brez homogenata, ohranjajo apikalno topografijo dobro diferenciranih normalnih urotelijskih celic. Njihova apikalna plazmalema vsebuje vrvičaste in zaokrožene grebene in redko mikrogrebene. Rezultate smo pridobili na podlagi treh bioloških ponovitev, znotraj katerih sta bili izvedeni 1–2 tehnični ponovitvi. Z rdečimi puščicami je označen

homogenat hAM. Z zeleno zvezdo so označeni grebeni. Okvirji (A–L) kažejo povečave, prikazane na slikah A'–L'. Merilca: (A–L) 10 μ m, (A'–L') 5 μ m.

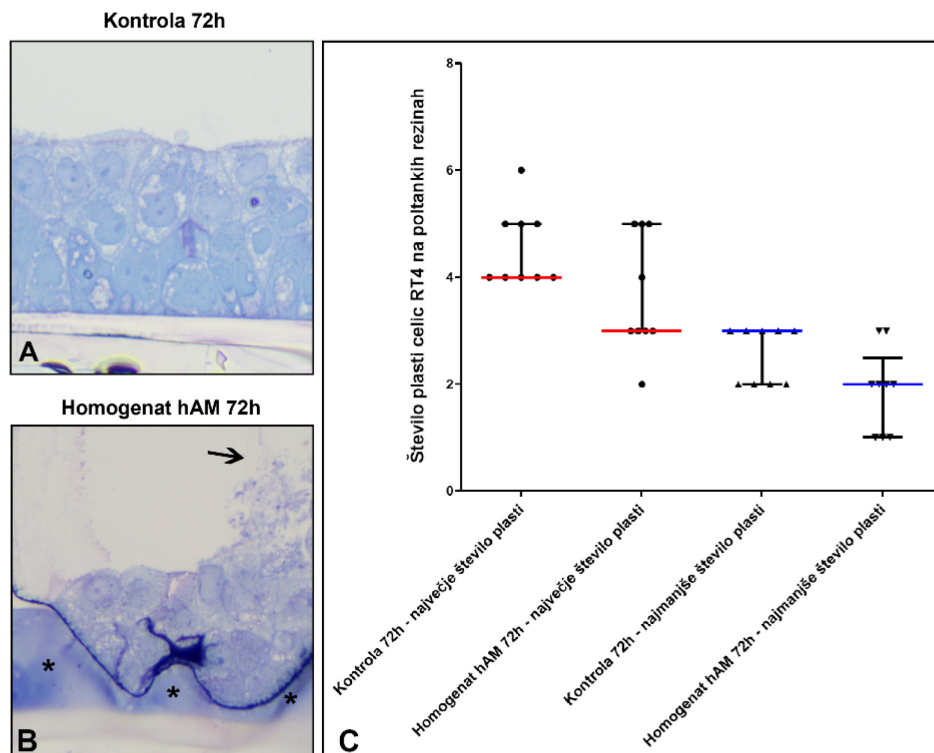


Slika 35. Homogenat hAM se pritrdi na površino rakavih urotelijskih celic in se vrine v medcelične prostore mišično invazivnih urotelijskih celic. (A–B) Homogenat hAM se pritrdi in prekrije večji del površine celic T24. Vrine se v medcelične prostore T24, vendar ne vpliva na njihovo ultrastrukturo. (C–D) Kontrolne celice T24, ki so tretirane 24 in 72 ur z gojiščem brez homogenata hAM imajo mezenhimsko morfologijo z velikimi medceličnimi prostori. (E–F) Homogenat hAM se pritrdi na apikalno površino RT4, vendar ne vpliva na njihovo ultrastrukturo. (G–H) Kontrolne celice RT4, ki so 24 in 72 ur izpostavljene gojišču brez homogenata hAM imajo epiteljsko morfologijo. Rastejo v več plasteh, so dobro povezane med seboj brez večjih medceličnih prostorov. (I, J) Homogenat hAM ne spreminja ultrastrukture NPU in se ne pritrdi na njihovo površino. (K–L) Kontrolne celice NPU, ki so 24 in 72 ur tretirane z gojiščem, ohranijo tipično ultrastrukturo dobro diferenciranih urotelijskih celic s prisotnimi diskoidalno-fuziformnimi vezikli (zeleni puščici) in dobro razvitimi medceličnimi stiki. Rezultate smo pridobili na podlagi treh bioloških ponovitev, znotraj katerih sta bili izvedeni 1–2 tehnični ponovitvi. Z rdečo zvezdico je označen homogenat hAM. Merilca: (A) 2 μ m, (B) 4 μ m, (C, D) 1 μ m, (E) 8 μ m, (F) 6 μ m, (G, H) 10 μ m in (I–L) 600 nm.

4.6.2 Homogenat hAM se vrine v medcelične prostore mišično invazivnih urotelijskih celic in zmanjša število plasti urotelijskih celic papiloma

S presežno elektronsko mikroskopijo smo ugotovili, da homogenat hAM ni le vezan na površino mišično invazivnih urotelijskih celic T24, temveč se vrine v medcelične prostore (Slika 35A–B). Za razliko od celic T24, se je pri celicah RT4 homogenat hAM pritrdil samo na njihovo površino (površinsko plast v modelu *in vitro*) in se ni vrinil med nižje ležeče celične plasti (Slika 35E–F). Zaradi tega smo nato skušali raziskati, ali homogenat hAM vpliva na skupno število plasti celic RT4. Z uporabo poltankih rezin smo prešteli največje in najmanjše število plasti po 72-urnem tretiranju celic RT4 z gojiščem (kontrolni vzorci, Slika 36A) ali s homogenatom hAM (Slika 36B). Naši rezultati so

pokazali, da se je število celičnih plasti celic RT4 po 72-urni inkubaciji s homogenatom hAM zmanjšalo, vendar razlika v številu plasti ni bila statistično značilna (Slika 36C). Kljub temu rezultat nakazuje, da je homogenat hAM sprožil luščenje celic RT4.



Slika 36. Homogenat hAM zmanjša število plasti urotelijskih celic papiloma po 72-urni inkubaciji. (A) Kontrolne celice RT4 imajo večje število plasti kot celice RT4, tretirane s homogenatom hAM (B). Vsaka točka na grafu (C) predstavlja število plasti na poltanko rezino. Rdeča črta označuje mediano največjega števila plasti, modra črta pa mediano najmanjšega števila plasti. Črna črta predstavlja interkvartilni razpon. Rezultate smo pridobili na podlagi treh bioloških ponovitev, znotraj katerih so bile izvedene tri tehnične ponovitve. Črna puščica (B) kaže vezavo homogenata hAM na površinsko plast urotelijskih celic papiloma RT4. Predel na B, označen z zvezdicami je artefakt, nastal zaradi gubanja porozne membrane.

5 RAZPRAVA

5.1 PRIPRAVKA IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE POVZROČATA LUŠČENJE RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC

Ugotovili smo, da homogenat hAM povzroči luščenje rakavih celic od gojitvene površine, ne pa tudi normalnih celic (Janev in sod., 2021). Opazili smo, da je odstotek odluščenih rakavih urotelijskih celic večji kot odstotek odluščenih celic raka dojke. Na osnovi rezultatov, ki smo jih pridobili na celicah, uporabljenih v doktorski nalogi, sklepamo, da ima homogenat hAM najbolj izrazit učinek na mišično invazivne urotelijske celice T24.

Ugotovili smo, da je stopnja luščenja rakavih urotelijskih celic odvisna od časa njihovega tretiranja s homogenatom hAM. Največjo stopnjo luščenja mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in urotelijskih celic papiloma RT4 smo opazili po 24-urnem tretiranju, ki je trajalo tri dni zapored. Prav tako smo pokazali, da tridnevno 2-urno tretiranje s homogenatom hAM sproži luščenje mišično invazivnih urotelijskih celic T24, vendar v manjši meri.

Poleg tega smo ugotovili, da je stopnja luščenja rakavih celic odvisna tudi od načina priprave homogenata hAM. Pokazali smo, da ima homogenat hAM, pripravljen s homogenizatorjem Russell Hobbs, večji učinek na luščenje mišično invazivnih urotelijskih celic T24, kot homogenat hAM, pripravljen s homogenizatorjem Polytron PT 3100 D. Prav tako smo ugotovili, da le homogenat, pripravljen z Russell Hobbsom, povzroča luščenje urotelijskih celic papiloma RT4. Predvidevamo, da so razlike v učinkih med pripravki homogenata hAM na rakave urotelijske celice posledica metode homogenizacije. Homogenizator Russell Hobbs namreč vsebuje rotacijska rezila, s katerima reže in homogenizira tkivo. Nasprotno, homogenizator Polytron PT 3100 D, deluje na podlagi principa rotor/stator. V mirujočem statorju se rotor hitro vrti, kar povzroči visoko mehansko energijo in posledično razbitje tkiva (Dhankhkar, 2014). Po homogenizaciji s Polytronom PT 3100 D smo opazili več penjenja, kar lahko povzroči denaturacijo protirakavih molekul, ki se sprostijo iz homogeniziranega tkiva. Predvidevamo, da je denaturacija protirakavih učinkovin lahko tudi posledica kavitacije. To je proces nastajanja in razpada mehurčkov, pri čemer pride do povišanja temperature in tlaka, kar vodi v nastajanje hidroksilnih radikalov, ki lahko neposredno reagirajo z organskimi snovmi in jih poškodujejo (Dhankhkar, 2014). Predvidevamo, da bi lahko bila razlika v motorni moči med dvema homogenizatorjema, tudi eden izmed razlogov za pojav kavitacije. Homogenizator Polytron ima namreč večjo motorno moč (1200 W) kot homogenizator Russell Hobbs (300 W). Poleg tega smo ugotovili, da je učinek z istim homogenizatorjem odvisen tudi od hitrosti homogenizacije. Naša raziskava je namreč pokazala, da ima v primeru dolgotrajnega tretiranja (trikrat po 24 ur), homogenat hAM, pripravljen s Polytronom PT 3100D pri 5000 obratih na minuto (PT3), večji učinek kot homogenata hAM, pripravljena pri 10000 (PT2) in 20000 obratih na minuto (PT1). Ravno

obratni učinek smo opazili v primeru kratkotrajnega tretiranja (trikrat po 2 uri), saj je imel homogenat PT1 večji učinek kot homogenata PT2 in PT3. Na osnovi teh rezultatov menimo, da se ob homogenizaciji pri večji hitrosti sprostijo protirakave učinkovine, ki imajo kratkotrajen učinek. Nasprotno sklepamo, da homogenizacija s Polytronom pri nižji hitrosti ohrani protirakave učinkovine za dlje časa. Skupaj, naši rezultati kažejo, da homogenizacija hAM z rotacijskimi rezili pri nizki moči, najbolj učinkovito ohranjuje protirakavo aktivnost homogenata hAM. Kljub temu bi morali izvesti še dodatne študije, s katerimi bi natančneje določili vpliv homogenizacije na ohranitev protirakavih molekul in vzdrževanje njihove funkcije.

Naša raziskovalna skupina je že pokazala, da je homogenat hAM mešanica hAEC, hAMSC in tesno prepletenih vlaken medceličnine hAM (Janev in sod., 2021). Homogenat hAM lahko vsebuje tudi različne celične vsebine (npr. organele in makromolekule), ki se sproščajo iz celic kot posledica homogenizacije. To je namreč mehanski proces, ki ustvarja strižne sile, ki porušijo integriteto celičnih membran. Ko smo ugotovili, da je imel homogenat hAM, pripravljen z Russell Hobbsom, največji učinek na luščenje rakavih urotelijskih celic, smo želeli raziskati, ali je luščenje posledica vezave homogenata na površino celic ali pa gre za posledico topnih snovi, ki jih izloča hAM. V ta namen smo iz homogenata hAM pripravili izvleček hAM. Homogenat hAM smo centrifugirali pri nizki hitrosti ($1000 \times g$) in tako odstranili delce medceličnine, celice hAM, jedra, citoskelet in celične ostanke. Na osnovi literature sklepamo, da so v izvlečku hAM ostali različni celični organeli (npr. mitohondriji, lizosomi, peroksisomi, zunajcelični vezikli) in topni faktorji (Padh, 1992; Alberts in sod., 2002), vendar bi morali izvesti dodatne študije s katerimi bi natančno opredelili sestavo pripravkov iz hAM.

Ugotovili smo, da izvleček hAM povzroči luščenje mišično invazivnih urotelijskih celic T24 po tridnevem 24-urnem tretiranju. Za razliko od homogenata hAM izvleček ni uspel povzročiti luščenja neinvazivnih urotelijskih celic papiloma RT4, saj so celice ostale pritrjene na podlago med celotnim obdobjem tridnevnega 24-urnega tretiranja. Prav tako smo ugotovili, da tridnevno 2-urno tretiranje z izvlečkom hAM ne povzroča luščenja mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in urotelijskih celic papiloma RT4. Naši rezultati kažejo, da ima homogenat hAM večji učinek na luščenje celic T24 in RT4 kot izvleček hAM. Ugotovili smo, da so se rakave celice s površine odluščile šele po močnem spiranju z gojiščem, na podlagi česar sklepamo, da priprava iz hAM oslabita medcelične stike in stike rakavih celic s podlago.

Da bi preverili hipotezo, da priprava iz hAM vplivata na stike rakavih celic s podlago, smo analizirali učinek pripravkov iz hAM na izražanje FAK in p-FAK v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24 in urotelijskih celicah papiloma RT4. Študije so pokazale, da inhibicija FAK povzroči luščenje celic iz podlage. Beierle in sodelavci so pokazali, da inhibitor FAK (Y15) sproži luščenje celičnih linij humanega nevroblastoma (Beierle in sod., 2010). Ista raziskovalna skupina je pokazala, da inhibicija p-FAK

povzroči tudi luščenje celičnih linij raka debelega črevesja (Heffler in sod., 2013).

Ugotovili smo, da homogenat hAM močno zmanjša izražanje in količino fosforilirane oblike FAK v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24. Pokazali smo, da homogenat hAM ne vpliva samo na izražanje FAK, temveč tudi na izražanje gena *PTK2*, ki nosi njegov zapis. Izvleček hAM je v manjši meri zavrl izražanje proteina FAK kot homogenat hAM v celicah T24, kar je v skladu z ugotovitvijo, da homogenat hAM ima večji učinek na luščenje mišično invazivnih urotelijskih celic T24.

Podobno kot pri celicah T24 je homogenat hAM močno znižal izražanje FAK v urotelijskih celicah papiloma RT4 tako na proteinski, kot tudi na genski ravni. Poleg vpliva na izražanje FAK je homogenat hAM tudi znatno zmanjšal njegovo fosforilacijo. Zmanjšanje izražanja FAK smo opazili tudi po tretiranju celic RT4 z izvlečkom hAM, vendar je bil njegov učinek na fosforilacijo FAK nekoliko manjši. Ti rezultati so v skladu s prejšnjimi rezultati, ko smo pokazali, da v primerjavi z izvlečkom hAM, homogenat hAM povzroča večji odstotek luščenja celic RT4.

Ker je FAK eden izmed aktivatorjev signalne poti PI3K/Akt/mTOR smo želeli ugotoviti ali pripravka iz hAM svoje učinke na rakave urotelijske celice izvajajo preko uravnavanja izražanja genov in proteinov, vpletenih v signalno pot PI3K/Akt/mTOR.

Pokazali smo, da poleg učinka na FAK in p-FAK, homogenat hAM zniža izražanje proteinov PI3K p110 α , Akt in mTOR ter zmanjša raven fosforilacije Akt in mTOR v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24. Ugotovili smo, da homogenat hAM ne vpliva samo na izražanje teh proteinov, temveč tudi na njihove gene. Dokazali smo, da je izražanje genov *PIK3CA*, *AKT1* in *MTOR* zmanjšano po tretiranju celic T24 s homogenatom hAM. Učinek izvlečka hAM je bil po drugi strani manj izrazit. Slednji je namreč poleg inhibicije FAK, znižal tudi izražanje PI3K in raven fosforiliranega Akt. Za razliko od homogenata hAM izvleček hAM ni znižal izražanja genov *PTK2*, *PIK3CA*, *AKT1* in *MTOR*. Navedeni rezultati kažejo na dejstvo, da ima homogenat hAM večji učinek na signalno pot PI3K/Akt/mTOR kot izvleček hAM. Ti rezultati dodatno potrjujejo dejstvo, da homogenat hAM povzroča večji odstotek luščenja mišično invazivnih urotelijskih celic T24 kot izvleček hAM. Na podlagi dosedanjih rezultatov sklepamo, da delujeta homogenat in izvleček hAM protirakavo na celice T24 z inhibicijo signalne poti FAK/PI3K/Akt/mTOR.

V urotelijskih celicah papiloma RT4 je bil učinek homogenata in izvlečka hAM na izražanje proteinov in genov, vpletenih v signalno pot PI3K/Akt/mTOR, nekoliko drugačen. Kljub temu da homogenat hAM in v manjši meri tudi izvleček zavirata ekspresijo FAK, pripravka iz hAM nista vplivala na izražanje ostalih genov in proteinov, ki so del zgoraj omenjene signalne poti. V celicah RT4 nismo zaznali fosforilirane oblike Akt, ki je potrebna za njegoovo popolno katalitično aktivnost, kar je v skladu z rezultati

drugih študij (Gupta in sod., 2013; Karkoulis in sod., 2010; Sun in sod., 2015). Čeprav je mTOR eden izmed navzdolnjih efektorjev Akt, obstajajo alternativni mehanizmi aktivacije mTOR, ki niso odvisni od signalne poti PI3K/Akt (Memmott in Dennis, 2009). Ker smo v naših poskusih zaznali fosforilirano obliko mTOR predvidevamo, da je prišlo do alternativne aktivacije mTOR v urotelijskih celicah papiloma RT4. Poleg tega rezultati nedavne študije, v kateri so v 25 celičnih linijah raka sečnega mehurja sekvencirali celotni eksom kažejo, da imata celični liniji T24 in RT4 različen spekter mutacij v genih, ki uravnavajo različne signalne poti (Nickerson in sod., 2017). Skupaj naši rezultati kažejo, da pripravka iz hAM ne vplivata na signalno pot PI3K/Akt/mTOR v urotelijskih celicah papiloma RT4, kljub temu da zavirata izražanje FAK.

Ker je bil FAK pomembna tarča homogenata in izvlečka hAM, smo skušali ovrednotiti njun vpliv na ostale proteine v fokalnih stikih. Fokalni stiki so obsežni makromolekulski kompleksi, ki se povezujejo s plazmalemo in reagirajo z okoliško medcelično (Kuo, 2013). FAK služi kot edinstven regulator sestavljanja in recikliranja fokalnih stikov, ki sta nujna procesa za učinkovito gibanje celic (Hu in sod., 2014).

Ugotovili smo, da homogenat in izvleček hAM znižata izražanje talina-1 in tenzina-2 v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24. Poleg tega smo opazili upad v izražanju paksilina po tretiranju celic T24 s homogenatom hAM. Številne študije potrjujejo dejstvo, da zmanjšano izražanje paksilina in talina-1 vodi v zmanjšano celično adhezijo, migracijo in invazijo (Deramaudt in sod., 2014; Sakamoto in sod., 2010; Velasco-Velázquez in sod., 2008; Zhang in sod., 2015). Tenzin-2, za katerega je znano, da sodeluje pri uravnavanju celične migracije, je najbolj kontroverzen član družine tenzinov (Mouneimne in Brugge, 2007). Ugotovitve različnih avtorjev si nasprotujejo, saj kažejo, da povečano izražanje tenzina-2 bodisi zavira bodisi spodbuja razvoj različnih tumorjev (Hong in sod., 2016; Yam in sod., 2006). Zato so potrebne dodatne študije, ki bodo preučile vpliv tenzina-2 v rakavih urotelijskih celicah. Kljub temu, naši rezultati kažejo, da pripravka iz hAM znižata izražanje številnih proteinov, ki se nahajajo v fokalnih stikih, s čimer vplivata na adhezijo celic T24.

Naša raziskava je pokazala, da homogenat hAM rahlo zniža izražanje paksilina v urotelijskih celicah papiloma RT4, vendar v manjši meri kot v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24. Ti rezultati so v skladu z ugotovitvijo, da ima homogenat hAM večji učinek na luščenje mišično invazivnih urotelijskih celic T24 kot urotelijskih celic papiloma RT4.

Skupaj naši rezultati kažejo, da homogenat hAM zavira izražanje proteinov in genov signalne poti FAK/PI3K/Akt/mTOR ter proteinov fokalnih stikov (paksilin, talin-1 in tenzin-2) v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24. Čeprav v manjši meri kot homogenat hAM, izvleček hAM tudi zmanjša izražanje proteinov, ki so del signalne poti FAK/PI3K/Akt/mTOR ter zniža ekspresijo talina-1 in tenzina-2. Zaradi teh učinkov

sklepamo, da homogenat in izvleček hAM oslabita stike celic T24 s površino s čimer povzročita njihovo luščenje. Ugotovili smo, da je učinek homogenata in izvlečka hAM na luščenje urotelijskih celic papiloma RT4 nekoliko drugačen. Homogenat hAM je znižal izražanje FAK, p-FAK in paksilina kar je povzročilo luščenje urotelijskih celic papiloma RT4. Izvleček hAM je znižal le izražanje FAK, vendar ne statistično značilno, kar ni zadostovalo, da bi sprožilo luščenje urotelijskih celic papiloma RT4.

5.2 HOMOGENAT HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE ZMANJŠA ZMOŽNOST PRITRJEVANJA RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC IN ZAVIRA NJIHOVO PROLIFERACIJO

Za rak sečnega mehurja je značilna visoka stopnja ponovljivosti bolezni. Eden izmed razlogov za to je dejstvo, da ob transuretralni resekciji tumorjev pogosto pride do odcepljanja rakavih celic v lumen sečnega mehurja, čemur sledi njihovo ponovno pritrjevanje na nediferencirane normalne urotelijske celice, ki ne vsebujejo uroplakinov (Jerman in sod., 2021). Ker je celična adhezija proces, ki igra pomembno vlogo pri metastaziranju primarnih tumorjev, smo ovrednotili učinek homogenata hAM na sposobnost pritrjevanja mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in urotelijskih celic papiloma RT4.

Naša študija je pokazala, da nasaditev mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in urotelijskih celic papiloma RT4 v prisotnosti homogenata hAM zmanjša njihovo zmožnost pritrjevanja na spodaj ležečo podlago (Janev in sod., 2021). Na osnovi teh rezultatov predvidevamo, da se večina celic T24 in RT4 veže na komponente medceličnine amnijske membrane, zaradi česar se ne morejo pritrčiti na površino gojitvene posodice. Številne študije so pokazale, da hAM deluje kot odličen biološki nosilec v tkivnem inženirstvu (Farhadhosseinabadi in sod., 2018; Iijima in sod., 2007; Jerman in sod., 2020; Jerman in sod., 2014a; Niknejad in sod., 2008; Wang in sod., 2014; Wilshaw in sod., 2008). Tudi naša raziskovalna skupina je že pokazala, da je hAM primeren nosilec za urotelijske celice, saj omogoča njihovo pritrjevanje, rast in diferenciacijo (Jerman in sod., 2014a). Pokazali smo, da imajo nosilci iz hAM potencial ne le v regenerativni medicini, temveč tudi za zdravljenje raka sečnega mehurja. Ugotovili smo, da različni nosilci iz hAM delujejo protirakavo, saj zmanjšajo invazivni potencial rakavih urotelijskih celic T24 tri tedne po nasaditvi (Ramuta in sod., 2020a).

Čeprav je homogenat hAM v veliki meri zmanjšal sposobnost pritrjevanja celic na podlago, se je majhno število mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in celic papiloma RT4 še vedno lahko pritrčilo na podlago. Pomembno je, da so imele celice T24 in RT4, ki so se pritrčile na podlago, pod vplivom homogenata hAM bistveno zmanjšano rast (Janev in sod., 2021). Ta zaviralni učinek je bil še bolj opazen pri urotelijskih celicah papiloma RT4, kar poudarja možnost uporabe homogenata hAM za boj proti zelo ponavljajočim se NMIBC in tumorjem CIS sečnega mehurja.

Ena od ključnih značilnosti rakavih celic je njihova sposobnost nenadzorovanih celičnih delitev. Naši rezultati kažejo, da homogenat hAM močno zmanjša proliferacijo mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in urotelijskih celic papiloma RT4 (Janev in sod., 2021). Ti rezultati so v skladu z našo predhodno študijo, v kateri smo pokazali, da nosilci iz hAM zmanjšujejo proliferacijo mišično invazivnih urotelijskih celic T24 (Ramuta in sod., 2020a). V nadaljevanju smo ocenili vpliv homogenata hAM na izražanje ciklina D1, ki kontrolira prehod celičnega cikla G1/S, saj so številne študije pokazale, da je prekomerno izražanje ciklina D1 značilno za številne vrste raka, vključno z rakom sečnega mehurja. Ugotovili smo, da v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24 homogenat hAM signifikantno zniža izražanje ciklina D1. Znižano izražanje ciklina D1 je lahko posledica zaviralnega učinka homogenata hAM na signalno pot PI3K/Akt/mTOR, saj so raziskave pokazale, da je ta signalna kaskada njegov močan aktivator (Chang in sod., 2003; Zhang in sod., 2016; Zhang in sod., 2018b). Nasprotno pa je v neinvazivnih urotelijskih celicah papiloma RT4 prišlo do manjšega zmanjšanja, ki ni bilo statistično značilno, kar je v skladu z ugotovitvijo, da homogenat hAM ne vpliva na signalno pot PI3K/Akt/mTOR v urotelijskih celicah papiloma RT4. Na podlagi teh rezultatov, domnevamo, da je vpliv homogenata hAM na različne proteine celičnega cikla odvisen od vrste rakavih celic, kar podpira tudi več študij, ki kažejo, da različni pripravki iz hAM vplivajo na različne stopnje celičnega cikla. Dokazano je, da celice pridobljene iz hAM, inducirajo zaustavitev celičnega cikla v fazi G0/G1 v rakavih celicah hematopoetskega in nehematopoetskega izvora ter v celični liniji človeškega raka jajčnikov (Bu in sod., 2017; Magatti in sod., 2012). Nasprotno pa so Rolfo in sodelavci pokazali, da celice, pridobljene iz hAM, zaustavijo celični cikel v fazi G1/S v celični liniji raka prostate (Rolfo in sod., 2014). Poleg tega so Riedel in sodelavci ter Jafari in sodelavci pokazali, da kondicionirano gojišče iz hAM povzroči zaustavitev celičnega cikla v fazi G2/M v celičnih linijah raka jeter oziroma raka dojke (Jafari in sod., 2021; Riedel in sod., 2019). Rezultati doktorske naloge podpirajo hipotezo, da je učinek homogenata hAM lahko drugačen v različnih tipih celic. Novost naše študije je ugotovitev, da homogenat hAM zmanjša proliferacijo mišično invazivnih urotelijskih celic preko inhibicije izražanja ciklina D1.

5.3 PRIPRAVKA IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE ZAVIRATA MIGRACIJO RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC

Migracija rakavih celic je proces, ki lahko pomembno prispeva k nastanku sekundarnih tumorjev. Slednji predstavljajo vodilni vzrok smrti zaradi raka (Mehlen in Puisieux, 2006). Ugotovili smo, da pripravka iz hAM vplivata na migracijo mišično invazivnih urotelijskih celic T24. Homogenat hAM je inhibiral migracijo mišično invazivnih urotelijskih celic T24 v vseh časovnih točkah (6, 24 in 48 ur). Opazili smo tudi, da je protimigratorni učinek odvisen od koncentracije uporabljenega homogenata hAM. Redčen homogenat hAM je namreč imel nekoliko manjši zaviralni učinek na stopnjo migracije celic T24. Tako kot homogenat hAM je tudi izvleček hAM zmanjšal migracijo celic T24 v vseh časovnih točkah. Za razliko od redčenega homogenata pa redčen

izvleček hAM ni imel učinka na migracijo celic T24.

Migracijo neinvazivnih urotelijskih celic papiloma RT4 smo spremljali dlje časa, saj te celice migrirajo veliko počasneje kot celice T24. Gre za rakavo spremenjene celice, za katere je značilna epitelijska morfologija in v manjši meri izražanje tesnostičnega proteina okcludin in adherentnega proteina E-kadherin (Železnik, 2016). Ugotovili smo, da tako homogenat hAM kot izvleček hAM statistično značilno zavirata migracijo celic RT4 v vseh časovnih točkah (6, 24, 48, 72 in 96 ur). Podoben zaviralni trend smo opazili tudi z redčenim homogenatom in izvlečkom hAM, kar nakazuje na dejstvo, da so migrirajoče celice papiloma RT4 bolj dovzetne za inhibicijo migracije s pripravki iz hAM.

Ugotovitev, da homogenat in izvleček hAM zmanjšata migracijo mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in urotelijskih celic papiloma RT4, se sklada z rezultati Jafari in sodelavcev, ki so pokazali, da kondicionirano gojišče iz hAM zmanjša migracijske sposobnosti celic trojno negativnega raka dojke MDA-MB-231 (Jafari in sod., 2021). Obenem pa nekateri rezultati raziskovalcev kažejo na ravno nasprotno dejstvo. Kim in sodelavci so namreč pokazali, da kondicionirano gojišče iz hAMSC pospeši migracijo celic raka dojke MDA-MB-231 in MCF7a (Kim in sod., 2015). Razlog za nasproten učinek lahko izhaja iz tega, da so raziskovalci uporabili različno pripravljeno kondicionirano gojišče. Jafari in sodelavci so namreč pripravili kondicionirano gojišče iz koščkov hAM 25 različnih donorjev (Jafari in sod., 2021). Nasprotno pa so Kim in sodelavci pridobili kondicionirano gojišče iz komercialno dostopnih celic hAMSC (Kim in sod., 2015). Način priprave pripravka iz hAM in čas tretiranja sta tako, poleg tipa celic, pomembna faktorja, ki lahko vplivata na končni učinek pripravka.

Ker sta homogenat in izvleček hAM močno zmanjšala migracijo rakavih urotelijskih celic, smo želeli preveriti njun vpliv na izražanje kortaktina, RhoA, RhoC, Cdc42 in Rac1, preko katerega vplivata na različne procese (aktivacija integrina, tvorba vodilnega roba, recikliranje fokalnih stikov, umik zadnjega roba), ki so potrebni za učinkovito migracijo celic (Tomar in sod., 2012; Tomar in Schlaepfer, 2009; Wang in sod., 2011; Weed in Parsons, 2001).

Ugotovili smo, da v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24 homogenat hAM zmanjša fosforilacijo in izražanje kortaktina, medtem ko izvleček hAM ni imel nobenega učinka. Ti rezultati so v skladu z našimi prejšnjimi rezultati, ko smo pokazali, da homogenat hAM učinkoviteje zavira migracijo celic T24 kot izvleček hAM. Dejstvo, da zmanjšano izražanje ali fosforilacija kortaktina vodi v zmanjšano migracijo, je podprto z več različnimi študijami, ki kažejo, da inhibicija kortaktina zniža celično gibljivost (Rothschild in sod., 2006; van Rossum in sod., 2006). Poleg kortaktina igrajo pomembno vlogo pri migraciji tudi RhoGTPaze. Ugotovili smo, da homogenat hAM močno zmanjša izražanje Cdc42 in Rac1/2/3 v mišično invazivnih rakavih urotelijskih celicah T24, medtem ko izvleček hAM ne vpliva na izražanje majhnih RhoGTPaz. Primarna vloga

Cdc42 in Rac1/2/3 na vodilnem robu migrirajočih celic je ustvarjanje protruzijskih sil z lokalizirano polimerizacijo aktina. Ti rezultati nakazujejo, da homogenat hAM zmanjša migracijo mišično invazivnih celic T24 preko inhibicije izražanja Cdc42 in Rac1/2/3.

Naša raziskava je pokazala, da homogenat hAM rahlo zniža izražanje in fosforilacijo kortaktina v urotelijskih celicah papiloma RT4. Poleg tega smo ugotovili, da homogenat hAM značilno zmanjša izražanje Cdc42 in Rac1/2/3 v celicah RT4, medtem ko ga izvleček hAM zmanjša le v manjši meri. Skupaj so ti rezultati v skladu z našimi prejšnjimi rezultati, ki kažejo, da homogenat hAM v večji meri zavira migracijo celic RT4 kot izvleček hAM.

Pri uravnavanju celične migracije sodelujejo tudi fokalni stiki. Kot smo razložili v poglavju 5.1, homogenat in izvleček hAM inhibirata izražanje različnih proteinov fokalnih stikov (paksilin, talin-1 in tenzin-2), s čimer lahko vplivata na nastajanje, zorenje in recikliranje fokalnih stikov ter posledično zmanjšata migracijo mišično invazivnih urotelijskih celic T24. Pri urotelijskih celicah papiloma RT4 smo opazili nekoliko drugačen vpliv pripravkov iz hAM na izražanje proteinov fokalnih stikov. Homogenat hAM je namreč povečal izražanje α -aktinina v urotelijskih celicah papiloma RT4. Raziskovalci so ugotovili, da povečano izražanje α -aktinina pospeši migracijo celic z reorganizacijo aktinskih filamentov (Kovac in sod., 2018; Zhang in sod., 2021). Rezultati naše študije kažejo na obratno dejstvo, saj smo pokazali, da kljub povišanemu izražanju α -aktinina, celice RT4, tretirane s pripravki iz hAM, migrirajo značilno počasneje kot netretirane celice (Slika 19F1-J2, Q). Razlog za protimigratorni učinek lahko izhaja iz dejstva, da pripravka iz hAM zmanjšata izražanje drugih proteinov, ki regulirajo migracijo rakavih celic, vključno s FAK in p-FAK.

Glede na to, da sta oba pripravka iz hAM zmanjšala izražanje FAK v obeh tipih rakavih urotelijskih celic, predvidevamo, da je inhibicija FAK pomemben mehanizem, s katerim homogenat in izvleček hAM zmanjšata stopnjo migracije mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in urotelijskih celic papiloma RT4. Ti rezultati so v skladu s študijami na drugih tipih celic. Na primer, Yu in sodelavci so ugotovili, da inhibicija FAK in p-FAK zmanjša migracijo celic raka jeter (Yu in sod., 2018). Megison in sodelavci so pokazali, da inhibicija FAK vodi v zmanjšano migracijo nevroblastomskih celic (Megison in sod., 2013). Da pripravka iz hAM delujeta protimigratorno in nimata prokancerogenih učinkov v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24 in urotelijskih celic papiloma RT4 potrjuje tudi dejstvo, da niti homogenat hAM niti izvleček hAM ne vplivata na izražanje vinkulina. Inhibicija vinkulina namreč povzroči povečano fosforilacijo FAK in paksilina, kar spodbudi celično migracijo (Li in sod., 2014; Mierke in sod., 2010).

5.4 KOMBINACIJA INHIBITORJEV FAK IN HOMOGENATA HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE UČINKOVITO ZAVIRA MIGRACIJO MIŠIČNO INVAZIVNIH UROTELIJSKIH CELIC

S predhodnimi raziskavami smo ugotovili, da ima pripravek v obliki homogenata hAM največji zaviralni učinek na rakave urotelijske celice. Zaradi tega smo želeli ugotoviti mehanizem delovanja homogenata hAM in ali ta poteka preko regulacije izražanja in fosforilacije FAK. V ta namen smo uporabili kompetitivne inhibitorje FAK ter preverili, ali vplivajo na podobne molekularne tarče kot homogenat hAM v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24. Ugotovili smo, da inhibitorji FAK (defactinib, PF-573228 in PND-1186) zmanjšajo le količino fosforilirane oblike FAK, vendar ne vplivajo na njegovo celokupno koncentracijo. Tako kot homogenat hAM so tudi inhibitorji FAK zmanjšali izražanje proteinov, ki sodelujejo pri reorganizaciji aktinskega citoskeleta, in sicer Cdc42 in Rac1/2/3.

Na podlagi teh rezultatov smo predvidevali, da podobno kot homogenat hAM tudi inhibitorji FAK zavrejo migracijo rakavih celic. Analize so pokazale, da tako inhibitorji FAK kot tudi homogenat hAM zavirajo migracijo rakavih celic T24 v obeh analiziranih časovnih točkah (6 in 24 ur). Naši rezultati so pokazali, da homogenat hAM celo poveča zaviralni učinek defactiniba po 6 urah. Poleg tega smo pokazali, da imajo inhibitorji FAK v kombinaciji s homogenatom hAM največji protimigratorni učinek na mišično invazivne urotelijske celice T24. Ugotovili smo, da je kombinacija homogenata hAM in defactiniba najbolj učinkovito zavrla migracijo celic T24, čemur sta sledila kombinacija homogenata hAM in PND-1186 oziroma kombinacija homogenata hAM in PF-573228. Razlog za protimigratorno delovanje lahko izhaja iz kombiniranega vpliva na izražanje in fosforilacijo FAK. Za razliko od inhibitorjev FAK, ki vplivajo le na fosforilacijo FAK, homogenat hAM zavira tudi njegovo izražanje. Domnevamo, da tako inhibicija izražanja FAK s strani homogenata hAM, kot tudi zmanjšana raven njene fosforilacije, ki je posledica učinka homogenata hAM in inhibitorjev kinazne aktivnosti, močno vplivata na izražanje in aktivnost številnih navzdolnih efektorjev, ki sodelujejo pri nadzoru celične migracije, vključno s Cdc42 in Rac1/2/3.

Menimo, da bi bilo kombinirano zdravljenje s homogenatom hAM in defactinibom učinkovito proti rakavim urotelijskim celicam. Pred klinično uporabo so nadaljnje *in vitro* ter *in vivo* študije, ki bodo v celoti proučile celično-biološke mehanizme njenega protirakavega delovanja. V prihodnjih študijah bi lahko s tehnologijo izbivanja genov (*angl. gene knockout*) inaktivirali gen za FAK in ovrednotili, ali homogenat hAM še vedno deluje zaviralno na rakave urotelijske celice T24.

5.5 PRIPRAVKA IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE VPLIVATA NA NAČIN MIGRACIJE RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC TER NA NJIHOVO MORFOLOGIJO

Poleg vpliva na hitrost migracije rakavih celic, priprava iz hAM vplivata tudi na morfolgijo migrirajočih celic in na njihov način migracije. Številne študije so pokazale, da lahko celice migrirajo na dva različna načina, in sicer individualno ali kolektivno. Za

individualno migracijo celic je značilna izguba medceličnih stikov in premikanje celic ena za drugo (v sosledju). Kolektivna migracija se razlikuje od individualne predvsem po tem, da celice ostanejo povezane med celotnim gibanjem ter ohranijo medcelične stike (Lintz in sod., 2017; Lu in Lu, 2021). Vedno več je dokazov, da so rakave celice, ki migrirajo kolektivno, bolj agresivne in metastatske, kot tiste, ki migrirajo posamezno (Aceto in sod., 2014; Clark in Vignjevic, 2015; Yang in sod., 2019).

Naša študija je pokazala, da celice T24-eGFP, tretirane s homogenatom hAM migrirajo posamezno ter imajo značilno mezenhimsko morfologijo. Opazili smo, da so nekatere celice na vodilnem robu izgubile smer migracije ter krožile na mestu. Zmanjšanje izražanja Cdc42, ki smo jo opazili v celicah T24, tretiranih s homogenatom hAM, pojasni izgubo smeri migracije. Cdc42 namreč poleg vpliva na aktin tudi nadzoruje smer migracije (Raftopoulou in Hall, 2004). Pri celicah T24-eGFP, ki so bile tretirane z izvlečkom, smo sicer opazili podoben vzorec individualne migracije, vendar pa je bilo pri njih manj medceličnih prostorov, kot pri celicah T24-eGFP, ki so bile izpostavljene homogenatu hAM. Netretirane celice T24-eGFP so nasprotno, migrirale kolektivno ter obdržale medcelične stike med celotnim obdobjem. Na podlagi teh rezultatov lahko zaključimo, da poleg zmanjšanja stopnje migracije, homogenat in izvleček hAM tudi spremenita način migracije mišično invazivnih urotelijskih celic T24, saj povzročita prehod iz kolektivne v individualno celično migracijo. Na osnovi teh rezultatov lahko zaključimo, da pripravka iz hAM delujeta protirakavo, saj spremenita agresiven, kolektiven fenotip celic T24, značilen za metastatske v skupkih migrirajoče se celice, v manj agresiven fenotip, značilen za posamezno migrirajoče rakave celice.

Kljub temu da so celice RT4, ki so bile tretirane s homogenatom ali izvlečkom hAM, ohranile epiteljsko morfologijo in kolektivno migracijo, je bila slednja znatno upočasnjena. Ugotovili smo, da homogenat in izvleček hAM vplivata na migracijo neinvazivnih urotelijskih celic papiloma RT4 tako, da zmanjšata nastanek lamelopodijev in filopodijev vzdolž vodilnega roba migrirajočih celic. Gre za dinamične membranske izrastke, ki so odgovorni za napredovanje sprednjega roba migrirajočih celic. Naša študija je pokazala, da pripravka iz hAM zmanjšata izražanje proteinov Cdc42 in Rac1/2/3 v celicah RT4, s čimer zmanjšata nastanek lamelopodijev in filopodijev, saj sta ta dva proteina vpletena pri polimerizaciji aktina na vodilnem robu migrirajočih celic (Lamarche in sod., 1996; Ridley, 2006). Ti rezultati so v skladu z rezultati na celični liniji raka pljuč (801D), kjer so pokazali, da utišanje Rac1 s kratko lasnično RNA (siRNA) zavira nastanek lamelopodijev (Chen in sod., 2011).

5.6 PRIPRAVKA IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE ZMANJŠATA STOPNJO INVAZIJE RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC

Poleg tega, da sta vplivala na migracijo, sta homogenat in izvleček hAM tudi statistično značilno zmanjšala invazivni potencial mišično invazivnih urotelijskih celic T24.

Ugotovili smo, da je zaviralni učinek na invazijo odvisen od količine uporabljenega pripravka iz hAM, saj sta redčen homogenat in redčen izvleček hAM zmanjšala invazijo v manjši meri. Ugotovitev, da pripravka iz hAM delujeta zaviralno na invazijo rakavih celic, se sklada z rezultati naše predhodne študije, kjer smo pokazali, da nosilci iz hAM zmanjšajo invazivni potencial mišično invazivnih celic T24 (Ramuta in sod., 2020a). Naši rezultati se skladajo tudi z ugotovitvijo Jafari in sodelavcev, ki so dokazali, da kondicionirano gojišče iz hAM prav tako zmanjša invazijo celic raka dojke MDA-MB-231 (Jafari in sod., 2021).

Številne študije so pokazale, da FAK prispeva h gibljivosti in invazivnosti normalnih ter rakavih celic z uravnavanjem različnih interakcij med medceličnino in tumorskimi celicami (Mitra in sod., 2005; Mitra in Schlaepfer, 2006; Parsons, 2003). FAK namreč fosforilira številne proteine ter sproži različne signalne poti, ki uravnavajo celično proliferacijo, preživetje, migracijo in invazijo (Lee in sod., 2015). Ena od teh signalnih poteh je signalna kaskada PI3K/Akt/mTOR (Sulzmaier in sod., 2014). Nedavna študija iz leta 2021 je pokazala, da inhibicija p-FAK z inhibitorjem FAK (BI853520) zmanjša izražanje proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR in posledično zmanjša invazivni potencial celic raka jajčnika (celice SKOV3 in celice OVCAR3) (Li in sodelavci, 2021). Ti rezultati so v skladu z rezultati naše študije, kjer smo pokazali, da pripravka iz hAM zmanjšata izražanje FAK in p-FAK ter inhibirata izražanje signalne kaskade PI3K/Akt/mTOR v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24. Na podlagi teh rezultatov sklepamo, da je inhibicija signalne poti FAK/PI3K/Akt/mTOR, pomemben mehanizem, s katerim homogenat in izvleček hAM zmanjšata stopnjo invazije mišično invazivnih urotelijskih celic T24.

Poleg FAK igra pomembno vlogo pri invaziji tudi N-kadherin, ki sodi v družino od kalcija odvisnih celičnih adhezijskih molekul in lahko tvori homotipične ali heterotipične povezave (Mrozik in sod., 2018). N-kadherin je mezenhimski označevalec EMP ter igra ključno vlogo pri napredovanju raka (Da in sod., 2016). Številne študije so pokazale, da je povečano izražanje N-kadherina v rakavih celicah povezano z agresivnostjo tumorja (Mrozik in sod., 2018). N-kadherin namreč spodbuja kolektivno celično migracijo, s čimer sodeluje pri širjenju tumorja v oddaljena tkiva (Friedl in Gilmour, 2009; Klymenko in sod., 2017; Kuriyama in sod., 2016; Trepac in Fredberg, 2011). Hulit in sodelavci so pokazali, da N-kadherin aktivira signalno kaskado MAPK/ERK, kar poveča izražanje MMP in posledično vodi v povišano celično migracijo in invazijo (Hulit in sod., 2007). Znano je tudi, da je povečano izražanje N-kadherina povezano s slabšo prognozo bolnikov z rakom prostate (Drivalos in sod., 2016), pljuč (Hui in sod., 2013) in sečnega mehurja (Muramaki in sod., 2012).

Elie-Caille in sodelavci so ugotovili, da je zmanjšanja stopnja migracije mišično invazivnih urotelijskih celic T24 posledica inhibicije N-kadherina (Elie-Caille in sod., 2020). Naša raziskava je pokazala, da homogenat hAM močno zniža izražanje N-

kadherina tako na genski kot tudi na proteinski ravni. Izvleček hAM nekoliko zmanjša izražanje gena *CDH2*, vendar pa na proteinski ravni nismo opazili nobene razlike med tretiranimi in kontrolnimi celicai. Razlog za neskladnost bi lahko bilo dejstvo, da translacija iz mRNA v funkcionalni protein še ni potekla, zaradi česar bi morali izvesti še dodatne študije, s katerimi bi preverili, ali izvleček hAM vpliva na izražanje N-kadherina po dolgotrajnejšem tretiranju (npr. 72h). Ugotovitev, da homogenat hAM zmanjša izražanje N-kadherina se sklada z rezultati naše predhodne študije, v kateri smo dokazali, da nosilci iz hAM zmanjšajo izražanje N-kadherina v rakavih urotelijskih celicah T24 rastočih na teh nosilcih (Ramuta in sod., 2020a). Skupaj naši rezultati nakazujejo na dejstvo, da homogenat hAM zmanjša invazijo rakavih celic T24 tudi z regulacijo izražanja N-kadherina. Poleg tega zmanjšanje v izražanju N-kadherina sproži prehod iz kolektivnega v individualni način celične migracije in posledično zmanjša invazivni/metastatski potencial rakavih celic T24.

Poleg vpliva na N-kadherin smo v doktorski nalogi ocenili tudi učinek homogenata in izvlečka hAM na izražanje in aktivnost MMP-2 v celicah T24. MMP spadajo v družino od cinka odvisnih endopeptidaz, ki sodelujejo pri razgradnji različnih celičnih adhezijskih molekul, s čimer uravnavajo medcelične interakcije in interakcije med celicami in medceličnino (Gialeli in sod., 2011). Celice sintetizirajo in izločajo MMP v obliki neaktivnih proencimov (pro-MMP), ki se nato v zunajceličnem prostoru aktivirajo s proteolitično odstranitvijo propeptidne domene (Egeblad in Werb, 2002). Izražanje MMP je povezano z agresivnostjo tumorja, stadijem bolezni in prognozo bolnika (Cathcart in sod., 2015). MMP sodelujejo pri migraciji, invaziji in metastaziranju tumorskih celic, s čimer spodbujajo napredovanje raka (Egeblad in Werb, 2002). MMP-2 ali želatinaza A je ena od MMP, ki je pogosto povezana z rakom sečnega mehurja (Rodriguez Faba in sod., 2012). Študije so namreč pokazale, da sta v primerjavi z normalnim tkivom, izražanje in aktivnost MMP-2 povečani v celicah raka sečnega mehurja (Davies in sod., 1993; Mohammad in sod., 2010).

Naši rezultati so pokazali, da homogenat in izvleček hAM znižata izražanje MMP-2 tako na genski kot tudi na proteinski ravni. Z želatinsko cimoografijo smo dokazali, da pripravka iz hAM ne vplivata le na znotrajcelično koncentracijo MMP-2, ampak tudi na količino in aktivnost zunajcelične MMP-2. Ugotovili smo, da pripravka iz hAM zmanjšata količino izločene pro-oblike MMP-2 že 2 uri po končanem tretiranju. Zmanjšano količino pro-oblike MMP-2 smo opazili tudi 24-ur po končanem tretiranju s pripravki iz hAM, še zlasti pri celicah T24, ki so bile izpostavljene homogenatu hAM. Poleg tega smo ugotovili, da pripravka iz hAM vplivata na aktivnost MMP-2. Ugotovili smo, da 24 ur po končanem tretiranju celice T24, ki so bile izpostavljene homogenatu hAM, izločajo značilno manj aktivne oblike MMP-2. Zmanjšano izločanje aktivne oblike MMP-2 smo opazili tudi v celicah T24, ki so bile tretirane z izvlečkom hAM, a v manjši meri. Na osnovi tega sklepamo, da pripravka iz hAM vplivata na invazijo rakavih celic T24 preko regulacije izražanja in aktivnosti MMP-2. Na podlagi naših dosedanjih

rezultatov in rezultatov drugih raziskovalcev predvidevamo, da znižano izražanje in fosforilacija FAK zmanjšata nastanek kompleksa FAK/p130Cas, ki uravnava izražanje in aktivnost MMP-2 (Van Slambrouck in sod., 2007). Druge študije so pokazale, da FAK spodbuja izražanje transmembranske MT1-MMP, ki katalizira pretvorbo MMP-2 iz pro v aktivno obliko, zaradi česar bi njegovo zaviranje zmanjšalo nastanek aktivnega encima (Wu in sod., 2005). Na podlagi teh rezultatov menimo, da bi morali izvesti še dodatne študije, s katerimi bi preverili, ali pripravka iz hAM z inhibicijo FAK, vplivata na izražanje in aktivnost MT1-MMP.

Aktivnost MMP-2 je regulirana tudi preko tkivnih inhibitorjev MMP (TIMP). TIMP-2 se v presežku lahko veže na MT1-MMP in na obe obliki MMP-2 ter jih tako inhibira (Lu in sod., 2004; Yadav in sod., 2014). Nasprotno pa je v nizkih koncentracijah TIMP-2 bistven za učinkovito aktivacijo MMP-2 (Lu in sod., 2004). TIMP-2 deluje kot most med MT1-MMP in MMP-2, saj se z N-končno domeno veže na MT1-MMP in s C-končno domeno na pro-MMP-2. Ta vezava omogoča drugi sosednji MT1-MMP, ki nima nase vezane molekule TIMP-2, učinkovito cepitev prodomene MMP-2 (Egeblad in Werb, 2002). Zaradi dvojne narave TIMP-2 lahko majhni premiki v ravnovesju MMP-2/TIMP-2 olajšajo napredovanje tumorja in vplivajo na ponoven pojav bolezni (Lu in sod., 2004; Ricci in sod., 2015). V ta namen smo želeli preveriti, ali je zmanjšana prisotnost aktivne oblike MMP-2 posledica inhibicije s TIMP-2. Kljub temu da je v dveh urah po končanem tretiranju homogenat hAM povečal izločanje TIMP-2 iz celic T24, je bila koncentracija izločenega TIMP-2 relativno nizka v primerjavi s koncentracijo TIMP-2 po 24 urah. Ta rezultat kaže, da aktivacija MMP-2 s strani kompleksa MT1-MMP/TIMP-2 poteče v kasnejši časovni točki, kar se sklada z rezultati želatinske cimoigrafije, s katerimi smo dokazali prisotnost aktivne oblike šele 24 ur po končanem tretiranju. V isti časovni točki (24 ur po končanem tretiranju) smo ugotovili, da pripravka iz hAM povečata količino izločenega TIMP-2. Na podlagi teh rezultatov sklepamo, da ima povečano izločanje TIMP-2 zaviralno funkcijo, saj smo pri celicah T24, ki so bile tretirane s pripravki iz hAM, zaznali manj aktivne oblike MMP-2.

V naši raziskavi smo ocenili tudi učinek pripravkov iz hAM na TIMP-2 v urotelijskih celicah papiloma RT4 in celicah NPU, kljub temu da gre za neinvadirajoče celice. Ugotovili smo, da celice NPU izločajo nekoliko manj TIMP-2 kot celice T24, medtem ko celice RT4 izločajo bistveno manjšo količino v primerjavi z ostalima proučevanima tipoma urotelijskih celic. Ti rezultati se skladajo z rezultati *in vitro* modela celjenja rane, s katerimi smo pokazali, da celice RT4 migrirajo najpočasneje od ostalih dveh proučevanih tipov urotelijskih celic. Rezultati metode ELISA so pokazali, da homogenat hAM poveča količino izločenega TIMP-2 iz celic RT4 v vseh časovnih točkah (2 in 24 ur po končanem tretiranju). Podoben trend smo opazili tudi v celicah NPU, saj smo ugotovili, da pripravka iz hAM povečata izločanje TIMP-2. S temi rezultati smo pokazali, da lahko pripravka iz hAM delujeta preventivno in preprečita transformacijo urotelijskih celic papiloma ali normalnih celic v mišično invazivno obliko s povečanjem izločanja inhibitorja TIMP-2.

5.7 HOMOGENAT HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE SE PRITRDI NA POVRŠINO RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC, NE PA TUDI NA POVRŠINO NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC

Z vrstično in presevno elektronsko mikroskopijo smo ugotovili, da se homogenat hAM kljub močnemu spiranju, pritrdi in prekrije večji del površine celic T24 in RT4 po 24-urnem in 72-urnem tretiranju (Janev in sod., 2021). S presevno elektronsko mikroskopijo smo ugotovili, da se homogenat hAM ne le veže na površino celic T24, temveč se tudi vrine v medcelične prostore. Naša raziskava je pokazala, da homogenat hAM ne vpliva bistveno na ultrastrukturo mišično invazivnih urotelijskih celic T24, vendar smo opazili večje medcelične prostore med tretiranimi celicami v primerjavi s kontrolnimi. Za razliko od celic T24 se je homogenat hAM pritrdil samo na površinsko plast celic RT4 ter se ni vrinil med nižje celične plasti, a smo hkrati opazili, da je homogenat hAM povzročil luščenje površinske plasti celic RT4 na naključnih mestih. Po drugi strani pa smo ugotovili, da homogenat hAM ne vpliva na ultrastrukturo urotelijskih celic papiloma RT4, saj so celice ohranile epiteljsko morfologijo.

Pokazali smo, da se v nasprotju z učinkom na rakave urotelijske celice homogenat hAM ne pritrdi na površino normalnih urotelijskih celic. Ugotovili smo, da celice NPU ohranijo epiteljsko morfologijo med celotnim obdobjem tretiranja. Razlike v pritrjevanju homogenata hAM pripisujemo razlikam v kemični strukturi in fluidnosti plazmaleme med normalnimi in rakavimi urotelijskimi celicami (Yu in sod., 2016). Naša raziskovalna skupina je namreč dokazala, da plazmalema rakavih urotelijskih celic vsebuje več domen, ki so bogate s holesterolom in holesterolom/sfingomielinom, kot plazmalema normalnih urotelijskih celic (Resnik in sod., 2015). Poleg tega rakave urotelijske celice izražajo različne celične receptorje (npr. integrine) kot normalne urotelijske celice, ki so največkrat prekomerno izraženi in sodelujejo pri prenosu signala med celicami ter medceličnino (Grossman in sod., 2000; Liu in sod., 2020; Vallo in sod., 2017). Zato so potrebne nadaljnje študije, ki bodo pojasnile mehanizem pritrjevanja homogenata hAM na površino rakavih celic.

5.8 PROTIRAKAVI UČINEK HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE JE ODVIŠEN OD TIPA RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC IN UPORABLJENEGA PRIPRAVKA

V doktorski nalogi smo pokazali, da je učinek pripravkov iz hAM odvisen od tipa rakavih urotelijskih celic. Domnevamo, da razlike v učinku izhajajo iz dejstva, da imajo rakave urotelijske celice različne biološke lastnosti. V preglednici 20 smo povzeli glavne morfološke in molekularne značilnosti mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in urotelijskih celic papiloma RT4.

Preglednica 20. Povzetek značilnosti mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in urotelijskih celic papiloma RT4.

| Celična linija | Izvor | Morfologija | Način migracije | Molekularno-genetske značilnosti |
|----------------|--|-------------|----------------------------------|--|
| T24 | Visoko maligni karcinom humanega urotelija | Mezenhimska | Kolektivna mezenhimska migracija | Mutacija v tumorsupresorskih genih <i>PTEN</i> (N481/G44G) in <i>TP53</i> (c.378C>G) (Earl in sod., 2015) Izražanje adherentnega proteina N-kadherina (Elie-Caille in sod., 2020; Železnik, 2016) Prisotnost fuzijskega gena <i>FGFR3-TACC3</i> (Earl in sod., 2015) |
| RT4 | Humani urotelijski papilom | Epitelijska | Kolektivna epitelijska migracija | Izražanje adherentnega proteina E-kadherin (Elie-Caille in sod., 2020; Železnik, 2016). Izražanje tesnostičnega proteina okcludina (Železnik, 2016) |

Naša študija je pokazala, da je protirakavi učinek odvisen tudi od uporabljenega pripravka. Homogenat hAM je namreč povzročil večje luščenje rakavih urotelijskih celic kot izvleček hAM. Prav tako je homogenat hAM v večji meri inhibiral migracijo in invazijo rakavih urotelijskih celic. Te protirakave učinke smo dodatno potrdili z molekularnimi analizami, s katerimi smo pokazali, da homogenat hAM v večji meri inhibira izražanje FAK in proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR. Poleg tega je homogenat hAM bolj učinkovito zmanjšal izražanje posameznih proteinov, ki sodelujejo pri preoblikovanju aktinskega citoskeleta ter proteinov fokalnih stikov. Ugotovili smo tudi, da v primerjavi z izvlečkom hAM, homogenat hAM bolj učinkovito zavira izražanje označevalcev EMP.

Na osnovi rezultatov doktorske naloge sklepamo, da sestava homogenata hAM prispeva k večjemu protirakavemu učinku. Homogenat hAM vsebuje delce medceličnine, kjer bi lahko bile ujete protirakave učinkovine. Poleg tega homogenat hAM vsebuje ostanke celic hAM, ki bi lahko postopoma sproščale dodatne protirakave učinkovine. Oba pripravka iz hAM vsebujeta različne celične organele in topne faktorje, ki imajo potencialen protirakav učinek.

Menimo, da bi morale biti prihodnje študije usmerjene k identifikaciji protirakavih

molekul v pripravkih iz hAM, kar bi lahko prispevalo k lažjemu prehodu iz predkliničnih v klinične študije. Analiza proteoma pripravkov iz hAM s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS) je ena izmed tehnik, s katero bi lahko ugotovili razlike v prisotnosti aktivnih protirakavih spojin v homogenatu in izvlečku hAM.

5.9 PRIPRAVKA IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE NIMATA ŠKODLJIVEGA UČINKA NA NORMALNE UROTELIJSKE CELICE

V poskusih smo uporabili visoko diferencirane celice NPU, ki imajo številne molekularne, ultrastrukturne in fiziološke značilnosti, zelo podobne tistim pri normalnih človeških urotelijskih celicah, katerih pridobivanje je zelo težavno (Janev in sod., 2021; Kreft in sod., 2010a; Resnik in sod., 2018; Zupančič in sod., 2018).

Naša študija je pokazala, da v nasprotju z rakavimi urotelijskimi celicami niti homogenat hAM niti izvleček hAM ne sprožita luščenja normalnih urotelijskih celic NPU. Celice NPU so namreč ostale pritrjene na podlago po tridnevem 24-urnem oziroma 2-urnem tretiranju s homogenatom hAM ali izvlečkom hAM. Ugotovili smo tudi, da oba pripravka ne znižata izražanja FAK in p-FAK tako na proteinski kot tudi na genski ravni. Poleg tega smo pokazali, da pripravka iz hAM ne znižata izražanja genov in proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR, kar je verjetno ključni mehanizem, ki preprečuje luščenje normalnih urotelijskih celic od podlage.

Z *in vitro* modelom celjenja rane smo spremljali sposobnost migracije celic NPU po tretiranju s pripravki iz hAM. Hitro zaraščanja poškodbe je izrednega pomena za normalno funkcijo sečnega mehurja, saj poškodbe urotelija lahko porušijo krvno-urinsko pregrado, kar lahko privede do neregulirane izmenjave vode in različnih toksinov med urinom in krvjo.

Ugotovili smo, da je učinek pripravkov iz hAM na migracijo normalnih urotelijskih celic drugačen kot pri rakavih urotelijskih celicah. Homogenat in izvleček hAM sta namreč po 6 urah upočasnila migracijo celic NPU, pri čemer pa je njun zaviralni učinek izzvenel po 24 urah, saj so tretirane celice uspešno prerastle rano. Pokazali smo tudi, da pripravka iz hAM ne vplivata na način in morfologijo migrirajočih normalnih urotelijskih celic, saj s homogenatom in izvlečkom hAM tretirane celice NPU, ohranijo epiteljsko morfologijo ter migrirajo kolektivno. Poleg vpletenosti pri invaziji in metastaziranju tumorja, pride do kolektivne celične migracije tudi v procesu celjenja rane. To je kompleksen celično-biološki proces, potreben za obnovo poškodovanega tkiva. Pri kolektivni migraciji epiteljske celice migrirajo v skupkih ter ohranjajo tesno medcelično povezavo (Grada in sod., 2017; Li in sod., 2013;). Naša raziskava je torej pokazala, da proces celjenja rane normalnih urotelijskih celicah ni oslavljen po tretiranju s pripravki iz hAM.

Naši rezultati *in vitro* modela celjenja rane se nekoliko razlikujejo od rezultatov drugih

raziskovalcev, ki so v svojih študijah uporabili druge normalne celične linije in pripravke iz hAM. Raziskovalci so pokazali, da koščki hAM spodbujajo migracijo človeških kožnih keratinocitov (HaCaT) in kunčjih pljučnih epitelijskih celic Mv1Lu (Alcaraz in sod., 2015; Bernabé-García in sod., 2017; Ruiz-Cañada in sod., 2018). Na podlagi teh rezultatov domnevamo, da je učinek na migracijo odvisen od uporabljenega pripravka hAM, tipa normalnih celic, stopnje njihove diferenciacije in uporabljenega *in vitro* modela za proučevanje celjenja rane. Naša raziskovalna skupina je namreč pokazala, da uporaba hAM kot presadka omogoča hitro regeneracijo urotelija po izzvani poškodbi. V tej študiji smo ustvarili *ex vivo* model poškodovanega urotelija ter spremljali čas regeneracije urotelijskega tkiva na nosilcu hAM, apliciranem na mestu globoke poškodbe (do vezivnega tkiva) (Jerman in sod., 2014a; Jerman in sod., 2020). V doktorski nalogi smo uporabili *in vitro* model celjenja rane ter opazili, da se način zaraščanja rane med dvema modeloma nekoliko razlikuje. Pri *in vitro* modelu celjenja rane se je diferencirana, večskladna kultura celic NPU premikala kolektivno. Pri *ex vivo* modelu pa smo opazili, da nosilce iz hAM najprej prerastejo bazalne urotelijske celice, ki se nato pomnožijo in diferencirajo v vmesne in površinske terminalno diferencirane urotelijske celice. Ker gre za različne metode bi morali v naših *in vitro* modelih celjenja rane uporabiti enoskladno kulturo nediferenciranih bazalnih celic NPU in oceniti vpliv pripravkov iz hAM na njihovo migracijo.

Kljub temu da pripravka iz hAM ne povečata migracije normalnih celic, smo v doktorski nalogi dokazali, da pripravka iz hAM ne sprožata luščenje normalnih urotelijskih celic in ne vplivata na izražanje FAK, p-FAK ter na ostale proteine, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR. Ti rezultati skupaj z rezultati prejšnje študije, kjer smo pokazali da homogenat hAM ne zmanjša preživetja celic NPU tudi po 7-dnevem tretiranju (Janev in sod., 2021), dodatno potrjujejo hipotezo, da pripravka iz hAM nimata škodljivega učinka na normalne urotelijske celice.

5.10 PRIPRAVKA IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE V NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC PO POŠKODBI IN PO ZACELITVI RANE NE VPLIVATA NA IZRAŽANJE FAK, P-FAK IN NA PROTEINE KI SO DEL SIGNALNE POTI PI3K/AKT/MTOR, VENDAR ZMANJŠATA IZRAŽANJE NEKATERIH PROTEINOV, KI SO VPLETENI V REORGANIZACIJO AKTINSKEGA CITOSKELETA

Ko smo ugotovili, da homogenat in izvleček hAM upočasni migracijo normalnih urotelijskih celic NPU, smo želeli tudi preveriti, katere signalne molekule so vpletene v ta proces. Ugotovili smo, da 6 ur po izzvani poškodbi, pripravka iz hAM upočasni stopnjo migracije celic NPU z znižanjem izražanja proteinov, ki sodelujejo pri preoblikovanju aktinskega citoskeleta, in sicer RhoA, RhoC, Cdc42 in Rac1/2/3. Njun zaviralni učinek na izražanje zgoraj naštetih proteinov je izzvenel po 24 urah od izzvane rane, kar je v skladu z rezultati *in vitro* modela celjenja rane, kjer smo pokazali, da celice NPU po 24-urnem tretiranju uspešno prerastejo rano.

Naša raziskava je tudi pokazala, da po izzvani poškodbi in po njeni zacelitvi, pripravka iz hAM ne spodbujata EMP normalnih urotelijskih celic, saj z obstoječimi metodami in izbranim *in vitro* modelom nismo dokazali sprememb v izražanju FAK, p-FAK ter ostalih proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR. Mnoge študije so pokazale, da je ta signalna pot vpletena pri razvoju rakavih obolenj (Polivka in Janku, 2014; Porta in sod., 2014), vključno z rakom sečnega mehurja (Ching in Hansel, 2010; Juan in sod., 2022). Rezultati doktorske naloge potrjujejo, da pripravka iz hAM nimata škodljivega učinka na normalne urotelijske celice niti po kratkotrajnem tretiranju (6 in 24 ur) niti v primeru dolgotrajnega tretiranja (72 ur), kar je pomembno izhodišče k potencialni uporabi pripravkov iz hAM v terapevtske namene.

5.11 DOPRINOS K ZNANOSTI IN PERSPEKTIVE ZDRAVLJENJA RAKA SEČNEGA MEHURJA S PRIPRAVKI IZ HUMANE AMNIJSKE MEMBRANE

Kljub velikemu napredku na področju zdravljenja raka, predvsem na področju sistemskih bioloških zdravljenj, radioterapije in kirurgije, rak ostaja drugi najpogostejši vzrok smrti z visoko stopnjo obolevnosti v razvitem svetu (Nagai in Kim, 2017). Zaradi tega so novi in učinkovitejši pristopi zdravljenja rakavih obolenj nujni. Uporaba hAM za zdravljenje raka je ena od obetavnih idej, ki se je pojavila v zadnjih letih.

V sklopu doktorske naloge smo proučili učinek pripravkov iz hAM, tj. homogenata in izvlečka, pri uravnavanju različnih signalnih molekul, ki vodijo EMP normalnih in rakavih urotelijskih celic. Pokazali smo, da imata pripravka iz hAM, predvsem homogenat hAM, številne lastnosti, ki bi bile koristne pri zdravljenju raka sečnega mehurja. Na podlagi protirakavih lastnosti (zmanjšane zmožnosti pritrjevanja, proliferacije, migracije in invazije rakavih urotelijskih celic ter povečano luščenje s podlage) sklepamo, da bi lahko homogenat hAM uporabili pri intravezikalni terapiji po transuretralni resekciji tumorjev sečnega mehurja, podobno kot se trenutno uporabljata intravezikalna kemoterapija ali imunoterapija z BCG. Po podatkih Evropske organizacije za raziskave in zdravljenje raka (EORTC) bi bolnikom z NMIBC z visokim tveganjem napredovanja poleg BCG koristilo dodatno intravezikalno sredstvo, saj zdravljenje z BCG bodisi ne uspe bodisi je kontraindicirano pri nekaterih bolnikih (Porten in sod., 2015; Sylvester in sod., 2006). Zaradi dejstva, da homogenat hAM zmanjša zmožnost pritrjevanja rakavih urotelijskih celic, bi takojšnja intravezikalna instilacija (vbrizgavanje) homogenata hAM po TURBT lahko preprečila ponovno implantacijo rakavih celic, ki so prisotne v urinu zaradi kirurškega posega. Potencial uporabe homogenata hAM pri intravezikalni terapiji dodatno podpira dejstvo, da se ta veže na rakave, ne pa tudi na normalne urotelijske celice. Homogenat hAM bi z vezavo na celične receptorje prepoznal majhne tumorje ali rakave celice, ki se nahajajo v predelih med tumorskim in normalnim tkivom ter posledično zavrl njihovo proliferacijo, migracijo in invazijo. Intravezikalna aplikacija kemoterapevtikov lahko poškoduje tudi normalno okoliško tkivo, kar privede do pojava toksičnih in neželenih učinkov. Da bi se izognili

škodljivim učinkom, ki se pojavijo kot posledica delovanja kemoterapevtikov na normalno okoliško tkivo, bi lahko kot sredstvo za dostavo kemoterapevtikov uporabili homogenat hAM, saj je naša raziskava pokazala, da se ta specifično veže na rakave celice. Uporabo homogenata hAM kot orodja za dostavo zdravil podpira več študij, v katerih so pokazali, da hAM uspešno absorbira antibiotike, nanodelce in druga zdravila (Francisco in sod., 2020; Li in sod., 2012; Ramuta in sod., 2020b; Resch in sod., 2010; Resch in sod., 2011; Yelchuri in sod., 2017). Poleg tega smo nedavno pokazali, da homogenat hAM deluje protimikrobno proti najpogostejšim uropatogenim bakterijam in bakterijam, ki so odporne na antibiotike (Ramuta in sod., 2020b; Ramuta, 2020; Ramuta in sod., 2021; Šket in sod., 2019). Tako bi uporaba homogenata hAM lahko preprečila okužbe sečil, ki se pogosto pojavljajo med zdravljenjem raka sečnega mehurja (Flores-Mireles in sod., 2015; Wang in sod., 2019)

Z našo raziskavo smo prispevali k celovitejšemu poznavanju signalnih poti, ki so vpletene v protirakavo delovanje hAM in v regeneracijo urotelija po poškodbi. Pokazali smo, da v mišično invazivnih celicah T24, pripravka iz hAM delujeta protirakavo preko inhibicije signalne poti FAK/PI3K/Akt/mTOR in z zmanjšanjem izražanja proteinov fokalnih stikov ter proteinov, ki sodelujejo pri reorganizaciji aktinskega citoskeleta. V papilarnih urotelijskih celicah sta pripravka iz hAM delovala preko inhibicije izražanja FAK, p-FAK. Ugotovili smo, da so pri regeneraciji urotelija po poškodbi vpleteni različni proteini, ki sodelujejo pri reorganizaciji aktinskega citoskeleta, kot so RhoA, RhoC, Cdc42 in Rac1/2/3. Pokazali smo, da imata homogenat in izvleček hAM več načinov delovanja na rakave urotelijske celice, vendar pa bodo potrebne dodatne *in vivo* študije, ki bodo ovrednotile varnost uporabe hAM v urologiji. Prav tako bo potrebno identificirati molekule znotraj pripravkov iz hAM, ki učinkujejo protirakavo. Poleg tega menimo, da bi morale biti prihodnje študije usmerjene v raziskovanje učinka homogenata hAM v kombinaciji z različnimi zdravili, kot so inhibitorji FAK ali kemoterapevtiki na osnovi cisplatina, ki ostajajo zlati standard za zdravljenje raka sečnega mehurja. Poglobljeno razumevanje multimodalnega protirakavega mehanizma delovanja hAM ne bo le omogočilo razvoja novih terapevtskih pristopov, temveč tudi ključen vpogled v celično-biološke mehanizme, ki so vpletene pri nastanku raka sečnega mehurja.

6 SKLEPI

Najpomembnejše ugotovitve doktorske disertacije smo povzeli v naslednjih točkah:

- I. Homogenat hAM povzroči luščenje mišično invazivnih urotelijskih celic T24, zmanjša njihovo zmožnost pritrjevanja ter preko inhibicije ciklina D1 zavira njihovo proliferacijo. Poleg tega zavira tudi njihovo stopnjo migracije in invazije. Eden izmed mehanizmov protirakavega delovanja homogenata hAM je inhibicija FAK in p-FAK ter posledično zmanjšanje izražanja genov in proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24. Homogenat hAM zmanjša tudi izražanje proteinov Cdc42 in Rac1/2/3, ki sta vpletena v reorganizacijo aktinskega citoskeleta. Homogenat hAM prav tako zmanjša izražanje proteinov fokalnih stikov, in sicer paksilina, talina-1 in tenzina-2. Homogenat hAM zmanjša tudi izražanje nekaterih označevalcev EMP (N-kadherin in MMP-2) ter rahlo poviša izločanje TIMP-2. Homogenat hAM se pritrdi na površino mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in se vrine v medcelične prostore.
- II. Izvleček hAM povzroči luščenje mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in zavira njihovo stopnjo migracije. Čeprav v manjši meri kot homogenat hAM, izvleček hAM zmanjša izražanje FAK, in posameznih proteinov, ki so del signalne kaskade PI3K/Akt/mTOR v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24. Prav tako izvleček hAM zmanjša izražanje nekaterih proteinov fokalnih stikov, in sicer talina-1 in tenzina-2. Poleg tega izvleček hAM zmanjša izražanje in aktivnost MMP-2 ter rahlo poviša izločanje TIMP-2.
- III. Homogenat hAM povzroči luščenje neinvazivnih urotelijskih celic papiloma RT4 in zmanjša njihovo zmožnost pritrjevanja. Prav tako zavira njihovo proliferacijo in migracijo. Eden izmed mehanizmov protirakavega delovanja homogenata hAM v urotelijskih celicah papiloma RT4 je inhibicija FAK in p-FAK ter proteinov Cdc42 in Rac1/2/3, ki sta vpletena v reorganizacijo aktinskega citoskeleta. Zunajcelični matriks homogenata hAM se pritrdi na površino papilarnih urotelijskih celic in zmanjša število celičnih plasti. To kaže, da homogenat hAM sproži luščenje celic RT4.
- IV. Izvleček hAM zavira migracijo neinvazivnih urotelijskih celic papiloma RT4. Zmanjša tudi izražanje FAK, Cdc42 in Rac1/2/3, vendar v manjši meri kot homogenat hAM.
- V. Način priprave in čas tretiranja s homogenatom in izvlečkom hAM vplivata na odstotek odluščenih rakavih urotelijskih celic. Homogenat hAM, pripravljen s homogenizatorjem z rotacijskimi rezili, povzroči največji odstotek luščenja rakavih urotelijskih celic. Kratkotrajno tridnevno 2-urno tretiranje s pripravki iz hAM sproži luščenje mišično invazivnih urotelijskih celic T24, vendar v manjši meri kot dolgotrajno tridnevno 24-urno tretiranje.
- VI. Homogenat in izvleček hAM povzročita prehod iz kolektivne v individualno

celično migracijo in tako spremenita način migracije mišično invazivnih urotelijskih celic T24. Pripravka iz hAM vplivata na migracijo neinvazivnih urotelijskih celic papiloma RT4 tako, da zmanjšata nastanek lamelopodijev in filopodijev vzdolž vodilnega roba migrirajočih celic. Normalne urotelijske celice NPU, tretirane s homogenatom in izvlečkom hAM, migrirajo kolektivno ter ohranijo epiteljsko morfologijo.

- VII. Homogenat in izvleček hAM ne povzročata luščenja normalnih urotelijskih celic. Homogenat hAM se ne pritrdi na površino normalnih urotelijskih celic. Homogenat in izvleček hAM upočasnita migracijo normalnih urotelijskih celic v prvih 6 urah, vendar ta zaviralni učinek izzveni po 24 urah tretiranja.
- VIII. Po izzvani poškodbi ali že po zacelitvi rane tako homogenat kot tudi izvleček hAM ne vplivata na izražanje FAK in p-FAK ter proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR v normalnih urotelijskih celicah.
- IX. V prvih 6 urah po izzvani poškodbi v normalnih urotelijskih celicah tako homogenat kot tudi izvleček hAM zmanjšata izražanje proteinov RhoA, RhoC, Cdc42 in Rac1/2/3, ki so vpleteni v reorganizacijo aktinskega citoskeleta. Njun zaviralni učinek izzveni po 24 urah od ustvarjene rane.
- X. Inhibitorji FAK podobno kot homogenat hAM vplivajo na izražanje proteinov p-FAK, Cdc42, Rac1/2/3 v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24. Poleg tega ima kombinirano tretiranje z izbranimi inhibitorji FAK in homogenatom hAM največji protimigratorni učinek na mišično invazivne urotelijske celice T24.

Hipoteza 1: Pripravki iz hAM vplivajo na signalno pot PI3K/Akt in s tem spodbujajo EMP normalnih urotelijskih celic takoj po poškodbi.

Prvo hipotezo smo ovrgli, saj z uporabljenimi metodološkimi pristopi nismo dokazali značilnih sprememb v signalni poti PI3K/Akt/mTOR v normalnih urotelijskih celicah po tretiranju s homogenatom ali izvlečkom hAM. Ugotovili smo, da 6 ur po poškodbi, pripravka iz hAM upočasnita migracijo normalnih urotelijskih celic z zmanjšanjem izražanja majhnih RhoGTPaz (RhoA, RhoC, Cdc42 in Rac1/2/3). Njun zaviralni učinek na izražanje zgoraj naštetih proteinov izzveni po 24 urah od izzvane rane, kar je v skladu z dejstvom, da celice NPU po 24-urnem tretiranju s pripravki iz hAM, uspešno prerastejo rano.

Hipoteza 2: Pripravki iz hAM vplivajo na signalno pot PI3K/Akt in s tem preprečijo EMP normalnih urotelijskih celic po zacelitvi rane.

Prvi del druge hipoteze smo ovrgli, saj z obstoječimi metodami nismo ugotovili značilnih sprememb v signalni poti PI3K/Akt/mTOR v normalnih urotelijskih celicah po tretiranju

s homogenatom in izvlečkom hAM. Drugi del druge hipoteze smo potrdili, saj smo dokazali, da priprava iz hAM ne spodbujata EMP normalnih urotelijskih celic po zacelitvi rane.

Hipoteza 3: Pripravki iz hAM vplivajo na signalno pot PI3K/Akt in s tem preprečijo EMP urotelijskih celic papiloma.

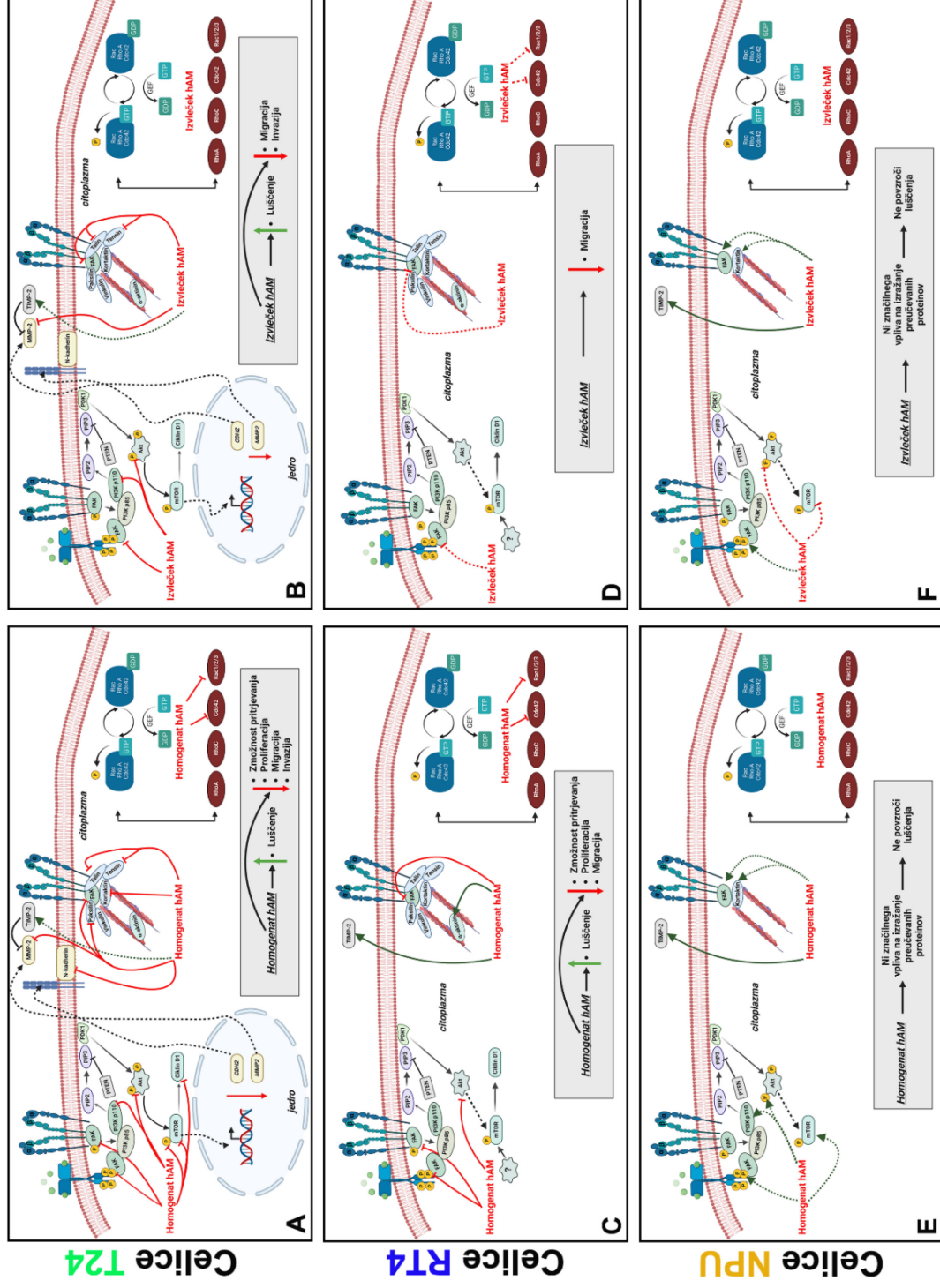
Prvi del tretje hipoteze smo ovrgli, saj smo ugotovili, da priprava iz hAM nimata značilnega vpliva na ostale proteine, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR v urotelijskih celicah papiloma RT4. Drugi del tretje hipoteze smo potrdili, saj smo pokazali, da priprava iz hAM zmanjšata izražanje FAK in p-FAK. Poleg tega smo pokazali, da priprava iz hAM, znižata raven proteinov, ki uravnavajo reorganizacijo aktinskega citoskeleta, kot so Cdc42 in Rac1/2/3. Ugotovili smo, da priprava iz hAM tudi zmanjšata proliferacijo in migracijo urotelijskih celic papiloma RT4, povečata količino izločenega TIMP-2 in tako zavirata EMP urotelijskih celic papiloma.

Hipoteza 4: Pripravki iz hAM vplivajo na signalno pot PI3K/Akt in s tem ustavijo EMP malignih mišično invazivnih urotelijskih celic.

Četrto hipotezo smo potrdili, saj smo dokazali, da v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24 homogenat hAM in izvleček hAM zmanjšata izražanje FAK in p-FAK in posledično znižata izražanje proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR. Poleg tega smo ugotovili, da priprava iz hAM zmanjšata izražanje različnih proteinov fokalnih stikov, vključno s paksilinom, talinom-1 in tenzinom-2. Obenem smo dokazali, da homogenat hAM zmanjša izražanje proteinov, ki sodelujejo pri reorganizaciji aktinskega citoskeleta, in sicer kortaktina, Cdc42 in Rac1/2/3. Ugotovili smo, da homogenat hAM zmanjša stopnjo proliferacije mišično invazivnih celic z inhibicijo izražanja ciklina D1. Homogenat hAM je tudi zmanjšal izražanje označevalcev EMP (N-kadherin in MMP-2). Poleg tega sta priprava iz hAM zmanjšala migracijo in invazijo mišično invazivnih urotelijskih celic ter povečala količino izločenega TIMP-2. Vsi ti rezultati potrjujejo hipotezo, da homogenat in izvleček hAM ustavita EMP malignih mišično invazivnih urotelijskih celic.

Homogenat hAM

Izvlček hAM



Slika 37. Predlagani mehanizem delovanja homogenata in izvlečka hAM na rakave in normalne urotelijske celice. (A, B) Eden izmed mehanizmov protirakavega delovanja homogenata hAM na celice T24 je inhibicija FAK in p-FAK ter posledično zmanjšanje izražanja genov in proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR. Homogenat hAM zmanjša izražanje proteinov fokalnih stikov (paksilin, talin-1 in tenzin-2) ter proteinov, ki so vpleteni v reorganizacijo aktinskega citoskeleta (Cdc42 in Rac1/2/3). Homogenat hAM zmanjša izražanje nekaterih mezenhimskih označevalcev EMP (N-kadherin in MMP-2) ter rahlo poveča izločanje TIMP-2. Čeprav v manjši meri kot homogenat hAM, izvleček hAM tudi zmanjša izražanje FAK in proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR ter zniža ekspresijo talina-1 in tenzina-2. Poleg tega zmanjša izražanje nekaterih proteinov fokalnih stikov, in sicer talina-1 in tenzina-2. Homogenat in izvleček hAM povzročita luščenje mišično invazivnih urotelijskih celic T24 in zmanjšata njihovo migracijo in stopnjo invazije. Poleg tega homogenat hAM dodatno zmanjša njihovo zmožnost pritrjevanja in njihovo proliferacijo preko inhibicije izražanja ciklina D1. (C, D). Homogenat hAM zmanjša proliferacijo in migracijo urotelijskih celic papiloma RT4. Eden izmed mehanizmov protirakavega delovanja homogenata hAM na celice RT4 je inhibicija FAK in p-FAK ter proteinov Cdc42 in Rac1/2/3, ki sta vpletena v reorganizacijo aktinskega citoskeleta. Izvleček hAM zmanjša izražanje FAK, in proteinov Cdc42 ter Rac1/2/3, vendar v manjši meri kot homogenat hAM. Homogenat hAM povzroči luščenje urotelijskih celic papiloma RT4 in zmanjša njihovo zmožnost pritrjevanja. Oba dva pripravka zmanjšata tudi migracijo urotelijskih celic papiloma RT4. (E-F) Pripravka iz hAM nimata škodljivega učinka na normalne urotelijske celice NPU. Neprekinjena rdeča črta predstavlja močno inhibicijo izražanja tarčne molekule. Prekinjena črtkana rdeča puščica označuje zmerno inhibicijo izražanja tarčne molekule. Neprekinjena zelena puščica označuje povečano izražanje tarčne molekule. Prekinjena črtkana zelena puščica označuje zmerno povečanje izražanje tarčne molekule.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Rak sečnega mehurja je kompleksna bolezen, z naraščajočo incidenco in visoko stopnjo ponovljivosti. Kljub velikemu napredku na področju zdravljenja drugih vrst raka, v zadnjih letih ni bilo večjih napredkov pri standardnem zdravljenju raka sečnega mehurja. Posledično so novi in učinkovitejši terapevtski pristopi zdravljenja rakavih obolenj sečnega mehurja nujni. Humana amnijska membrana (hAM) je notranja plast posteljice, ki je v stiku z amnijsko tekočino in med nosečnostjo ščiti plod. Študije so pokazale, da je hAM vir različnih rastnih faktorjev in matičnih celic. Poleg tega ima protivneten, protimikroben in imunomodulatoren učinek. Novejše študije kažejo, da ima hAM tudi protirakav učinek. Kljub naraščajočemu številu študij so celično-biološki mehanizmi njenega protirakavega delovanja slabo poznani.

Cilj doktorske naloge je bil ovrednotiti vlogo pripravkov iz hAM (tj. homogenata in izvlečka hAM) pri uravnavanju specifičnih molekul signalnih poti, ki vodijo epiteljsko-mezenhimski prehod (EMP) urotelijskih celic. V poskusih smo uporabili *in vitro* modele celic trajne celične linije T24, ki izvirajo iz visoko malignega karcinoma humanega urotelija in celic trajne celične linije RT4, ki izvirajo iz neinvazivnega papiloma urotelija. V poskusih smo uporabili tudi *in vitro* model normalnih prašičjih urotelijskih celic NPU, ki so bile izolirane iz normalnih sečnih mehurjev prašičev. Za doseganje raziskovalnih ciljev smo uporabili različne metode celičnega in tkivnega inženirstva, *in vitro* teste migracije in invazivnosti, prenos Western, metode verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR), želatinsko cimoografijo, encimsko-immunski test (ELISA) ter različne tipe svetlobne in elektronske mikroskopije.

Ugotovili smo, da homogenat in izvleček hAM povzročita luščenje rakavih urotelijskih celic, ne pa tudi normalnih urotelijskih celic. Pokazali smo, da je vpliv na luščenje rakavih urotelijskih celic odvisen od časa tretiranja in načina priprave pripravkov iz hAM. Poleg tega je naša raziskava pokazala, da homogenat hAM ne zmanjša le zmožnosti pritrjevanja rakavih urotelijskih celic, ampak tudi njihovo proliferacijo. Ugotovili smo, da homogenat hAM zmanjša proliferacijo mišično invazivnih urotelijskih celic T24 z znižanjem izražanja ciklina D1. Pokazali smo tudi, da priprava iz hAM zavirata migracijo neinvazivnih urotelijskih celic papiloma RT4 in mišično invazivnih urotelijskih celic T24 ter invazijski potencial slednjih.

Naša raziskava je pokazala, da je eden izmed mehanizmov delovanja pripravkov iz hAM zmanjšanje izražanja FAK in p-FAK in ostalih proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24. V urotelijskih celicah papiloma RT4 sta pripravka iz hAM vplivala le na izražanje FAK. Poleg tega smo ugotovili, da homogenat hAM zmanjša izražanje proteinov, ki so vpleteni v

reorganizacijo aktinskega citoskeleta rakavih urotelijskih celic (Cdc42 in Rac1/2/3). Obenem smo tudi pokazali, da uporabljeni ATP-kompetitivni inhibitorji FAK delujejo na iste molekularne tarče (p-FAK, Cdc42 in Rac1/2/3) kot homogenat hAM. Ugotovili smo, da ima kombinacija homogenata hAM in inhibitorjev FAK največji učinek na migracijo mišično invazivnih urotelijskih celic T24. Ko smo odkrili, da je izražanje in fosforilacija FAK pomembna tarča homogenata in izvlečka hAM, smo skušali ovrednotiti tudi njun vpliv na ostale proteine fokalnih stikov. Ugotovili smo, da pripravka iz hAM zmanjšata izražanje paksilina, talina-1 in tenzina-2 v mišično invazivnih urotelijskih celicah T24. Poleg tega smo ugotovili, da je zmanjšana invazivnost rakavih celic T24 posledica inhibicije izražanja N-kadherina in MMP-2 po tretiranju s pripravki iz hAM. Poleg tega smo pokazali, da pripravka iz hAM rahlo povečata količino izločenega TIMP-2.

S pomočjo elektronske mikroskopije smo ugotovili, da se homogenat hAM pritrdi na površino rakavih urotelijskih celic, ne pa tudi na površino normalnih urotelijskih celic. S pomočjo konfokalne mikroskopije smo pokazali, da pripravka iz hAM sprožita prehod iz kolektivne v individualno celično migracijo in tako spremenita način migracije mišično invazivnih urotelijskih celic T24. Ugotovili smo, da pripravka iz hAM vplivata na migracijo urotelijskih celic papiloma RT4 tako, da zmanjšata nastanek lamelopodijev in filopodijev vzdolž vodilnega roba migrirajočih celic. Naša raziskava je tudi pokazala, da so celice NPU, ki so bile tretirane s homogenatom ali izvlečkom hAM, ohranile epiteljsko morfologijo in migrirale kolektivno ter tako obdržale fenotip, ki je nujno potreben za učinkovito celjenje rane normalnega tkiva.

Naša raziskava je pokazala, da pripravka iz hAM ne vplivata na luščenje normalnih urotelijskih celic. Ugotovili smo, da homogenat in izvleček hAM ne vplivata na izražanje proteinov, ki so del signalne poti PI3K/Akt/mTOR v normalnih urotelijskih celicah po poškodbi in zacelitvi rane. Potrdili smo, da v normalnih urotelijskih celicah, v prvih 6 urah po poškodbi, pripravka iz hAM rahlo zmanjšata izražanje proteinov, ki so vpleteni v reorganizacijo aktinskega citoskeleta (RhoA, RhoC, Cdc42 in Rac1/2/3). Ti rezultati so skladni z rezultati *in vitro* modela celjenja ran, kjer smo pokazali, da 6 ur po poškodbi, pripravka iz hAM nekoliko upočasnita stopnjo migracije normalnih urotelijskih celic NPU.

Z našo študijo smo prispevali k celovitejšemu poznavanju signalnih poti, ki so vpletene v protirakavo delovanje hAM in v regeneracijo urotelija po poškodbi. Z analizo izražanja označevalcev fokalnih stikov, migracije, invazije in proliferacije rakavih urotelijskih celic smo pridobili podrobnejši vpogled v celično-biološke mehanizme protirakavega delovanja hAM. Pokazali smo, da imata pripravka iz hAM, predvsem pa homogenat hAM, več načinov delovanja na rakave urotelijske celice. Rezultati doktorske naloge potrjujejo protirakavo delovanje hAM *in vitro*. Nadaljnje predklinične študije na živalih in klinične študije pa bodo ovrednotile varnost njene uporabe v onkološki urologiji.

7.2 SUMMARY

Bladder cancer is a complex disease with increasing incidence and high recurrence rate. Despite major advances in the treatment of other cancers, there has not been much progress in standard treatment options for bladder cancer in recent years. Therefore, there is an urgent need to develop new and more effective therapeutic approaches for the treatment of bladder cancer. The human amniotic membrane (hAM) is an inner layer of the placenta that is in contact with the amniotic fluid and protects the fetus during pregnancy. Studies have shown that hAM is a source of various growth factors and stem cells. It also has anti-inflammatory, antimicrobial and immunomodulatory properties. In recent years, numerous studies have appeared showing that hAM also has an anti-cancer effect. Despite the growing number of studies, the cellular biological mechanisms of its anti-cancer effect are poorly understood.

The aim of the PhD thesis was to investigate the role of hAM preparations (i.e., hAM homogenate and extract) in regulating specific signaling pathway molecules that control epithelial-mesenchymal transition (EMT) of normal and cancer urothelial cells. In the experimental part of the work, we used three cell types: normal porcine urothelial cells (NPU), human bladder transitional cell papilloma cells (RT4), and human muscle-invasive bladder cancer urothelial cells (T24). To achieve the research objectives, we used various cell and tissue engineering methods, in vitro migration and invasion assays, western blot, real-time polymerase chain reaction (qPCR), gelatin zymography, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and various types of light and electron microscopy.

We found that hAM homogenate and extract induced cell detachment of cancer urothelial cells but not of normal urothelial cells. We have also shown that different hAM homogenate preparations caused detachment of cancer urothelial cells in a time-dependent manner. In addition, our research showed that hAM homogenate not only reduced the attachment ability of cancer urothelial cells, but also their proliferation rate. We found that hAM homogenate reduced the proliferation of muscle-invasive urothelial T24 cells by down-regulating the expression of cyclin D1. We also showed that hAM preparations inhibited the migration of non-invasive human bladder transitional cell papilloma RT4 cells and muscle-invasive urothelial T24 cells. In addition, we showed that after the treatment with hAM homogenate and extract, the invasion potential of T24 cells was also decreased.

Our studies have shown that one of the mechanisms of action in T24 cells is through downregulation of genes and proteins that are part of the FAK/PI3K/Akt/mTOR pathway. However, in RT4 cells, only FAK expression was decreased after treatment with hAM homogenate and extract. Furthermore, we found that hAM homogenate decreased the expression of proteins involved in the reorganization of the actin cytoskeleton of cancer

urothelial cells (Cdc42 and Rac1/2/3). At the same time, we showed that FAK inhibitors act on the same molecular targets (p-FAK, Cdc42 and Rac1/2/3) as hAM homogenate. We found that combination of hAM homogenate and FAK inhibitors had the most pronounced anti-migratory effect on muscle-invasive urothelial T24 cells. When we discovered that FAK expression and phosphorylation was the main target of hAM homogenate and extract, we also sought to assess their influence on other proteins present in focal adhesions. We found that hAM preparations increased the expression of paxillin, talin-1 and tensin-2 in T24 cells. In addition, we found that the reduced invasiveness of muscle-invasive urothelial T24 cells is due to the inhibition of N-cadherin and MMP-2 expression after the treatment with hAM preparations. In addition, we have shown that hAM homogenate and extract slightly increase the amount of secreted TIMP-2.

Using electron microscopy, we demonstrated that the hAM homogenate adhered to the surface of cancer urothelial cells but not to the surface of normal urothelial cells. Using confocal microscopy, we showed that preparations of hAM trigger the transition from collective to individual cell migration, thereby altering the migration mode of T24 cells. We found that hAM preparations affect the migration of RT4 cells by reducing the formation of lamellipodia and filopodia along the leading edge of migrating cells. Our studies have shown that NPU cells treated with hAM homogenate and extract maintained their epithelial morphology and migrated collectively, thus retaining a phenotype that is essential for effective wound healing.

We also showed that hAM homogenate and extract did not affect the expression of proteins that are part of the PI3K/Akt/mTOR pathway in normal urothelial cells after injury or after wound healing. However, 6 hours after injury, hAM preparations from hAM slightly reduce the migration rate of normal urothelial NPU cells by downregulating the expression of proteins involved in the reorganization of the actin cytoskeleton (RhoA, RhoC, Cdc42 and Rac1/2/3).

The results of our study have expanded our knowledge of the signaling pathways involved in the anticancer mechanism of hAM and regeneration of urothelium after injury. By analyzing the expression of various markers of focal adhesion, migration, invasion, and proliferation in cancer urothelial cells, we have gained more detailed insight into the cellular biological mechanisms of the anticancer effect of hAM. We have shown that hAM preparations and, in particular, hAM homogenate have multitargeted anticancer effect. Overall, the results of this dissertation support the hypothesis that hAM could be used as a potential treatment option to combat cancer. Nevertheless, additional *in vivo* studies are needed to further investigate the safety profile of hAM in patients with bladder cancer.

8 VIRI

- Aceto N., Bardia A., Miyamoto D. T., Donaldson M. C., Wittner B. S., Spencer J. A., Yu M., Pely A., Engstrom A., Zhu H., Brannigan B. W., Kapur R., Stott S. L., Shioda T., Ramaswamy S., Ting D. T., Lin C. P., Toner M., Haber D. A., Maheswaran S. 2014. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*, 158, 5: 1110–1122
- Aiello N. M., Kang Y. 2019. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *Journal of Experimental Medicine*, 216, 5: 1016–1026
- Aiello N. M., Maddipati R., Norgard R. J., Balli D., Li J., Yuan S., Yamazoe T., Black T., Sahnoud A., Furth E. E., Bar-Sagi D., Stanger B. Z. 2018. EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration. *Developmental cell*, 45, 6: 681–695
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. *Molecular biology of the cell*. 1st ed. New York, Garland Science: 3786 str.
- Alcaraz A., Mrowiec A., Insausti C. L., Bernabe-Garcia A., Garcia-Vizcaino E. M., Lopez-Martinez M. C., Monfort A., Izeta A., Moraleda J. M., Castellanos G., Nicolas F. J. 2015. Amniotic Membrane Modifies the Genetic Program Induced by TGF β s, Stimulating Keratinocyte Proliferation and Migration in Chronic Wounds. *PLoS One*, 10, 8, doi: 10.1371/journal.pone.0135324: 21 str.
- Alfred Witjes J., Lebre T., Comp erat E. M., Cowan N. C., De Santis M., Bruins H. M., Hern andez V., Espin os E. L., Dunn J., Rouanne M., Neuzillet Y., Veskim ae E., van der Heijden A. G., Gakis G., Ribal M. J. 2017. Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *European Urology*, 71, 3: 462–475
- Aquila L., Ohm J., Woloszynska-Read A. 2018. The role of STAG2 in bladder cancer. *Pharmacological Research*, 131: 143–149
- Babjuk M., Burger M., Capoun O., Cohen D., Comp erat E. M., Dominguez Escrig J. L., Gontero P., Liedberg F., Masson-Lecomte A., Mostafid A. H., Palou J., van Rhijn B. W. G., Roupr et M., Shariat S. F., Seisen T., Soukup V., Sylvester R. J. 2022. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma in Situ). *European Urology*, 81, 1: 75–94
- Banerjee A., Lindenmair A., Hennerbichler S., Steindorf P., Steinborn R., Kozlov A. V., Redl H., Wolbank S., Weidinger A. 2018. Cellular and Site-Specific Mitochondrial Characterization of Vital Human Amniotic Membrane. *Cell Transplant*, 27, 1: 3–11
- Banerjee A., Weidinger A., Hofer M., Steinborn R., Lindenmair A., Hennerbichler-Lugscheider S., Eibl J., Redl H., Kozlov A. V., Wolbank S. 2015. Different metabolic activity in placental and reflected regions of the human amniotic membrane. *Placenta*, 36, 11: 1329–1332
- Barlow L., Meyer R., Shelkey E., Faltas B., Rubin M. 2017. Abstract 5941: Integrin

- signaling modulation demonstrates potential therapeutic strategy in bladder cancer using three-dimensional organoid culture. *Cancer Research*, 77, 13: 5941–5941
- Beierle E. A., Massoll N. A., Hartwich J., Kurenova E. V., Golubovskaya V. M., Cance W. G., McGrady P., London W. B. 2008. Focal adhesion kinase expression in human neuroblastoma: immunohistochemical and real-time PCR analyses. *Clinical Cancer Research*, 14, 11: 3299–3305
- Bernabé-García Á., Liarte S., Moraleda J. M., Castellanos G., Nicolás F. J. 2017. Amniotic membrane promotes focal adhesion remodeling to stimulate cell migration. *Scientific Reports*, 7, 1: 15262, doi: 10.1038/s41598-017-15509-z: 12 str.
- Bischoff M., Stachon T., Seitz B., Huber M., Zawada M., Langenbucher A., Szentmáry N. 2017. Growth Factor and Interleukin Concentrations in Amniotic Membrane-Conditioned Medium. *Current Eye Research*, 42, 2: 174–180
- Bouchard V., Demers M. J., Thibodeau S., Laquerre V., Fujita N., Tsuruo T., Beaulieu J. F., Gauthier R., Vézina A., Villeneuve L., Vachon P. H. 2007. Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: differentiation state-specific uncoupling with the PI3-K/Akt-1 and MEK/Erk pathways. *Journal of Cellular Physiology*, 212, 3: 717–728
- Bouton A. H., Riggins R. B., Bruce-Staskal P. J. 2001. Functions of the adapter protein Cas: signal convergence and the determination of cellular responses. *Oncogene*, 20, 44: 6448-6458
- Brabletz T., Kalluri R., Nieto M. A., Weinberg R. A. 2018. EMT in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18, 2: 128–134
- Brierley J. D., Gospodarowicz M. K., Wittekind C. 2017. TNM classification of malignant tumours. 8th ed. Chichester, John Wiley & Sons: 272 str.
- Bu S., Zhang Q., Wang Q., Lai D. 2017. Human amniotic epithelial cells inhibit growth of epithelial ovarian cancer cells via TGFbeta1-mediated cell cycle arrest. *Int Journal of Oncol*, 51, 5: 1405–1414
- Burger M., Catto J. W., Dalbagni G., Grossman H. B., Herr H., Karakiewicz P., Kassouf W., Kiemeny L. A., La Vecchia C., Shariat S., Lotan Y. 2013. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *European Urology*, 63, 2: 234–241
- Burger M., van der Aa M. N., van Oers J. M., Brinkmann A., van der Kwast T. H., Steyerberg E. C., Stoehr R., Kirkels W. J., Denzinger S., Wild P. J., Wieland W. F., Hofstaedter F., Hartmann A., Zwarthoff E. C. 2008. Prediction of progression of non-muscle-invasive bladder cancer by WHO 1973 and 2004 grading and by FGFR3 mutation status: a prospective study. *European Urology*, 54, 4: 835–843
- Calalb M. B., Polte T. R., Hanks S. K. 1995. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Molecular and Cell Biology*, 15, 2: 954–963

- Calalb M. B., Zhang X., Polte T. R., Hanks S. K. 1996. Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 228, 3: 662–668
- Cance W. G., Harris J. E., Iacocca M. V., Roche E., Yang X., Chang J., Simkins S., Xu L. 2000. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clinical Cancer Research*, 6, 6: 2417–2423
- Canel M., Secades P., Garzón-Arango M., Allonca E., Suarez C., Serrels A., Frame M. C., Brunton V., Chiara M. D. 2008. Involvement of focal adhesion kinase in cellular invasion of head and neck squamous cell carcinomas via regulation of MMP-2 expression. *British Journal of Cancer*, 98, 7: 1274–1284
- Canel M., Secades P., Rodrigo J. P., Cabanillas R., Herrero A., Suarez C., Chiara M. D. 2006. Overexpression of focal adhesion kinase in head and neck squamous cell carcinoma is independent of fak gene copy number. *Clinical Cancer Research*, 12, 11: 3272–3279
- Carragher N. O., Westhoff M. A., Fincham V. J., Schaller M. D., Frame M. C. 2003. A novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein: regulation by p42 ERK and Src. *Current Biology*, 13, 16: 1442–1450
- Cary L. A., Han D. C., Polte T. R., Hanks S. K., Guan J. L. 1998. Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *Journal of Cell Biology*, 140, 1: 211–221
- Cathcart J., Pulkoski-Gross A., Cao J. 2015. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. *Genes & Diseases*, 2, 1: 26–34
- Centurione L., Passaretta F., Centurione M. A., Munari S., Vertua E., Silini A., Liberati M., Parolini O., Di Pietro R. 2018. Mapping of the Human Placenta: Experimental Evidence of Amniotic Epithelial Cell Heterogeneity. *Cell Transplant*, 27, 1: 12–22
- Chade D. C., Shariat S. F., Godoy G., Savage C. J., Cronin A. M., Bochner B. H., Donat S. M., Herr H. W., Dalbagni G. 2010. Clinical outcomes of primary bladder carcinoma in situ in a contemporary series. *Journal of Urology*, 184, 1: 74–80
- Chang F., Lee J. T., Navolanic P. M., Steelman L. S., Shelton J. G., Blalock W. L., Franklin R. A., McCubrey J. A. 2003. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, 17, 3: 590–603
- Chang S. S., Boorjian S. A., Chou R., Clark P. E., Daneshmand S., Konety B. R., Pruthi R., Quale D. Z., Ritch C. R., Seigne J. D., Skinner E. C., Smith N. D., McKiernan J. M. 2016. Diagnosis and Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: AUA/SUO Guideline. *Journal of Urology*, 196, 4: 1021–1029
- Chen Q. Y., Xu L. Q., Jiao D. M., Yao Q. H., Wang, Y. Y., Hu H. Z., Wu Y. Q., Song J., Yan J., Wu L. J. 2011. Silencing of Rac1 modifies lung cancer cell migration,

- invasion and actin cytoskeleton rearrangements and enhances chemosensitivity to antitumor drugs. *International journal of molecular medicine*, 28, 5: 769–776
- Cheng L., Zhang S., MacLennan G. T., Williamson S. R., Lopez-Beltran A., Montironi R. 2011. Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice. *Human pathology*, 42, 4: 455–481
- Ching C. B., Hansel D. E. 2010. Expanding therapeutic targets in bladder cancer: the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Laboratory Investigation*, 90, 10: 1406–1414
- Chuang H. H., Zhen Y. Y., Tsai Y. C., Chuang C. H., Hsiao M., Huang M. S., Yang C. J. 2022. FAK in Cancer: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 3, doi.org/10.3390/ijms23031726: 28 str.
- Cirman T., Beltram M., Schollmayer P., Rozman P., Kreft M. E. 2014. Amniotic membrane properties and current practice of amniotic membrane use in ophthalmology in Slovenia. *Cell and Tissue Banking*, 15, 2: 177–192
- Clark A. G., Vignjevic D. M. 2015. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current Opinion in Cell Biology*, 36, 13–22
- Cooper L. A., Shen T. L., Guan J. L. 2003. Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 22: 8030–8041
- Cortesio C. L., Boateng L. R., Piazza T. M., Bennin D. A., Huttenlocher A. 2011. Calpain-mediated proteolysis of paxillin negatively regulates focal adhesion dynamics and cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 12: 9998–10006
- Costanzo L. S. 2013. *Physiology*. 5th ed. Filadelfija, Elsevier Health Sciences: 510 str.
- Cumberbatch M. G. K., Foerster B., Catto J. W. F., Kamat A. M., Kassouf W., Jubber I., Shariat S. F., Sylvester R. J., Gontero P. 2018a. Repeat Transurethral Resection in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A Systematic Review. *European Urology*, 73, 6: 925–933
- Cumberbatch M. G. K., Jubber I., Black P. C., Esperto F., Figueroa J. D., Kamat A. M., Kiemeny L., Lotan Y., Pang K., Silverman D. T., Znaor A., Catto J. W. F. 2018b. Epidemiology of Bladder Cancer: A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018. *European Urology*, 74, 6: 784–795
- Czerniak B., Dinney C., McConkey D. 2016. Origins of Bladder Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11: 149–174
- Da C., Wu K., Yue C., Bai P., Wang R., Wang G., Zhao M., Lv Y., Hou P. 2016. N-cadherin promotes thyroid tumorigenesis through modulating major signaling pathways. *Oncotarget*, 8, 5: 8131–8142
- Davarinejad H. 2015. Quantifications of western blots with ImageJ. Toronto, York University: 4 str.
<http://www.yorku.ca/yisheng/Internal/Protocols/ImageJ.pdf> (28.08.2022)
- Davies B., Waxman J., Wasan H., Abel P., Williams G., Krausz T., Neal D., Thomas D., Hanby A., Balkwill F. 1993. Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *American Association for Cancer*

- Research, 53, 22: 5365–5369
- Deramaut T. B., Dujardin D., Noulet F., Martin S., Vauchelles R., Takeda K., Rondé P. 2014. Altering FAK-paxillin interactions reduces adhesion, migration and invasion processes. *PLoS One*, 9, 3, doi: 10.1371/journal.pone.0092059: 13 str.
- Dhankhar, P. 2014. Homogenization fundamentals. *IOSR Journal of Engineering*, 4, 5: 1-8
- Dongre A., Weinberg R. A. 2019. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20, 2: 69–84
- Dragúňová J., Kabát P., Cucorová V., Hajská M., Koller J. 2019. Deep frozen amniotic membrane used as a scaffold and/or carrier for different cell types. *Cell and Tissue Banking*, 20, 1: 35–48
- Drivalos A., Chrisofos M., Efstathiou E., Kapranou A., Kollaitis G., Koutlis G., Antoniou N., Karanastasis D., Dimopoulos M. A., Bamias A. 2016. Expression of α 5-integrin, α 7-integrin, E-cadherin, and N-cadherin in localized prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 34, 4, doi: 10.1016/j.urolonc.2015.10.016: 8 str.
- Earl J., Rico D., Carrillo-de-Santa-Pau E., Rodríguez-Santiago B., Méndez-Pertuz M., Auer H., Gómez G., Grossman H. B., Pisano D. G., Schulz W. A., Pérez-Jurado L. A., Carrato A., Theodorescu D., Chanock S., Valencia A., Real F. X. 2015. The UBC-40 Urothelial Bladder Cancer cell line index: a genomic resource for functional studies. *BMC genomics*, 16, 403, doi: 10.1186/s12864-015-1450-3: 16 str.
- Eckstein M., Cimadamore A., Hartmann A., Lopez-Beltran A., Cheng L., Scarpelli M., Montironi R., Gevaert, T. 2019. PD-L1 assessment in urothelial carcinoma: a practical approach. *Annals of translational medicine*, 7, 22, doi: 10.21037/atm.2019.10.24: 10 str.
- Efstathiou J. A., Zietman A. L. 2016. *Bladder Cancer. V: Clinical Radiation Oncology*. 4th ed. Gunderson L.L., Tepper J.E. (ur.). Philadelphia, Elsevier: 1096–1120
- Egeblad M., Werb Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 2, 3: 161-174
- ElHeneidy H., Omran E., Halwagy A., Al-Inany H., Al-Ansary M., Gad A. 2016. Amniotic membrane can be a valid source for wound healing. *International Journal of Women's Health*, 8: 225–231
- Elie-Caille C., Lascombe I., Péchery A., Bittard H., Fauconnet S. 2020. Molecular and nanoscale evaluation of N-cadherin expression in invasive bladder cancer cells under control conditions or GW501516 exposure. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 471, 2: 113–127
- Eskandarlou M., Azimi M., Rabiee S., Seif Rabiee M. A. 2016. The Healing Effect of Amniotic Membrane in Burn Patients. *World Journal of Plastic Surgery*, 5, 1: 39–44

- Farhadhosseinabadi B., Farahani M., Tayebi T., Jafari A., Biniazan F., Modaresifar K., Moravvej H., Bahrami S., Redl H., Tayebi L., Niknejad H. 2018. Amniotic membrane and its epithelial and mesenchymal stem cells as an appropriate source for skin tissue engineering and regenerative medicine. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46: 431–440
- Fennell D. A., Baas P., Taylor P., Nowak A. K., Gilligan D., Nakano T., Pachter J. A., Weaver D. T., Scherpereel A., Pavlakakis N., van Meerbeeck J. P., Cedrés S., Nolan L., Kindler H., Aerts J. 2019. Maintenance Defactinib Versus Placebo After First-Line Chemotherapy in Patients With Merlin-Stratified Pleural Mesothelioma: COMMAND-A Double-Blind, Randomized, Phase II Study. *Journal of Clinical Oncology*, 37, 10: 790–798
- Figuroa J. D., Ye Y., Siddiq A., Garcia-Closas M., Chatterjee N., Prokunina-Olsson L., Cortessis V. K., Kooperberg C., Cussenot O., Benhamou S., Prescott J., Porru S., Dinney C. P., Malats N., Baris D., Purdue M., Jacobs E. J., Albanes D., Wang Z., Deng X., Chung C. C., Tang W., Bas Bueno-de-Mesquita H., Trichopoulos D., Ljungberg B., Clavel-Chapelon F., Weiderpass E., Krogh V., Dorransoro M., Travis R., Tjønneland A., Brenan P., Chang-Claude J., Riboli E., Conti D., Gago-Dominguez M., Stern M. C., Pike M. C., Van Den Berg D., Yuan J. M., Hohensee C., Rodabough R., Cancel-Tassin G., Roupert M., Comperat E., Chen C., De Vivo I., Giovannucci E., Hunter D. J., Kraft P., Lindstrom S., Carta A., Pavanello S., Arici C., Mastrangelo G., Kamat A. M., Lerner S. P., Barton Grossman H., Lin J., Gu J., Pu X., Hutchinson A., Burdette L., Wheeler W., Kogevinas M., Tardón A., Serra C., Carrato A., García-Closas R., Lloreta J., Schwenn M., Karagas M. R., Johnson A., Schned A., Armenti K. R., Hosain G. M., Andriole G, Jr., Grubb R, 3rd., Black A., Ryan Diver W., Gapstur S. M., Weinstein S. J., Virtamo J., Haiman C. A., Landi M. T., Caporaso N., Fraumeni J. F, Jr., Vineis P., Wu X., Silverman D. T., Chanock S., Rothman N. 2014. Genome-wide association study identifies multiple loci associated with bladder cancer risk. *Human Molecular Genetics*, 23, 5: 1387-1398
- 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
- Frame M. C., Patel H., Serrels B., Lietha D., Eck M. J. 2010. The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 11: 802–814
- Francisco J. C., Uemura L., Simeoni R. B., da Cunha R. C., Mogharbel B. F., Simeoni P. R. B., Naves G., Napimoga M. H., Noronha L., Carvalho K. A. T., Moreira L. F. P., Guarita-Souza L. C. 2020. Acellular Human Amniotic Membrane Scaffold with 15d-PGJ nanoparticles in post-infarct rat model. *Tissue Engineering Part A*, 26, doi: 10.1089/ten.TEA.2019.0340: 26 str.
- Franco S. J., Rodgers M. A., Perrin B. J., Han J., Bennin D. A., Critchley D. R.,

- Huttenlocher A. 2004. Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nature Cell Biology*, 6, 10: 977–983
- Freedman N. D., Silverman D. T., Hollenbeck A. R., Schatzkin A., Abnet C. C. 2011. Association Between Smoking and Risk of Bladder Cancer Among Men and Women. *Jama*, 306, 7: 737–745
- Friedl P., Gilmour D. 2009. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10, 7: 445–457
- García-Closas M., Malats N., Silverman D., Dosemeci M., Kogevinas M., Hein D. W., Tardón A., Serra C., Carrato A., García-Closas R., Lloreta J., Castaño-Vinyals G., Yeager M., Welch R., Chanock S., Chatterjee N., Wacholder S., Samanic C., Torá M., Fernández F., Real F. X., Rothman N. 2005. NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet*, 366, 9486: 649–659
- Geiger B., Bershadsky A., Pankov R., Yamada K. M. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 11: 793–805
- Gialeli C., Theocharis A. D., Karamanos N. K. 2011. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS journal*, 278, 1: 16–27
- Golka, K., Reckwitz, T., Kempkes, M., Cascorbi, I., I, Blaskewicz, M., Reich, S. E., Roots, I., I, Soekeland, J., Schulze, H., Bolt, H. M. 1997. N-Acetyltransferase 2 (NAT2) and Glutathione S-Transferase μ (GSTM1) in Bladder-cancer Patients in a Highly Industrialized Area. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 3, 2: 105–110
- Golubovskaya V. M., Figel S., Ho B. T., Johnson C. P., Yemma M., Huang G., Zheng M., Nyberg C., Magis A., Ostrov D. A., Gelman I. H., Cance W. G. 2012. A small molecule focal adhesion kinase (FAK) inhibitor, targeting Y397 site: 1-(2-hydroxyethyl)-3, 5, 7-triaza-1-azoniatricyclo [3.3.1.1(3,7)]decane; bromide effectively inhibits FAK autophosphorylation activity and decreases cancer cell viability, clonogenicity and tumor growth in vivo. *Carcinogenesis*, 33, 5: 1004–1013
- Golubovskaya V. M., Ho B., Zheng M., Magis A., Ostrov D., Morrison C., Cance W. G. 2013. Disruption of focal adhesion kinase and p53 interaction with small molecule compound R2 reactivated p53 and blocked tumor growth. *BMC cancer*, 13, doi: 10.1186/1471-2407-13-342: 13 str.
- Gonzalez D. M., Medici D. 2014. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science Signaling*, 7, doi: 10.1126/scisignal.2005189: 17 str.
- Grada A., Otero-Vinas M., Prieto-Castrillo F., Obagi Z., Falanga V. 2017. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *The Journal of investigative dermatology*, 137, 2, doi: 10.1016/j.jid.2016.11.020: 6 str.

- Grossman H. B., Lee C., Bromberg J., Liebert M. 2000. Expression of the alpha6beta4 integrin provides prognostic information in bladder cancer. *Oncology Reports*, 7, 1: 13–16
- Guan L., Zhang A. 2019. Amniotic epithelial cells reverse abnormal vascular structure and function in endometrial carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 12, 7: 2405–2424
- Guo H. R., Chiang H. S., Hu H., Lipsitz S. R., Monson R. R. 1997. Arsenic in drinking water and incidence of urinary cancers. V: *Epidemiology. United States*, 545–550
- Gupta S., Hau A., Beach J., Harwalker J., Mantuano E., Gonias S., Egelhoff T., Hansel D. 2013. Mammalian Target of Rapamycin Complex 2 (mTORC2) Is a Critical Determinant of Bladder Cancer Invasion. *PLoS One*, 8, doi: 10.1371/journal.pone.0081081: 10 str.
- Haase K., Al-Rekabi Z., Pelling A. E. 2014. Mechanical cues direct focal adhesion dynamics. *Progress in molecular biology and translational science*, 126: 103–134
- Han Y. M., Romero R., Kim J. S., Tarca A. L., Kim S. K., Draghici S., Kusanovic J. P., Gotsch F., Mittal P., Hassan S. S., Kim C. J. 2008. Region-specific gene expression profiling: novel evidence for biological heterogeneity of the human amnion. *Biology of Reproduction*, 79, 5: 954–961
- Hanahan D., Weinberg R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 1: 57–70
- Hansel D. E., Platt E., Orloff M., Harwalker J., Sethu S., Hicks J. L., De Marzo A., Steinle R. E., Hsi E. D., Theodorescu D., Ching C. B., Eng C. 2010. Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates cellular proliferation and tumor growth in urothelial carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 176, 6: 3062–3072
- Hicks R. M. 1975. The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 50, 2: 215–246
- Holinstat M., Knezevic N., Broman M., Samarel A. M., Malik A. B., Mehta D. 2006. Suppression of RhoA activity by focal adhesion kinase-induced activation of p190RhoGAP: role in regulation of endothelial permeability. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 4: 2296–2305
- Hong S. Y., Shih Y. P., Sun P., Hsieh W. J., Lin W. C., Lo S. H. 2016. Down-regulation of tensin2 enhances tumorigenicity and is associated with a variety of cancers. *Oncotarget*, 7, 25: 38143–38153
- Hsia D. A., Mitra S. K., Hauck C. R., Streblov D. N., Nelson J. A., Ilic D., Huang S., Li E., Nemerow G. R., Leng J., Spencer K. S., Cheres D. A., Schlaepfer D. D. 2003. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *Journal of Cell Biology*, 160, 5: 753–767
- Hu P., Deng F. M., Liang F. X., Hu C. M., Auerbach A. B., Shapiro E., Wu X. R., Kachar B., Sun T. T. 2000. Ablation of uroplakin III gene results in small urothelial plaques, urothelial leakage, and vesicoureteral reflux. *Journal of Cell Biology*, 151, 5: 961–972

- Hu Y. L., Lu S., Szeto K. W., Sun J., Wang Y., Lasheras J. C., Chien S. 2014. FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells. *Scientific Reports*, 4, 6024, doi: 10.1038/srep06024: str 7.
- Hudoklin S., Jezernik K., Neumüller J., Pavelka M., Romih R. 2011. Urothelial plaque formation in post-Golgi compartments. *PLoS one*, 6, 8, doi: 10.1371/journal.pone.0023636: 9 str.
- Hudoklin S., Jezernik K., Neumüller 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.
- Hui L., Zhang S., Dong X., Tian D., Cui Z., Qiu X. 2013 Prognostic significance of twist and N-cadherin expression in NSCLC. *PLoS One*, 8, 4, doi: 10.1371/journal.pone.0062171: 10 str.
- Hulit J., Suyama K., Chung S., Keren R., Agiostratidou G., Shan W., Dong X., Williams T. M., Lisanti M. P., Knudsen K., Hazan R. B. 2007. N-Cadherin Signaling Potentiates Mammary Tumor Metastasis via Enhanced Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation. *Cancer Research*, 67, 7: 3106–3116
- Hurst C. D., Platt F. M., Knowles M. A. 2014. Comprehensive mutation analysis of the TERT promoter in bladder cancer and detection of mutations in voided urine. *European Urology*, 65, 2: 367–369
- Iijima K., Igawa Y., Imamura T., Moriizumi T., Nikaido T., Konishi I., Nishizawa O. 2007. Transplantation of preserved human amniotic membrane for bladder augmentation in rats. *Tissue Engineering*, 13, 3: 513–524
- Insausti C. L., Alcaraz A., Garcia-Vizcaino E. M., Mrowiec A., Lopez-Martinez M. C., Blanquer M., Pinero A., Majado M. J., Moraleda J. M., Castellanos G., Nicolas F. J. 2010. Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 18, 4: 368–377
- Insausti C. L., Blanquer M., Garcia-Hernandez A. M., Castellanos G., Moraleda J. M. 2014. Amniotic membrane-derived stem cells: immunomodulatory properties and potential clinical application. *Stem Cells Cloning*, 7: 53–63
- Institute of Cancer Research UK., Verastem I. 2022. Phase I Trial of Defatcinib and VS-6766 (izpis iz baze podatkov, 6 junij 2022).
- Izaguirre G., Aguirre L., Hu Y. P., Lee H. Y., Schlaepfer D. D., Aneskievich B. J., Haimovich B. 2001. The cytoskeletal/non-muscle isoform of alpha-actinin is phosphorylated on its actin-binding domain by the focal adhesion kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 31: 28676–28685
- Jafari A., Rezaei-Tavirani M., Niknejad H., Zali H. 2021. Tumor Targeting by Conditioned Medium Derived From Human Amniotic Membrane: New Insight in Breast Cancer Therapy. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 20, doi.org/10.1177/15330338211036318: 12 str.
- Janev A., Ramuta T. Ž., Tratnjek L., Sardoč Ž., Obradović H., Mojsilović S., Taskovska M., Smrkolj T., Kreft M. E. 2021. Detrimental Effect of Various Preparations of

- the Human Amniotic Membrane Homogenate on the 2D and 3D Bladder Cancer *In vitro* Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, doi: 10.3389/fbioe.2021.690358: 19 str.
- Jerman U. D., Višnjar T., Bratkovič I. H., Resnik N., Pavlin M., Veranič, P., Kreft M. E. 2021. Attachment of Cancer Urothelial Cells to the Bladder Epithelium Occurs on Uroplakin-Negative Cells and Is Mediated by Desmosomal and Not by Classical Cadherins. *International journal of molecular sciences*, 22, 11, doi: 10.3390/ijms22115565: 18 str.
- Jerman U. D., Veranič P., Cirman T., Kreft M. E. 2020. Human Amniotic Membrane Enriched with Urinary Bladder Fibroblasts Promote the Re-Epithelization of Urothelial Injury. *Cell Transplantation*, 29, doi.org/10.1177/0963689720946668: 14 str.
- Jerman U. D., Veranič P., Kreft M. E. 2014a. 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
- Jerman U. D., Kolenc M., Steyer A., Veranič P., Prijatelj M. P., Kreft M. E. 2014b. A novel strain of porcine adenovirus detected in urinary bladder urothelial cell culture. *Viruses*, 6, 6: 2505–2518
- Jiang H., Hegde S., Knolhoff B. L., Zhu Y., Herndon J. M., Meyer M. A., Nywening T. M., Hawkins W. G., Shapiro I. M., Weaver D. T., Pachter J. A., Wang-Gillam A., DeNardo D. G. 2016. Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. *Nature Medicine*, 22, 8: 851–860
- Jiang X., Castela J. E., Yuan J. M., Stern M. C., Conti D. V., Cortessis V. K., Pike M. C., Gago-Dominguez M. 2012. Cigarette smoking and subtypes of bladder cancer. *International Journal of Cancer*, 130, 4: 896–901
- 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 Bel-2/caspase pathways. *Molecular Biology Reports*, 39, 1: 467–473
- Jones S. F., Siu L. L., Bendell J. C., Cleary J. M., Razak A. R., Infante J. R., Pandya S. S., Bedard P. L., Pierce K. J., Houk B., Roberts W. G., Shreeve S. M., Shapiro G. I. 2015. A phase I study of VS-6063, a second-generation focal adhesion kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*, 33, 5: 1100–1107
- Kallergi G., Agelaki S., Markomanolaki H., Georgoulas V., Stournaras C. 2007. Activation of FAK/PI3K/Rac1 signaling controls actin reorganization and inhibits cell motility in human cancer cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 20, 6: 977–986
- Kandil S., Prencipe F., Jones S., Hiscox S., Westwell A. D. 2018. The discovery of new and more potent chloropyramine (C4) analogues for the potential treatment of invasive breast cancer. *Chemical Biology & Drug Design*, 91, 1: 314–321

- Kang N. H., Yi B. R., Lim S. Y., Hwang K. A., Baek Y. S., Kang K. S., Choi K. C. 2012. Human amniotic membrane-derived epithelial stem cells display anticancer activity in BALB/c female nude mice bearing disseminated breast cancer xenografts. *International Journal of Oncology*, 40, 6: 2022–2028
- Kang Y., Hu W., Ivan C., Dalton H. J., Miyake T., Pecot C. V., Zand B., Liu T., Huang J., Jennings N. B., Rupaimoole R., Taylor M., Pradeep S., Wu S. Y., Lu C., Wen Y., Huang J., Liu J., Sood A. K. 2013. Role of focal adhesion kinase in regulating YB-1-mediated paclitaxel resistance in ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 105, 19: 1485–1495
- Karkoulis P. K., Stravopodis D. J., Margaritis L. H., Voutsinas G. E. 2010. 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces downregulation of critical Hsp90 protein clients and results in cell cycle arrest and apoptosis of human urinary bladder cancer cells. *BMC cancer*, 10, doi: 10.1186/1471-2407-10-481: 15 str.
- Kątnik-Prastowska I., Lis J., Matejuk A. 2014. Glycosylation of uroplakins. Implications for bladder physiopathology. *Glycoconjugate Journal*, 31, 9: 623–636
- Khandelwal P., Abraham S. N., Apodaca G. 2009. Cell biology and physiology of the uroepithelium. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 297, 6, doi: 10.1152/ajprenal.00327.2009: 25 str.
- Kim E. Y., Lee K. B., Kim M. K. 2014. The potential of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane and amniotic fluid for neuronal regenerative therapy. *BMB Reports*, 47, 3: 135–140
- Kim S. H., Bang S. H., Kang S. Y., Park K. D., Eom J. H., Oh I. U., Yoo S. H., Kim C. W., Baek S. Y. 2015. Human amniotic membrane-derived stromal cells (hAMSC) interact depending on breast cancer cell type through secreted molecules. *Tissue and Cell*, 47, 1: 10–16
- Kim S. Y., Romero R., Tarca A. L., Bhatti G., Lee J., Chaiworapongsa T., Hassan S. S., Kim C. J. 2011. miR-143 regulation of prostaglandin-endoperoxidase synthase 2 in the amnion: implications for human parturition at term. *PLoS One*, 6, 9, doi: 10.1371/journal.pone.0024131: 10 str.
- King W. D., Marrett L. D. 1996. Case-control study of bladder cancer and chlorination by-products in treated water (Ontario, Canada). *Cancer Causes Control*, 7, 6: 596–604
- Klymenko Y., Kim O., Loughran E., Yang J., Lombard R., Alber M., Stack M. S. 2017. Cadherin composition and multicellular aggregate invasion in organotypic models of epithelial ovarian cancer intraperitoneal metastasis. *Oncogene*, 36, 42: 5840–5851
- Knowles M. A. 2007. Role of FGFR3 in urothelial cell carcinoma: bioznačevalec and potential therapeutic target. *World Journal of Urology*, 25, 6: 581–593
- Knowles M. A., Hurst CD. 2015. Molecular biology of bladder cancer: new insights into

- pathogenesis and clinical diversity. *Nature Reviews Cancer*, 15, 1: 25–41
- Knowles M. A., Platt F. M., Ross R. L., Hurst C. D. 2009. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 28, 3: 305–316
- Kompier L. C., Lurkin I., van der Aa M. N., van Rhijn B. W., van der Kwast T. H., Zwarthoff E. C. 2010. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One*, 5, 11, doi: 10.1371/journal.pone.0013821: 13 str.
- Kong D., Chen F., Sima N. I. 2015. Inhibition of focal adhesion kinase induces apoptosis in bladder cancer cells via Src and the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10, 5: 1725–1731
- Kong D. B., Chen F., Sima N. 2017. Focal adhesion kinases crucially regulate TGFbeta-induced migration and invasion of bladder cancer cells via Src kinase and E-cadherin. *OncoTargets and Therapy*, 10, 1783–1792
- Kovac B., Mäkelä T. P., Vallenius T. 2018. Increased α -actinin-1 destabilizes E-cadherin-based adhesions and associates with poor prognosis in basal-like breast cancer. *PLoS One*, 13, 5, doi: 10.1371/journal.pone.0196986: 20 str.
- Kreft M. E., Sterle M., Veranic, P., Jezernik, K. 2005. Urothelial injuries and the early wound healing response: tight junctions and urothelial cytodifferentiation. *Histochemistry and cell biology*, 123, 4: 529–539
- Kreft M. E., Di Giandomenico D., Beznoussenko G. V., Resnik N., Mironov A. A., Jezernik K. 2010a. Golgi apparatus fragmentation as a mechanism responsible for uniform delivery of uroplakins to the apical plasma membrane of uroepithelial cells. *Biology of the Cell*, 102, 11: 593–607
- Kreft M. E., Hudoklin S., Jezernik K., Romih R. 2010b. Formation and maintenance of blood-urine barrier in urothelium. *Protoplasma*, 246, 1: 3–14
- Kreft M. E., Mironov A. A., Hudoklin S. 2022. The Golgi complex: An organelle that determines urothelial cell biology in health and disease. *Histochemistry and cell biology*, doi: 10.1007/s00418-022-02121-0: 12 str.
- 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
- Kuo J. C. 2013. Mechanotransduction at focal adhesions: integrating cytoskeletal mechanics in migrating cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 17, 6: 704–712
- Kuriyama S., Yoshida M., Yano S., Aiba N., Kohno T., Minamiya Y., Goto A., Tanaka M. 2016. LPP inhibits collective cell migration during lung cancer dissemination. *Oncogene*, 35, 8: 952–964
- Lamarche N., Tapon N., Stowers L., Burbelo P. D., Aspenström P., Bridges T., Chant J., Hall A. 1996. Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle

- progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell*, 87, 3: 519–529
- Lamouille S., Xu J., Derynck R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 3: 178–196
- Lasič E., Višnjiar T., Kreft M. E. 2015. Properties of the Urothelium that Establish the Blood-Urine Barrier and Their Implications for Drug Delivery. *American journal of physiology. Renal physiology*, 297, 6: 1477–1501
- Lawson C., Lim S. T., Uryu S., Chen X. L., Calderwood D. A., Schlaepfer D. D. 2012. FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *Journal of Cell Biology*, 196, 2: 223–232
- Le Large T. Y. S., Bijlsma M. F., El Hassouni B., Mantini G., Lagerweij T., Henneman A. A., Funel N., Kok B., Pham T. V., de Haas R., Morelli L., Knol J. C., Piersma S. R., Kazemier G., van Laarhoven H. W. M., Giovannetti E., Jimenez C. R. 2021. Focal adhesion kinase inhibition synergizes with nab-paclitaxel to target pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40, 1: 91, doi.org/10.1186/s13046-021-01892-z: 12 str.
- Leal J., Luengo-Fernandez R., Sullivan R., Witjes J. A. 2016. Economic Burden of Bladder Cancer Across the European Union. *European Urology*, 69, 3: 438–447
- Lee B. Y., Timpson P., Horvath L. G., Daly R. J. 2015. FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 146: 132–149
- Lee J. M., Dedhar S., Kalluri R., Thompson E. W. 2006. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *Journal of Cell Biology*, 172, 7: 973–981
- Lewis S. A. 2000. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 278, 6: 867–874
- Li H., Gao Y., Ren C. 2021. Focal adhesion kinase inhibitor BI 853520 inhibits cell proliferation, migration and EMT process through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer. *Discover Oncology*, 12, 1, doi: 10.1007/s12672-021-00425-6: 14 str.
- Li L., He Y., Zhao M., Jiang J. 2013. Collective cell migration: Implications for wound healing and cancer invasion. *Burns & Trauma*, 1, 1: 21–26
- Li T., Guo H., Song Y., Zhao X., Shi Y., Lu Y., Hu S., Nie Y., Fan D., Wu K. 2014. Loss of vinculin and membrane-bound β -catenin promotes metastasis and predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Molecular cancer*, 13, 263–263
- Li W., Chen W. J., Liu W., Liang L., Zhang M. C. 2012. Homemade lyophilized cross linking amniotic sustained-release drug membrane with anti-scarring role after filtering surgery in rabbit eyes. *International Journal of Ophthalmology*, 5, 5: 555–561
- Lietha D., Cai X., Ceccarelli D. F., Li Y., Schaller M. D., Eck M. J. 2007. Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell*, 129, 6: 1177–1187

- Lim S. T., Chen X. L., Lim Y., Hanson D. A., Vo T. T., Howerton K., Larocque N., Fisher S. J., Schlaepfer D. D., Ilic D. 2008. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Molecular Cell*, 29, 1: 9–22
- Lin H. M., Lee B. Y., Castillo L., Spielman C., Grogan J., Yeung N. K., Kench J. G., Stricker P. D., Haynes A. M., Centenera M. M., Butler L. M., Shreeve S. M., Horvath L. G., Daly R. J. 2018. Effect of FAK inhibitor VS-6063 (defactinib) on docetaxel efficacy in prostate cancer. *Prostate*, 78, 4: 308–317
- Lindgren D., Liedberg F., Andersson A., Chebil G., Gudjonsson S., Borg A., Månsson W., Fioretos T., Höglund M. 2006. Molecular characterization of early-stage bladder carcinomas by expression profiles, FGFR3 mutation status, and loss of 9q. *Oncogene*, 25, 18: 2685–2696
- Lintz M., Muñoz A., Reinhart-King C. A. 2017. The Mechanics of Single Cell and Collective Migration of Tumor Cells. *Journal of Biomechanical Engineering*, 139, 2, doi: 10.1115/1.4035121: 9 str.
- Liu S., Chen L., Zhao H., Li Q., Hu R., Wang H. 2020. Integrin $\beta 8$ facilitates tumor growth and drug resistance through a Y-box binding protein 1-dependent signaling pathway in bladder cancer. *Cancer Science*, 111, 7: 2423–2430
- Lo S. H. 2004. Tensin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 1: 31–34
- Lo V., Lara-Corrales I., Stuparich A., Pope E. 2010. Amniotic membrane grafting in patients with epidermolysis bullosa with chronic wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 62, 6: 1038–1044
- Lo V., Pope E. 2009. Amniotic membrane use in dermatology. *International Journal of Dermatology*, 48, 9: 935–940
- López-Knowles E., Hernández S., Malats N., Kogevinas M., Lloreta J., Carrato A., Tardón A., Serra C., Real F. X. 2006. PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. *Cancer Research*, 66, 15: 7401–7404
- Lu K. V., Jong K. A., Rajasekaran A. K., Cloughesy T. F., Mischel P. S. 2004. Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line. *Laboratory Investigation*, 84, 1: 8–20
- Lu P., Lu Y. 2021. Born to Run? Diverse Modes of Epithelial Migration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, doi: 10.3389/fcell.2021.704939: 15 str.
- Magatti M., De Munari S., Vertua E., Parolini O. 2012. Amniotic membrane-derived cells inhibit proliferation of cancer cell lines by inducing cell cycle arrest. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16, 9: 2208–2218
- Magatti M., Vertua E., Cagnoni A., Silini A., Parolini O. 2018. The Immunomodulatory Properties of Amniotic Cells: The Two Sides of the Coin. *Cell Transplant*, 27, 1: 31–44

- Mahmoudi-Rad M., Abolhasani E., Moravvej H., Mahmoudi-Rad N., Mirdamadi Y. 2013. Acellular amniotic membrane: an appropriate scaffold for fibroblast proliferation. *Clinical and Experimental Dermatology*, 38, 6: 646–651
- Mamede A. C., Carvalho M. J., Abrantes A. M., Laranjo M., Maia C. J., Botelho M. F. 2012. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell and Tissue Research*, 349, 2: 447–458
- Mamede, A. C., Guerra, S., Laranjo, M., Carvalho, M. J., Oliveira, R. C., Gonçalves, A. C., Alves, R., Prado Castro, L., Sarmiento-Ribeiro, A. B., Moura, P., Abrantes, A. M., Maia, C. J., Botelho, M. F. 2015. Selective cytotoxicity and cell death induced by human amniotic membrane in hepatocellular carcinoma. *Medical oncology*, 32, 12, doi: 10.1007/s12032-015-0702-z: 11 str.
- Mamede, A. C., Guerra, S., Laranjo, M., Santos, K., Carvalho, M. J., Carvalheiro, T., Moura, P., Paiva, A., Abrantes, A. M., Maia, C. J., Botelho, M. F. 2016. Oxidative Stress, DNA, Cell Cycle/Cell Cycle Associated Proteins and Multidrug Resistance Proteins: Targets of Human Amniotic Membrane in Hepatocellular Carcinoma. *Pathology oncology research*, 22, 4: 689–697
- Mamede, A. C., Laranjo, M., Carvalho, M. J., Abrantes, A. M., Pires, A. S., Brito, A. F., Moura, P., Maia, C. J., Botelho, M. F. 2014. Effect of amniotic membrane proteins in human cancer cell lines: an exploratory study. *The Journal of membrane biology*, 247, 4: 357–360
- Markovič G. 2019. Vloga fokalne adhezijske kinaze in njenih inhibitorjev pri nastanku tunelskih membranskih nanocevk in preživetju rakavih urotelijskih celic. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 88 str.
- Marshall G., Ferreccio C., Yuan Y., Bates M. N., Steinmaus C., Selvin S., Liaw J., Smith A. H. 2007. Fifty-year study of lung and bladder cancer mortality in Chile related to arsenic in drinking water. *Journal of the National Cancer Institute*, 99, 12: 920–928
- Martino F., Perestrelo A. R., Vinarský V., Pagliari S., Forte G. 2018. Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function. *Frontiers in Physiology*, <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00824>: 9 str.
- Matsumoto K., Soh S., Satoh T., Iwamura M., Ishikawa Y., Ishii T., Baba S. 2008. Distribution of lymphatic vessel network in normal urinary bladder. *Urology*, 72, 3: 706–710
- McConkey D. J., Choi W., Marquis L., Martin F., Williams M. B., Shah J., Svatek R., Das A., Adam L., Kamat A., Siefker-Radtke A., Dinney C. 2009. Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28, 3: 335–344
- Megison M. L., Stewart J. E., Nabers H. C., Gillory L. A., Beierle, E. A. 2013. FAK inhibition decreases cell invasion, migration and metastasis in MYCN amplified neuroblastoma. *Clinical & Experimental Metastasis*, 30, 5: 555–568
- Mehlen P., Puisieux A. 2006. Metastasis: a question of life or death. *Nature Reviews*

- Cancer, 6, 6: 449-458
- Memmott R. M., Dennis P. A. 2009. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cellular signalling*, 21, 5: 656–664
- Mermet I., Pottier N., Sainthillier J. M., Malugani C., Cairey-Remonnay S., Maddens S., Riethmuller D., Tiberghien P., Humbert P., Aubin F. 2007. Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair and Regeneration*, 15, 4: 459–464
- Michael K. E., Dumbauld D. W., Burns K. L., Hanks S. K., García A. J. 2009. Focal adhesion kinase modulates cell adhesion strengthening via integrin activation. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 9: 2508–2519
- Michael M., Verastem I., Nine Girls A., University of California SD. 2023. ROCKIF Trial: Re-sensitization of Carboplatin-resistant Ovarian Cancer With Kinase Inhibition of FAK. (neobjavljeno)
- Mierke C. T., Kollmannsberger P., Zitterbart D. P., Diez G., Koch T. M., Marg S., Ziegler W. H., Goldmann W. H., Fabry B. 2010. Vinculin facilitates cell invasion into three-dimensional collagen matrices. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 17: 13121–13130
- Miki T., Lehmann T., Cai H., Stolz D. B., Strom S. C. 2005. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*, 23, 10: 1549–1559
- Mitra S. K., Hanson D. A., Schlaepfer D. D. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 1: 56–68
- Mitra S. K., Schlaepfer D. D. 2006. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 18, 5: 516–523
- Modaresifar K., Azizian S., Zolghadr M., Moravvej H., Ahmadiani A., Niknejad H. 2017. The effect of cryopreservation on anti-cancer activity of human amniotic membrane. *Cryobiology*, 74: 61–67
- Mohammad M. A., Ismael N. R., Shaarawy S. M., El-Merzabani M. M. 2010. Prognostic value of membrane type 1 and 2 matrix metalloproteinase expression and gelatinase A activity in bladder cancer. *The International Journal of Biological Markers*, 25, 2: 69–74
- Mohammadi A. A., Eskandari S., Johari H. G., Rajabnejad A. 2017. Using Amniotic Membrane as a Novel Method to Reduce Post-burn Hypertrophic Scar Formation: A Prospective Follow-up Study. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 10, 1: 13–17
- Mohammadi A. A., Seyed Jafari S. M., Kiasat M., Tavakkolian A. R., Imani M. T., Ayaz M., Tolide-ie H. R. 2013. Effect of fresh human amniotic membrane dressing on graft take in patients with chronic burn wounds compared with conventional methods. *Burns*, 39, 2: 349–353
- Mossanen M., Gore J. L. 2014. The burden of bladder cancer care: direct and indirect costs. *Current Opinion in Urology*, 24, 5: 487–491

- Mouneimne G., Brugge J. S. 2007. Tensins: a new switch in cell migration. *Developmental Cell*, 13, 3: 317–319
- Mrozik K. M., Blaschuk O. W., Cheong C. M., Zannettino A. C. W., Vandyke K. 2018. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer*, 18, 1: 939, doi:10.1186/s12885-018-4845-0: 16 str.
- Muramaki M., Miyake H., Terakawa T., Kumano M., Sakai I., Fujisawa M. 2012. Expression profile of E-cadherin and N-cadherin in non-muscle-invasive bladder cancer as a novel predictor of intravesical recurrence following transurethral resection. *Urologic Oncology*, 30, 2: 161–166
- Muz B., Buggio M., Azab F., de la Puente P., Fiala M., Padval M. V., Weaver D. T., Pachter J. A., Vij R., Azab A. K. 2019. PYK2/FAK inhibitors reverse hypoxia-induced drug resistance in multiple myeloma. *Haematologica*, 104, 7, doi:10.3324/haematol.2018.194688: 4 str.
- Nagai H., Kim Y. H. 2017. Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns. *Journal of Thoracic Disease*, 9, 3: 448–451
- National Cancer I. 2025. Targeted Therapy Directed by Genetic Testing in Treating Patients With Advanced Refractory Solid Tumors, Lymphomas, or Multiple Myeloma (The MATCH Screening Trial) (neobjavljeno)
- Navas A., Magaña-Guerrero F. S., Domínguez-López A., Chávez-García C., Partido G., Graue-Hernández E. O., Sánchez-García F. J., Garfias Y. 2018. Anti-Inflammatory and Anti-Fibrotic Effects of Human Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells and Their Potential in Corneal Repair. *STEM CELLS Translational Medicine*, 7, 12: 906–917
- Neoh C. A., Wu W. T., Dai G. F., Su J. H., Liu C. I., Su T. R., Wu Y. J. 2017. Flaccidoxide-13-Acetate Extracted from the Soft Coral *Cladiella kashmani* Reduces Human Bladder Cancer Cell Migration and Invasion through Reducing Activation of the FAK/PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway. *Molecules*, 23, 1:58, doi:10.3390/molecules23010058: 11 str.
- Nickerson M. L., Witte N., Im K. M., Turan S., Owens C., Misner K., Tsang S. X., Cai Z., Wu S., Dean M., Costello J. C., Theodorescu D. 2017. Molecular analysis of urothelial cancer cell lines for modeling tumor biology and drug response. *Oncogene*, 36, 1: 35–46
- Nieto, M. A., Huang, R. Y., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. 2016. EMT: 2016. *Cell*, 166, 1: 21–45
- 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, 1: 33–40
- 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
- Nordentoft I., Lamy P., Birkenkamp-Demtröder K., Shumansky K., Vang S., Hornshøj H., Juul M., Villesen P., Hedegaard J., Roth A., Thorsen K., Høyer S., Borre M., Reinert T., Fristrup N., Dyrskjød L., Shah S., Pedersen J. S., Ørntoft T. F. 2014. Mutational context and diverse clonal development in early and late bladder cancer. *Cell Reports*, 7, 5: 1649–1663
- Novaković S. 2018. Kancerogeneza: V: Onkologija: učbenik za študente medicine. 1. izd. Strojan P., Hočevar M. (ur.). Ljubljana, Onkološki inštitut: 38–57
- O'Brien S., Golubovskaya V. M., Conroy J., Liu S., Wang D., Liu B., Cance W. G. 2014. FAK inhibition with small molecule inhibitor Y15 decreases viability, clonogenicity, and cell attachment in thyroid cancer cell lines and synergizes with targeted therapeutics. *Oncotarget*, 5, 17: 7945–7959
- Obermann E. C., Junker K., Stoehr R., Dietmaier W., Zaak D., Schubert J., Hofstaedter F., Knuechel R., Hartmann A. 2003. Frequent genetic alterations in flat urothelial hyperplasias and concomitant papillary bladder cancer as detected by CGH, LOH, and FISH analyses. *The Journal of Pathology*, 199, 1: 50–57
- Ogawa K., Shimizu Y., Uketa S., Utsunomiya N., Kanamaru S. 2020. Prognosis of patients with muscle invasive bladder cancer who are intolerable to receive any anti-cancer treatment. *Cancer Treatment and Research Communications*, 24, doi: 10.1016/j.ctarc.2020.100195: 4 str.
- Ohashi K., Fujiwara S., Mizuno K. 2017. Roles of the cytoskeleton, cell adhesion and rho signalling in mechanosensing and mechanotransduction. *The Journal of Biochemistry*, 161, 3: 245–254
- Oktay M., Wary K. K., Dans M., Birge RB., Giancotti F. G. 1999. Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle. *Journal of Cell Biology*, 145, 7: 1461–1469
- Osmani N., Peglion F., Chavrier P., Etienne-Manneville S. 2010. Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *Journal of Cell Biology*, 191, 7: 1261–1269
- Ossovskaya V., Lim S. T., Ota N., Schlaepfer D. D., Ilic D. 2008. FAK nuclear export signal sequences. *FEBS Letters*, 582, 16: 2402–2406
- Owen J. D., Ruest P. J., Fry D. W., Hanks S. K. 1999. Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 7: 4806–4818
- Padh H. 1992. Organelle isolation and marker enzyme assay. V: Tested studies for laboratory teaching. *Proceedings of the 13th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)*. 13th ed. Goldman C. A. (ed.). New Haven, Yale University: 129–146

- Pan C., Lang H., Zhang T., Wang R., Lin X., Shi P., Zhao F., Pang X. 2019. Conditioned medium derived from human amniotic stem cells delays H₂O₂-induced premature senescence in human dermal fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine*, 44, 5: 1629–1640
- 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
- Parri M., Chiarugi P. 2010. Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Communication and Signaling*, 8, 1: 23, doi:10.1186/1478-811X-8-23: 14 str.
- 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 J. T. 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *Journal of Cell Science*, 116, Pt 8: 1409–1416
- Petersen G. M., Amundadottir L., Fuchs C. S., Kraft P., Stolzenberg-Solomon R. Z., Jacobs K. B., Arslan A. A., Bueno-de-Mesquita H. B., Gallinger S., Gross M., Helzlsouer K., Holly E. A., Jacobs E. J., Klein A. P., LaCroix A., Li D., Mandelson M. T., Olson S. H., Risch H. A., Zheng W., Albanes D., Bamlet W. R., Berg C. D., Boutron-Ruault M. C., Buring J. E., Bracci P. M., Canzian F., Clipp S., Cotterchio M., de Andrade M., Duell E. J., Gaziano J. M., Giovannucci E. L., Goggins M., Hallmans G., Hankinson S. E., Hassan M., Howard B., Hunter D. J., Hutchinson A., Jenab M., Kaaks R., Kooperberg C., Krogh V., Kurtz R. C., Lynch S. M., McWilliams R. R., Mendelsohn J. B., Michaud D. S., Parikh H., Patel A. V., Peeters P. H., Rajkovic A., Riboli E., Rodriguez L., Seminara D., Shu X. O., Thomas G., Tjønneland A., Tobias G. S., Trichopoulos D., Van Den Eeden S. K., Virtamo J., Wactawski-Wende J., Wang Z., Wolpin B. M., Yu H., Yu K., Zeleniuch-Jacquotte A., Fraumeni J. F., Jr., Hoover R. N., Hartge P., Chanock S. J. 2010. A genome-wide association study identifies pancreatic cancer susceptibility loci on chromosomes 13q22.1, 1q32.1 and 5p15.33. *Nature Genetics*, 42, 3: 224–228
- Platt F. M., Hurst C. D., Taylor C. F., Gregory W. M., Harnden P., Knowles M. A. 2009. Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. *Clinical Cancer Research*, 15, 19: 6008–6017
- Ploussard G., Daneshmand S., Efstathiou J. A., Herr H. W., James N. D., Rödel C. M., Shariat S. F., Shipley W. U., Sternberg C. N., Thalmann G. N., Kassouf W. 2014. Critical analysis of bladder sparing with trimodal therapy in muscle-invasive bladder cancer: a systematic review. *European Urology*, 66, 1: 120–137
- Polivka J., Janku F. 2014. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacology & Therapeutics*, 142, 2: 164–175
- Porta C., Paglino C., Mosca A. 2014. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 4, 64, doi: 10.3389/fonc.2014.00064: 11 str.
- Porten S. P., Leapman M. S., Greene K. L. 2015. Intravesical chemotherapy in non-

- muscle-invasive bladder cancer. *Indian Journal of Urology*, 31, 4: 297–303
- Raftopoulou M., Hall A. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental Biology*, 265, 1: 23–32
- Rak v Sloveniji 2018. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije. Zadnik V. (ur.). (izpis iz baze podatkov, 6 junij 2022).
- Ramuta T. Ž., Jerman U. D., Tratnjek L., Janev A., Magatti M., Vertua E., Bonassi Signoroni P., Silini A. R., Parolini O., Kreft M. E. 2020a. The Cells and Extracellular Matrix of Human Amniotic Membrane Hinder the Growth and Invasive Potential of Bladder Urothelial Cancer Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, doi: 10.3389/fbioe.2020.554530: 18 str.
- Ramuta T. Ž., Kreft M. E. 2018. Human Amniotic Membrane and Amniotic Membrane-Derived Cells: How Far Are We from Their Use in Regenerative and Reconstructive Urology? *Cell Transplantation*, 27, 1: 77–92
- Ramuta T. Ž., Starčič Erjavec M., Kreft M. E. 2020b. Amniotic Membrane Preparation Crucially Affects Its Broad-Spectrum Activity Against Uropathogenic Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11, 469, doi: 10.3389/fmicb.2020.00469: 17 str.
- Ramuta T. Ž., Tratnjek L., Kreft M. E. 2022. Amniotic Membrane: A Unique Combination of Stem-Like Cells, Extracellular Matrix with Indispensable Potential for Regenerative Medicine. V: *Stem Cells in Reproductive Tissues and Organs: From Fertility to Cancer*. Virant-Klun I. (ur.). Cham, Springer International Publishing: 289–323
- Ramuta T. Ž. 2020. Analiza učinka pripravkov iz amnijske membrane na rakave urotelijske celice in uropatogene bakterije. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 182 str.
- Ramuta T. Ž., Šket T., Starčič Erjavec M., Kreft, M. E. 2021. Antimicrobial Activity of Human Fetal Membranes: From Biological Function to Clinical Use. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, doi: 10.3389/fbioe.2021.691522: 16 str.
- Rebek M. K., Čarman J., Kragelj B., Borštnar S. Karcinom sečnega mehurja, ledvičnega meha, sečevoda in sečnice. V: *Onkologija: učbenik za študente medicine*. 1. izdaja. Strojjan P., Hočevar M. (ur.). Ljubljana, Onkološki inštitut: 688–697
- Rebouissou S., Hérault A., Letouzé E., Neuzillet Y., Laplanche A., Ofualuka K., Maillé P., Leroy K., Riou A., Lepage M. L., Vordos D., de la Taille A., Denoux Y., Sibony M., Guyon F., Lebret T., Benhamou S., Allory Y., Radvanyi F. 2012. CDKN2A homozygous deletion is associated with muscle invasion in FGFR3-mutated urothelial bladder carcinoma. *The Journal of Pathology*, 227, 3: 315–324
- Reiske H. R., Kao S. C., Cary L. A., Guan J. L., Lai J. F., Chen H. C. 1999. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 18: 12361–12366
- Resch M. D., Resch B. E., Csizmazia E., Imre L., Németh J., Révész P., Csányi E. 2010. Permeability of human amniotic membrane to ofloxacin *in vitro*. *Investigative*

- Ophthalmology and Visual Science, 51, 2: 1024–1027
- Resch M. D., Resch B. E., Csizmazia E., Imre L., Németh J., Szabó-Révész P., Csányi E. 2011. Drug reservoir function of human amniotic membrane. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 27, 4: 323–326
- Resnik N., Prezelj T., De Luca G. M. R., Manders E., Polishchuk R., Veranič P., Kreft M. E. 2018. Helical organization of microtubules occurs in a minority of tunneling membrane nanotubes in normal and cancer urothelial cells. *Scientific Reports*, 8, 1: 17133, doi:10.1038/s41598-018-35370-y: 8 str.
- Resnik N., Repnik U., Kreft M. E., Sepčič K., Maček P., Turk B., Veranič P. 2015. Highly Selective Anti-Cancer Activity of Cholesterol-Interacting Agents Methyl- β -Cyclodextrin and Ostreolysin A/Pleurotolysin B Protein Complex on Urothelial Cancer Cells. *PLoS One*, 10, 9, doi: 10.1371/journal.pone.0137878: 19 str.
- Ricci S., Bruzzese D., DI Carlo A. 2015. Evaluation of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, NGAL and MMP-9/NGAL complex in urine and sera from patients with bladder cancer. *Oncology Letters*, 10, 4: 2527–2532
- Ridley A. J. 2006. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in Cell Biology*, 16, 10: 522–529
- Riedel R., Pérez-Pérez A., Carmona-Fernández A., Jaime M., Casale R., Dueñas J. L., Guadix P., Sánchez-Margalet V., Varone C. L., Maymó J. L. 2019. Human amniotic membrane conditioned medium inhibits proliferation and modulates related microRNAs expression in hepatocarcinoma cells. *Scientific Reports*, 9, 1: 14193
- Rivlin N., Brosh R., Oren M., Rotter V. 2011. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer*, 2, 4: 466–474
- Robinson B. D., Khani F. 2018. Grading, Staging, and Morphologic Risk Stratification of Bladder Cancer. V: Precision Molecular Pathology of Bladder Cancer. 1st ed. Hansel D. E., Lerner S. P. (eds.). Cham, Springer Cham: 29–42
- Rocha S. C. M., Baptista C. J. M. 2015. Biochemical Properties of Amniotic Membrane. V: Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications. 1st ed. Mamede, A. C., Botelho M.F. (eds.). Dordrecht, Springer: 19–40
- Rodriguez Faba O., Palou-Redorta J., Fernández-Gómez J. M., Algaba F., Eiró N., Villavicencio H., Vizoso F. J. 2012. Matrix Metalloproteinases and Bladder Cancer: What is New? *International Scholarly Research Notices Urology*, doi:10.5402/2012/581539: 9 str.
- Rolfo A., Giuffrida D., Giuffrida M. C., Todros T., Calogero A. E. 2014. New perspectives for prostate cancer treatment: *in vitro* inhibition of LNCaP and PC3 cell proliferation by amnion-derived mesenchymal stromal cells conditioned media. *Aging Male*, 17, 2: 94–101
- Rothschild B. L., Shim A. H., Ammer A. G., Kelley L. C., Irby K. B., Head J. A., Chen L., Varella-Garcia M., Sacks P. G., Frederick B., Raben D., Weed S. A. 2006.

- Cortactin overexpression regulates actin-related protein 2/3 complex activity, motility, and invasion in carcinomas with chromosome 11q13 amplification. *Cancer Research*, 66, 16: 8017–8025
- Ruiz-Cañada C., Bernabé-García Á., Liarte S., Insausti C. L., Angosto D., Moraleda J. M., Castellanos G., Nicolás F. J. 2018. Amniotic membrane stimulates cell migration by modulating transforming growth factor- β signalling. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12, 3: 808–820
- Saitoh M. 2018. Involvement of partial EMT in cancer progression. *Journal of Biochemistry*, 164, 4: 257–264
- Sakamoto S., McCann R. O., Dhir R., Kyprianou N. 2010. Talin1 promotes tumor invasion and metastasis via focal adhesion signaling and anoikis resistance. *Cancer Research*, 70, 5: 1885–1895
- Sanli O., Dobruch J., Knowles M. A., Burger M., Alemozaffar M., Nielsen M. E., Lotan Y. 2017. Bladder cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17022, 3, doi.org/10.1038/nrdp.2017.22: 19 str.
- Sathe A., Nawroth R. 2018. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Bladder Cancer. *Methods in Molecular Biology*, 1655: 335–350
- Saxena K., Jolly M. K., Balamurugan K. 2020. Hypoxia, partial EMT and collective migration: Emerging culprits in metastasis. *Translational Oncology*, 13, 11: 100845
- Schaller M. D. 2001. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene*, 20, 44: 6459–6472
- Schaller M. D., Borgman C. A., Cobb B. S., Vines R. R., Reynolds A. B., Parsons J. T. 1992. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 11: 5192–5196
- Schlaepfer D. D., Hunter T. 1996. Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 16, 10: 5623–5633
- Schlaepfer D. D., Mitra S. K., Ilic D. 2004. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1692, 2: 77–102
- Seager C. M., Puzio-Kuter A. M., Patel T., Jain S., Cordon-Cardo C., Mc Kiernan J., Abate-Shen C. 2009. Intravesical delivery of rapamycin suppresses tumorigenesis in a mouse model of progressive bladder cancer. *Cancer Prevention Research*, 2, 12: 1008–1014
- Sein T. T., Thant, A. A., Hiraiwa, Y., Amin, A. R., Sohara, Y., Liu, Y., Matsuda, S., Yamamoto, T., Hamaguchi, M. 2000. A role for FAK in the Concanavalin A-dependent secretion of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Oncogene*, 19, 48: 5539–5542
- Serrels B., Serrels A., Brunton V. G., Holt M., McLean G. W., Gray C. H., Jones G. E.,

- Frame M. C. 2007. Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nature Cell Biology*, 9, 9: 1046–1056
- Sharma A., Mayer B. J. 2008. Phosphorylation of p130Cas initiates Rac activation and membrane ruffling. *BMC Molecular and Cell Biology*, 9, 1, doi: 10.1186/1471-2121-9-50: 15 str.
- Shayan Asl N., Nejat F., Mohammadi P., Nekoukar A., Hesam S., Ebrahimi M., Jadidi K. 2019. Amniotic Membrane Extract Eye Drop Promotes Limbal Stem Cell Proliferation and Corneal Epithelium Healing. *Cell Journal*, 20, 4: 459–468
- Shimizu T., Fukuoka K., Takeda M., Iwasa T., Yoshida T., Horobin J., Keegan M., Vaickus L., Chavan A., Padval M., Nakagawa K. 2016. A first-in-Asian phase 1 study to evaluate safety, pharmacokinetics and clinical activity of VS-6063, a focal adhesion kinase (FAK) inhibitor in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77, 5: 997–1003
- Shimmura S., Shimazaki J., Ohashi Y., Tsubota K. 2001. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea*, 20, 4: 408–413
- Shin J. H., Lim J. S., Jeon B. H. 2018. Pathophysiology of Bladder Cancer. V: Bladder Cancer. 1st ed. Ku J. H. (ed.). London, Academic Press: 33–41
- Sibley K., Cuthbert-Heavens D., Knowles M. A. 2001. Loss of heterozygosity at 4p16.3 and mutation of FGFR3 in transitional cell carcinoma. *Oncogene*, 20, 6: 686–691
- Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns H., Merck S., Dohme LLC., Verastem I. 2023. Study of Pembrolizumab With or Without Defactinib Following Chemotherapy as a Neoadjuvant and Adjuvant Treatment for Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (neobjavljeno)
- Sieg D. J., Hauck C. R., Ilic D., Klingbeil C. K., Schaefer E., Damsky C. H., Schlaepfer D. D. 2000. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nature Cell Biology*, 2, 5: 249–256
- Sieg D. J., Hauck C. R., Schlaepfer D. D. 1999. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *Journal of Cell Science*, 112: 2677–2691
- Silini A. R., Di Pietro R., Lang-Olip I., Alviano F., Banerjee A., Basile M., Borutinskaite V., Eissner G., Gellhaus A., Giebel B., Huang Y. C., Janev A., Kreft M. E., Kupper N., Abadía-Molina A. C., Olivares E. G., Pandolfi A., Papait A., Pozzobon M., Ruiz-Ruiz C., Soritau O., Susman S., Szukiewicz D., Weidinger A., Wolbank S., Huppertz B., Parolini O. 2020. Perinatal Derivatives: Where Do We Stand? A Roadmap of the Human Placenta and Consensus for Tissue and Cell Nomenclature. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 1438, doi: 10.3389/fbioe.2020.610544: 33 str.
- Simoneau M., LaRue H., Aboukassim T. O., Meyer F., Moore L., Fradet Y. 2000. Chromosome 9 deletions and recurrence of superficial bladder cancer:

- identification of four regions of prognostic interest. *Oncogene*, 19, 54: 6317–6323
- Slack-Davis J. K., Martin K. H., Tilghman R. W., Iwanicki M., Ung E. J., Autry C., Luzzio M. J., Cooper B., Kath J. C., Roberts W. G., Parsons J. T. 2007. Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 20: 14845–14852
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 1: 76–85
- Song Y. H., Shiota M., Yokomizo A., Uchiumi T., Kiyoshima K., Kuroiwa K., Oda Y., Naito S. 2014. Twist1 and Y-box-binding protein-1 are potential prognostic factors in bladder cancer. *Urologic oncology*, 32, 1, doi: 10.1016/j.urolonc.2012.11.003: 7 str.
- Sood A. K., Coffin J. E., Schneider G. B., Fletcher M. S., DeYoung B. R., Gruman L. M., Gershenson D. M., Schaller M. D., Hendrix M. J. 2004. Biological significance of focal adhesion kinase in ovarian cancer: role in migration and invasion. *The American Journal of Pathology*, 165, 4: 1087–1095
- Stachon T., Bischoff M., Seitz B., Huber M., Zawada M., Langenbacher A., Szentmáry N. 2015. Growth Factors and Interleukins in Amniotic Membrane Tissue Homogenate. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 232, 7: 858–862
- Stenhjem D. D., Tran, D., Nkrumah, M. A., Gupta, S. 2018. PD1/PDL1 inhibitors for the treatment of advanced urothelial bladder cancer. *OncoTargets and therapy*, 11: 5973–5989
- Sulzmaier F. J., Jean C., Schlaepfer D. D. 2014. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nature Reviews Cancer*, 14, 9: 598–610
- Sun D., Sawada A., Nakashima M., Kobayashi T., Ogawa O., Matsui Y. 2015. MK2206 potentiates cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis through an interaction of inactivated Akt signaling pathway. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 33, 3, doi.org/10.1016/j.urolonc.2014.10.018: 10 str.
- Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71, 3: 209–249
- Sylvester R. J., van der Meijden A. P., Oosterlinck W., Witjes J. A., Bouffieux C., Denis L., Newling DW., Kurth K. 2006. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *European Urology*, 49, 3: 466–477
- Šket T., Ramuta T. Ž., Starcic Erjavec M., Kreft M. E. 2019. Different Effects Of Amniotic Membrane Homogenate On The Growth Of Uropathogenic Escherichia coli, Staphylococcus aureus And Serratia marcescens. *Infection and Drug Resistance*, 12: 3365–3375

- Tai Y. L., Chen L. C., Shen T. L. 2015. Emerging Roles of Focal Adhesion Kinase in Cancer. *BioMed Research International*, 2015, 690690, dx.doi.org/10.1155/2015/690690: 14 str.
- Tanjoni I., Walsh C., Uryu S., Tomar A., Nam J. O., Mielgo A., Lim S. T., Liang C., Koenig M., Sun C., Patel N., Kwok C., McMahon G., Stupack D. G., Schlaepfer D. D. 2010. PND-1186 FAK inhibitor selectively promotes tumor cell apoptosis in three-dimensional environments. *Cancer Biol Ther*, 9, 10: 764–777
- Taylor C. F., Platt F. M., Hurst C. D., Thygesen H. H., Knowles M. A. 2014. Frequent inactivating mutations of STAG2 in bladder cancer are associated with low tumour grade and stage and inversely related to chromosomal copy number changes. *Human Molecular Genetics*, 23, 8: 1964–1974
- Thomas J. U., Verastem I. 2023. Defactinib and VS-6766 for the Treatment of Patients With Metastatic Uveal Melanoma. (neobjavljeno)
- Tomar A., Lawson C., Ghassemian M., Schlaepfer D. D. 2012. Cortactin as a target for FAK in the regulation of focal adhesion dynamics. *PLoS One*, 7, 8, doi: 10.1371/journal.pone.0044041: 19 str.
- Tomar A., Schlaepfer D. D. 2009. Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Current Opinion in Cell Biology*, 21, 5: 676–683
- Tran L., Xiao J. F., Agarwal N., Duex J. E., Theodorescu D. 2021. Advances in bladder cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 21, 2: 104–121
- Trepat X., Fredberg J. J. 2011. Plithotaxis and emergent dynamics in collective cellular migration. *Trends in Cell Biology*, 21, 11: 638–646
- Vallo S., Rutz J., Kautsch M., Winkelmann R., Michaelis M., Wezel F., Bartsch G., Haferkamp A., Rothweiler F., Blaheta R. A., Cinatl J. 2017. Blocking integrin $\beta 1$ decreases adhesion in chemoresistant urothelial cancer cell lines. *Oncology Letters*, 14, 5: 5513–5518
- van Rhijn B. W., Catto J. W., Goebell P. J., Knüchel R., Shariat S. F., van der Poel H. G., Sanchez-Carbayo M., Thalmann G. N., Schmitz-Dräger B. J., Kiemeny L. A. 2014. Molecular markers for urothelial bladder cancer prognosis: toward implementation in clinical practice. *Urologic Oncology*, 32, 7: 1078–1087
- van Rossum A. G., Moolenaar W. H., Schuurin E. 2006. Cortactin affects cell migration by regulating intercellular adhesion and cell spreading. *Experimental Cell Research*, 312, 9: 1658–1670
- Van Slambrouck S., Grijelmo C., De Wever O., Bruyneel E., Emami S., Gespach C., Steelant W. F. 2007. Activation of the FAK-src molecular scaffolds and p130Cas-JNK signaling cascades by $\alpha 1$ -integrins during colon cancer cell invasion. *International Journal of Oncology*, 31, 6: 1501–1508
- Velasco-Velázquez M. A., Salinas-Jazmín N., Mendoza-Patiño N., Mandoki J. J. 2008. Reduced paxillin expression contributes to the antimetastatic effect of 4-

- hydroxycoumarin on B16-F10 melanoma cells. *Cancer Cell International*, 8, 1, doi:10.1186/1475-2867-8-8: 12 str.
- Verastem I. 2016. Dose Escalation Study in Acute Myeloid or B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (izpis iz baze podatkov, 6 junij 2022)
- Verastem I. 2017a. Ph 1 Study of VS-4718, a FAK Inhibitor, in Combination With Nab-paclitaxel and Gemcitabine in Advanced Cancer Subjects (izpis iz baze podatkov, 6 junij 2022)
- Verastem I. 2017b. Phase I Dose Escalation Study of VS-4718 in Subjects With Metastatic Non-Hematologic Malignancies (izpis iz baze podatkov, 6 junij 2022)
- Verastem I. 2023. A Study of VS-6766 v. VS-6766 + Defactinib in Recurrent G12V, Other KRAS and BRAF Non-Small Cell Lung Cancer. (neobjavljeno)
- Verastem I., European Network of Gynaecological Oncological Trial G., Foundation GOG. 2023. A Study of VS-6766 v. VS-6766 + Defactinib in Recurrent Low-Grade Serous Ovarian Cancer With and Without a KRAS Mutation. (neobjavljeno)
- Villanueva C. M., Fernández F., Malats N., Grimalt J. O., Kogevinas M. 2003. Meta-analysis of studies on individual consumption of chlorinated drinking water and bladder cancer. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 57, 3: 166–173
- Walsh C., Tanjoni I., Uryu S., Tomar A., Nam J. O., Luo H., Phillips A., Patel N., Kwok C., McMahon G., Stupack D. G., Schlaepfer D. D. 2010. Oral delivery of PND-1186 FAK inhibitor decreases tumor growth and spontaneous breast to lung metastasis in pre-clinical models. *Cancer Biology & Therapy*, 9, 10: 778–790
- Wang F., Liu T., Yang L., Zhang G., Liu H., Yi X., Yang X., Lin T. Y., Qin W., Yuan J. 2014. Urethral reconstruction with tissue-engineered human amniotic scaffold in rabbit urethral injury models. *Medical Science Monitor*, 20, 2430–2438
- Wang M., Wei H., Zhao Y., Shang L., Di L., Lyu C., Liu J. 2019. Analysis of multidrug-resistant bacteria in 3223 patients with hospital-acquired infections (HAI) from a tertiary general hospital in China. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 19, 1: 86–93
- Wang W., Liu Y., Liao K. 2011. Tyrosine phosphorylation of cortactin by the FAK-Src complex at focal adhesions regulates cell motility. *BMC Cell Biology*, 12, 1, doi: 10.1186/1471-2121-12-49: 15 str.
- Washington University School of Medicine, National Cancer I., Verastem I. 2025. Stereotactic Body Radiotherapy and Focal Adhesion Kinase Inhibitor in Advanced Pancreas Adenocarcinoma. (neobjavljeno)
- Weed S. A., Parsons J. T. 2001. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene*, 20, 44: 6418–6434
- Weidinger A., Požnel L., Wolbank S., Banerjee A. 2020. Sub-Regional Differences of the Human Amniotic Membrane and Their Potential Impact on Tissue Regeneration Application. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, doi: 10.3389/fbioe.2020.613804: 10 str.

Weinstein J. N., Akbani R., Broom B. M., Wang W., Verhaak R. G. W., McConkey D., Lerner S., Morgan M., Creighton C. J., Smith C., Kwiatkowski D. J., Cherniack A. D., Kim J., Sekhar Pedamallu C., Noble M. S., Al-Ahmadie H. A., Reuter V. E., Rosenberg J. E., Bajorin D. F., Bochner B. H., Solit D. B., Koppie T., Robinson B., Gordenin D. A., Fargo D., Klimczak L. J., Roberts S. A., Au J., Laird P. W., Hinoue T., Schultz N., Ramirez R., Hansel D., Hoadley K. A., Kim W. Y., Damrauer J. S., Baylin S. B., Mungall A. J., Gordon Robertson A., Chu A., Kwiatkowski D. J., Sougnez C., Cibulskis K., Lichtenstein L., Sivachenko A., Stewart C., Lawrence M. S., Getz G., Lander E., Gabriel S. B., Creighton C. J., Donehower L., Cherniack A. D., Kim J., Carter S. L., Saksena G., Schumacher S. E., Sougnez C., Freeman S. S., Jung J., Sekhar Pedamallu C., Bhatt A. S., Pugh T., Getz G., Beroukhi R., Gabriel S. B., Meyerson M., Mungall A. J., Gordon Robertson A., Chu A., Ally A., Balasundaram M., Butterfield Y. S. N., Dhalla N., Hirst C., Holt R. A., Jones S. J. M., Lee D., Li H. I., Marra M. A., Mayo M., Moore R. A., Schein J. E., Sipahimalani P., Tam A., Thiessen N., Wong T., Wye N., Bowlby R., Chuah E., Guin R., Jones S. J. M., Marra M. A., Hinoue T., Shen H., Bootwalla M. S., Triche Jr T., Lai P. H., Van Den Berg D. J., Weisenberger D. J., Laird P. W., Hansel D., Hoadley K. A., Balu S., Bodenheimer T., Damrauer Alan P. Hoyle J. S., Jefferys S. R., Meng S., Mose L. E., Simons J. V., Soloway M. G., Wu J., Kim W. Y., Parker J. S., Neil Hayes D., Roach J., Buda E., Jones C. D., Mieczkowski P. A., Tan D., Veluvolu U., Waring S., Todd Auman J., Perou C. M., Wilkerson M. D., Santoso N., Parfenov M., Ren X., Pantazi A., Hadjipanayis A., Seidman J., Kucherlapati R., Lee S., Yang L., Park P. J., Baylin S. B., Wei Xu A., Protopopov A., Zhang J., Bristow C., Mahadeshwar H. S., Seth S., Song X., Tang J., Zeng D., Chin L., Guo C., Weinstein J. N., Akbani R., Broom B. M., McConkey D., Casasent T. D., Liu W., Ju Z., Motter T., Peng B., Ryan M., Wang W., Verhaak R. G. W., Su X., Yang J. Y., Lorenzi P. L., Yao H., Zhang N., Zhang J., Mills G. B., Kim J., Noble M. S., Cho J., DiCara D., Frazer S., Gehlenborg N., Heiman D. I., Lin P., Liu Y., Stojanov P., Voet D., Zhang H., Zou L., Chin L., Getz G., Bernard B., Kreisberg D., Reynolds S., Rovira H., Shmulevich I., Ramirez R., Schultz N., Gao J., Jacobsen A., Arman Aksoy B., Antipin Y., Ciriello G., Dresdner G., Gross B., Lee W., Reva B., Shen R., Sinha R., Onur Sumer S., Weinhold N., Ladanyi M., Sander C., Benz C., Carlin D., Haussler D., Ng S., Paull E. O., Stuart J., Zhu J., Liu Y., Zhang W., Taylor B. S., Lichtenberg T. M., Zmuda E., Barr T., Black A. D., George M., Hanf B., Helsel C., McAllister C., Ramirez N. C., Tabler T. R., Weaver S., Wise L., Bowen J., Gastier-Foster J. M., Weinstein J. N., Lerner S., Jian W., Tello S., Ittman M., Castro P., McClenden W. D., Morgan M., Gibbs R., Liu Y., Saller C., Tarvin K., DiPiero J. M., Owens J., Bollag R., Li Q., Weinberger P., Czerwinski C., Huelsenbeck-Dill L., Iacocca M., Petrelli N., Rabeno B., 2014. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, 507, 7492:

315–322

- Wilshaw S. P., Kearney J., Fisher J., Ingham E. 2008. Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogeneic cells. *Tissue Engineering Part A*, 14, 4: 463–472
- Witjes J. A., Bruins H. M., Cathomas R., Comp erat E. M., Cowan N. C., Gakis G., Hern andez V., Linares Espin os E., Lorch A., Neuzillet Y., Rouanne M., Thalmann G. N., Veskim ae E., Ribal M. J., van der Heijden A. G. 2021. European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2020 Guidelines. *European Urology*, 79, 1: 82–104
- Wong-You-Cheong J. J., Woodward P. J., Manning M. A., Sesterhenn I. A. 2006. From the Archives of the AFIP: neoplasms of the urinary bladder: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*, 26, 2: 553–580
- Wong M. C. S., Fung F. D. H., Leung C., Cheung W. W. L., Goggins W. B., Ng C. F. 2018. The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Scientific Reports*, 8, 1, doi: 10.1038/s41598-018-19199-z: 12str.
- Wu M. F., Stachon T., Langenbacher A., Seitz B., Szentm ary N. 2017. Effect of Amniotic Membrane Suspension (AMS) and Amniotic Membrane Homogenate (AMH) on Human Corneal Epithelial Cell Viability, Migration and Proliferation *In vitro*. *Current Eye Research*, 42, 3: 351–357
- Wu X., Gan B., Yoo Y., Guan J. L. 2005. FAK-mediated src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation. *Developmental Cell*, 9, 2: 185–196
- Wu X., Suetsugu S., Cooper L. A., Takenawa T., Guan J. L. 2004. Focal adhesion kinase regulation of N-WASP subcellular localization and function. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 10: 9565–9576
- Wu Y., Li N., Ye C., Jiang X., Luo H., Zhang B., Zhang Y., Zhang Q. 2021. Focal adhesion kinase inhibitors, a heavy punch to cancer. *Discover Oncology*, 12, 1, doi.org/10.1007/s12672-021-00449-y: 15 str.
- Xia H., Nho R. S., Kahm J., Kleidon J., Henke C. A. 2004. Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 31: 33024–33034
- Xiong Y., Zu X., Wang L., Li Y., Chen M., He W., Qi L. 2021. The VIM-AS1/miR-655/ZEB1 axis modulates bladder cancer cell metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition. *Cancer cell international*, 21, 1, doi: 10.1186/s12935-021-01841-y: 15 str.
- Xu W., Yang Z., Lu N. 2015. A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition. *Cell Adh Migr*, 9, 4: 317–324
- Xu Y., Li N., Xiang R., Sun P. 2014. Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence. *Trends in*

- Biochemical Sciences, 6: 268–276
- Yadav L., Puri N., Rastogi V., Satpute P., Ahmad R., Kaur G. 2014. Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15, 3: 1085–1091
- Yam, J. W., Ko, F. C., Chan, C. Y., Yau, T. O., Tung, E. K., Leung, T. H., Jin, D. Y., Ng, I. O. 2006. Tensin2 variant 3 is associated with aggressive tumor behavior in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 44, 4: 881–890
- Yamazaki D., Kurisu S., Takenawa T. 2005. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Science*, 96, 7: 379–386
- Yang Y., Zheng H., Zhan Y., Fan S. 2019. An emerging tumor invasion mechanism about the collective cell migration. *American Journal of Translational Research*, 11, 9: 5301–5312
- Yelchuri M. L., Madhavi B., Gohil N., Sajeev H. S., Venkatesh Prajna N., Srinivasan S. 2017. *In vitro* Evaluation of the Drug Reservoir Function of Human Amniotic Membrane Using Moxifloxacin as a Model Drug. *Cornea*, 36, 5: 594–599
- You D., Xin J., Volk A., Wei W., Schmidt R., Scurti G., Nand S., Breuer E. K., Kuo P. C., Breslin P., Kini A. R., Nishimura M. I., Zeleznik-Le N. J., Zhang J. 2015. FAK mediates a compensatory survival signal parallel to PI3K-AKT in PTEN-null T-ALL cells. *Cell Reports*, 10, 12: 2055–2068
- Yu H., Gao M., Ma Y., Wang L., Shen Y., Liu X. 2018. Inhibition of cell migration by focal adhesion kinase: Time-dependent difference in integrin-induced signaling between endothelial and hepatoblastoma cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 41, 5: 2573–2588
- Yu X., Long Y. C., Shen H. M. 2015. Differential regulatory functions of three classes of phosphatidylinositol and phosphoinositide 3-kinases in autophagy. *Autophagy*, 11, 10: 1711–1728
- Yu Y., Skočaj M., Kreft M. E., Resnik N., Veranič P., Franceschi P., Sepčić K., Guella G. 2016. Comparative lipidomic study of urothelial cancer models: association with urothelial cancer cell invasiveness. *Molecular BioSystems*, 12, 11: 3266–3279
- Yun S. J., Kim W. J. 2013. Role of the epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer: from prognosis to therapeutic target. *The Korean Journal of Urological Oncology*, 54, 10: 645–650
- Zhai J., Lin H., Nie Z., Wu J., Cañete-Soler R., Schlaepfer W. W., Schlaepfer D. D. 2003. Direct interaction of focal adhesion kinase with p190RhoGEF. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 27: 24865–24873
- Zhang Q., Wang H., Wei H., Zhang D. 2018a. Focal adhesion kinase (FAK) is associated with poor prognosis in urinary bladder carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 11, 2: 831–838
- Zhang S., Wang J., Chen T., Wang J., Wang Y., Yu Z., Zhao K., Zheng K., Chen Y.,

- Wang Z., Li B., Wang C., Huang W., Fu Z., Chen J. 2021. α -Actinin1 promotes tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer via the AKT/GSK3 β / β -Catenin pathway. *Bioengineered*, 12, 1: 5688–5704
- Zhang W., Lei C., Fan J., Wang J. 2016. miR-18a promotes cell proliferation of esophageal squamous cell carcinoma cells by increasing cyclin D1 via regulating PTEN-PI3K-AKT-mTOR signaling axis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 477, 1: 144–149
- Zhang, W., Mao, Y. Q., Wang, H., Yin, W. J., Zhu, S. X., Wang, W. C.. 2015. MiR-124 suppresses cell motility and adhesion by targeting talin 1 in prostate cancer cells. *Cancer Cell International*, 15, 1, doi: 10.1186/s12935-015-0189-x: 9 str.
- Zhang, X., Chattopadhyay, A., Ji, Q. S., Owen, J. D., Ruest, P. J., Carpenter, G., Hanks, S. K. 1999. Focal adhesion kinase promotes phospholipase C-gamma1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 16: 9021–9026
- Zhang Y., Wang S., Qian W., Ji D., Wang Q., Zhang Z., Wang S., Ji B., Fu Z., Sun Y. 2018b. uc.338 targets p21 and cyclin D1 via PI3K/AKT pathway activation to promote cell proliferation in colorectal cancer. *Oncology Reports*, 40, 2: 1119–1128
- Zhao J., Guan J. L. 2009. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28, 1: 35–49
- Zhao J., Pestell R., Guan J. L. 2001. Transcriptional activation of cyclin D1 promoter by FAK contributes to cell cycle progression. *Molecular Biology of the Cell*, 12, 12: 4066–4077
- Zupančič D., Mrak Poljsak K., Kreft M. E. 2018. Co-culturing porcine normal urothelial cells, urinary bladder fibroblasts and smooth muscle cells for tissue engineering research. *Cell Biology International*, 42, 4: 411–424
- Železnik T. 2016. Vloga amnijske membrane pri zaviranju rasti rakavih urotelijskih celic in uropatogene bakterije *Escherichia coli*. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 120 str.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mateji Erdani Kreft, ki me je nesebično podpirala in spodbujala v času doktorskega študija. Mateja, hvala ti, ker si mi dala priložnost spoznati svet raziskovanja in me s konstruktivnimi nasveti vodila skozenj.

Najlepša hvala predsednici komisije doc. dr. Nadi Žnidaršič ter članom komisije prof. dr. Petru Veraniču in prof. dr. Maji Čemažar za temeljit pregled in konstruktivne pripombe, ki so močno pripomogli k izboljšavi doktorske disertacije. Zahvaljujem se prof. dr. Maji Čemažar in njeni raziskovalni skupini za pripravo celične linije T24-eGFP.

Hvala vsem kolegicam in kolegom iz Inštituta za biologijo celice za vso pomoč in podporo, ki ste mi jo nudili med študijem. Posebno se zahvaljujem Taji, Larisi in Urški iz nekdanje mlade sobe. Hvala vam, da ste mi nesebično pomagale in me naučile, kako biti pravi raziskovalec. Iskrena hvala tehničnim sodelavkam, Sanji, Nadi, Sabini in Lindi, za pomoč pri raziskovalnem delu in za vso dobro vzdušje.

Posebno zahvalo namenjam Lari. Hvala ti, ker si mi stala ob strani v najboljših in najtežjih trenutkih. Brez tvoje brezpogojne ljubezni in razumevanja mi ne bi uspelo. Zahvaljujem se tudi družini Slavec-Gornik za vso podporo med doktoratom.

Најмногу им се заблагодарувам на моите родители Мирјана и Сашо. Ви благодарам за вашата пожртвуваност и безусловната поддршка низ сите овие години. И се заблагодарувам на мојата сестра Ана која е мојата најголема гордост. Посебна благодарност упатувам до моите дедовци Томислав и Милош. Ви благодарам што секогаш верувавте во мене и што ми го покажавте вистинскиот пат. Се заблагодарувам на сите мои пријатели кои постојано ме бодреа и подржуваа во текот на моите студии.

Овој докторски труд го посветувам на моето семејство. Ви благодарам што ми помогнавте да станам тоа што сум денес. Ве сакам.