

Celično-biološki mehanizmi delovanja amnijske membrane proti raku in možnosti za njeno uporabo pri zdravljenju raka

Cell-biological mechanisms of amniotic membrane anticancer activity and the possibilities of its use in anticancer therapy

Taja Železnik Ramuta,¹ Tina Cirman,² Mateja Erdani Kreft¹

¹ Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

² Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana, Slovenija

Korespondenca/ Correspondence:

Mateja Erdani Kreft,
e: mateja.erdani@mf.uni-lj.si

Ključne besede:

amnijska membrana; rak; protirakavo delovanje; imunomodulacijsko delovanje; regenerativna medicina

Key words:

amniotic membrane; cancer; anticancer activity; immunomodulatory activity; regenerative medicine

Prispelo: 23. 11. 2017

Sprejeto: 2. 3. 2018

Izvleček

Izhodišče: Osnovna naloga amnijske membrane je zaščita ploda pred zunanjimi mehanskimi vplivi in izsušitvijo ter zagotavljanje primerne okolja za njegov razvoj. Razumevanje zgradbe in delovanja amnijske membrane je pomembno za njeno klinično uporabo, še posebej v regenerativni medicini. V prispevku opisujemo številne, za regenerativno medicino zelo zaželene mehanske in biološke lastnosti amnijske membrane ter predstavljamo njene protirakave lastnosti.

Zaključek: Študije na modelih *in vitro* kot tudi študije na živalskih modelih dokazujejo, da amnijska membrana zavira proliferacijo rakavih celic in sproža njihovo apoptozo, deluje imunozaviralno, zavira energijsko presnovo rakavih celic in angiogenezo. Delo podaja pregled najnovejših spoznanj o protirakavem delovanju amnijske membrane in vrednoti njeno potencialno uporabo v zdravljenju raka in regenerativni medicini.

Abstract

Background: The primary role of amniotic membrane is to protect the foetus from drying out and to provide a suitable environment for its development. Understanding of the structure and function of amniotic membrane is important in terms of its use in clinical settings, especially in regenerative medicine. This paper describes favourable mechanical and biological properties of amniotic membrane for regenerative medicine uses and emphasizes its anti-cancer properties.

Conclusion: Studies on *in vitro* as well as on animal models demonstrate that amniotic membrane inhibits the proliferation of cancer cells and induces their apoptosis. It also acts immunoinhibitory, and it inhibits the metabolic activity of cancer cells and angiogenesis. This work provides an overview of the latest knowledge about the anticancer role of amniotic membrane and evaluates the potential of the amniotic membrane use for anticancer therapy and regenerative medicine.

Citirajte kot/Cite as: Ramuta TŽ, Cirman T, Kreft ME. [Cell-biological mechanisms of amniotic membrane anticancer activity and the possibilities of its use in anticancer therapy]. *Zdrav Vestn.* 2018;87(9–10):483–92.

DOI: 10.6016/ZdravWestn.2674

1 Uvod

Amnijska membrana (AM) je ekstraembrionalna ovojnica, ki obdaja s plodovnico napolnjeno votlino, v kateri se razvija plod (1). Sestavljajo jo enoskladni epitel amnijskih epitelnih celic, debela bazalna lamina in vezivno tkivo (tj. mezenhimski del AM, imenovan tudi stroma) (2,3). Iz amnijske membrane so osamili dve populaciji celic z lastnostmi matičnih celic, in sicer amnijske epitelne celice (AEC) in amnijske mezenhimske stromalne celice (AMSC) (Slika 1). Obe populaciji izražata površinske in znotrajcelične označevalce, značilne za matične celice (npr. SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81, OCT-4 idr.) in se lahko diferencirata v različne tipe celic (4,5). Prednost AM je tudi v tem, da je njena uporaba etično sprejemljiva, saj posteljico in AM po porodu navadno zavržejo.

Amnijska membrana ima številne lastnosti, zaradi katerih je primerna za klinično uporabo: a) zagotavlja zunajcelični matriks, ki omogoča pritrjanje in proliferacijo celic (6); b) spodbuja epitelizacijo in zavira brazgotinjenje (3,7-10); c) deluje protivnetno (11); č) ni imunogena (6,12); d) deluje angiogeno in protiangiogeno (13-15); e) deluje protimikrobno (16,17); f) sintetizira naravne inhibitorje metaloproteinaz (18) in g) deluje protirakavo (14,19,20).

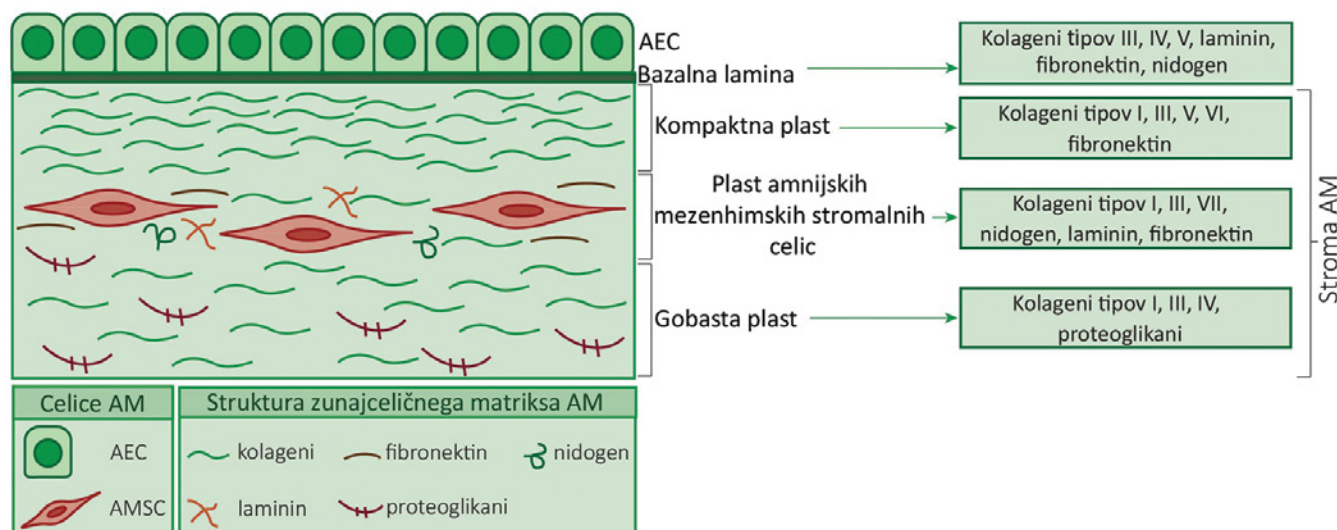
Prvi dokumentirani primer uporabe AM v klinične namene sega v leto 1910, ko je Davis uporabil AM pri rekonstrukciji kože (21). Zdaj AM najpogosteje uporabljajo v oftalmologiji, predvsem pri rekonstrukcijah roženice in očesne veznice, saj spodbuja regeneracijo epitela in zavira vnetje ter brazgotinjenje (22). Poleg tega se AM uporablja tudi v dermatologiji za zdravljenje opeklin in kroničnih razjed (23) ter pri nekaterih kirurških postopkih, npr. pri preprečevanju adhezij po operaciji, v abdominalni

kirurgiji pri preprečevanju peritonealnih adhezij (24) in zdravljenju gastroshize (25), pri operacijah rekonstrukcije vagine (26) in sečil (26-28).

Rak je pri ljudeh drugi najpogostejši vzrok smrti. Kljub napredku pri preprečevanju in zdravljenju rakavih bolezni se število zbolelih za rakom zaradi povečevanja in staranja prebivalstva ter različnih dejavnikov tveganja (kajenje, debelost, prehrana, okoljski dejavniki) še vedno povečuje (29). Tumorji so kompleksni sistemi, ki poleg rakavih celic vključujejo tudi celice imunskega sistema, endotelne celice ter z rakom povezane fibroblaste (*angl.* cancer-associated fibroblasts, CAFs) (30). Hanahan in Weinberg sta v letih 2000 in 2011 opisala bistvene lastnosti rakavih celic: a) sposobnost neprestanih celičnih delitev, b) neodzivnost na signale, ki zavirajo celične delitve, c) izogibanje apoptozi, č) neskončen potencial za mitotske delitve, d) spodbujanje angiogeneze, e) invazivnost in metastaziranje, f) genomski nestabilnost, g) reprogramiranje celične energetske presnove, h) spodbujanje vnetja, i) izogibanje imunskemu sistemu (31,32).

2 Amnijska membrana zavira proliferacijo rakavih celic

Normalne, zdrave celice natančno nadzorujejo biosintezno pot in sproščanje signalnih molekul, ki spodbujajo njihovo rast ter jih vodijo v mitotsko delitev oz. zavirajo rast celic in preprečujejo njihov vstop v mitotsko delitev. S tem zagotavljajo vzdrževanje normalne tkivne arhitekture in funkcije. Rakave celice med razvojem pridobijo sposobnost izogibanja celičnim signalom, ki zavirajo celične delitve (32), zaradi česar pridobijo



Slika 1: Molekularna in histološka zgradba amnijske membrane (AM). AM sestavljajo enoskladni epitel amnijskih epitelnih celic (AEC), bazalna lamina, amnijske mezenhimske stromalne celice (AMSC) in stroma AM, ki jo sestavljajo kompaktna plast, plast amnijskih mezenhimskih stromalnih celic in gobasta plast. Zunajcelični matriks AM sestavljajo različni kolageni in laminini, fibronektin, nidogen in proteoglikani.

bijo sposobnost neprestanih mitotskih delitev.

Rast nekaterih rakavih celičnih linij hematopoetskega in nehematopoetskega izvora zavirajo AMSC. Pod vplivom AMSC se celični cikel rakavih celic ustavi v fazi G_0/G_1 , saj AMSC povzročijo, da se v rakavih celicah zmanjša količina spodbujevalcev napredovanja celičnega cikla in poveča količina zaviralcev celičnega cikla. Zaviralni učinek AMSC na rakave celice so dokazali tako pri neposrednem stiku rakavih celic in AMSC v kokulturi, kot tudi v primeru, ko so bile celice fizično ločene in so bile AMSC nasajene na nosilce s porozno membrano, ki so bili vstavljeni v večprekatno petrijevko, rakave celice pa so bile nasajene na dno večprekatne petrijevke (33-35).

Natančneje, v rakavih celicah se v prisotnosti AMSC zmanjša izražanje genov določenih ciklinov (ciklini D2/ E1/ H) in od ciklinov odvisnih kinaz (*angl.* cyclin-dependent kinase; Cdk2, Cdk4, Cdk6), ki spodbujajo napredovanje celičnega cikla. Zmanjšano je bilo tudi izražanje spodbujevalcev celičnega cikla, ki

omogočajo napredovanje v fazi G_1 , mini kromosom vzdrževalnega kompleksa (*angl.* mini-chromosome maintenance complex; MCM2, MCM4, MCM5), proliferajočega celičnega jedrnega antigena (*angl.* proliferating cell nuclear antigen, PCNA) (33). Nasprotno pa je bilo povečano izražanje zaviralcev celičnega cikla, ki zavirajo napredovanje celičnega cikla (npr. inhibitorja od ciklinov odvisnih kinaz p21 in p15) in proteina pRb, ki zavira izražanje ciklinov A in E v fazi G_0/G_1 (33,34). AMSC tako lahko ustavi jo čezmerne mitotske delitve, ki so ena bistvenih lastnosti rakavih celic in zato pomembna tarča pri zdravljenju raka.

3 Amnijska membrana spodbuja apoptozo rakavih celic

Apoptoza je programirana celična smrt, ki je naravna prepreka v razvoju raka. Ta se razvije kot posledica več genskih in kromosomskih mutacij, ki normalno celico spremenijo v rakavo, pri

čemer je pridobitev sposobnosti za izogibanje apoptozi eden glavnih korakov karcinogeneze (32,36).

Pri gojenju rakavih celic v kokulturi z AEC ali pod vplivom kondicionirane medija iz AM (tj. hranilnega medija, v katerem so gojili intaktno AM ali le celice iz AM) se v rakavih celicah poveča izražanje proapoptoznih proteinov (14) in značilno zmanjša preživetje teh celic (37). Jiao in sod. (38) so pri podganah dokazali, da AMSC zavirajo celično migracijo in da se zaradi apoptoze, ki jo AMSC sprožijo, zmanjša prostornino možganskih tumorjev gliomov za 30–50 % (14,38) (Slika 2). Niknejad in sod. (2014) so dokazali, da kondicionirani medij iz AM zavira izražanje proteina toplotnega šoka Hsp90, kar sproži zaustavitev celičnega cikla in apoptozo ter zavre angiogenezo (Slika 2) (14).

Tudi proteinski izvleček AM, ki ga pripravijo s homogenizacijo in sonifikacijo AM, sproži apoptozo celic jetrnega karcinoma *in vitro* (celic HepG2, Hep3B2.1–8 in HuH7). Izvleček skoraj popolnoma zavre tudi rast tumorjev pri miših, inokuliranih s celicami HepG2, medtem ko ne zavre rasti tumorjev, inokuliranih s celicami HuH7. Avtorji predvidevajo, da je to povezano z močno povečanim izražanjem mutiranega proteina p53, ki zavira tumor v celicah HuH7, zaradi česar se te celice tudi slabše odzivajo na kemoterapijo z zdravili doksorubicin in paklitaksel (39,40) (Slika 2).

Vzroki za zmanjšano preživetje rakavih celic pod vplivom AM so v citotoksičnih dejavnikih, ki jih izločajo AEC. Citotoksične dejavnike izločajo tudi AMSC (41) (Slika 2).

Dosedanje raziskave kažejo, da AM lahko zaustavi proliferacijo rakavih celic ali celo sproži njihovo apoptozo (20,33,38,40). Razlike v delovanju AM so lahko posledica uporabe različnih de-

lov AM (samo AMSC ali intaktna AM) in različnih rakavih celičnih linij (celične linije hematopoetskega in nehematopoetskega izvora, epitelne celice, jetrne celice). Ob možni uporabi AM pri zdravljenju raka se je zato treba zavedati, da se načini, s katerimi AM zavira rast ali sproži apoptozo rakavih celic, razlikujejo glede na tip celic in to tudi upoštevati pri načrtovanju klinične študije.

4 Amnijska membrana vpliva na angiogenezo

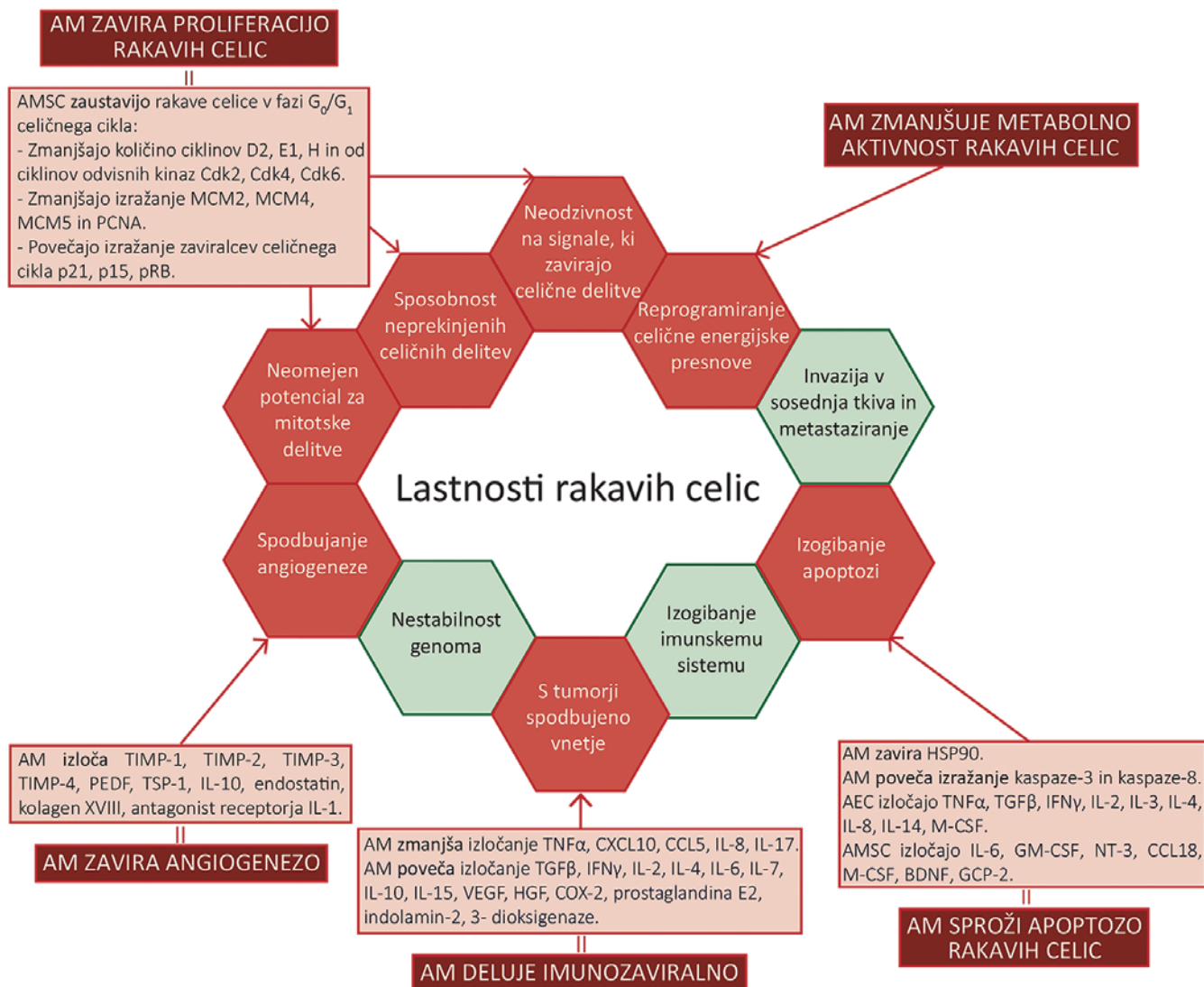
Zaradi svoje hitre rasti potrebujejo tumorji izdatnejši vir hranil in kisika ter intenzivnejše odvajanje presnovnih odpadkov in ogljikovega dioksida v primerjavi z normalnimi tkivi. Za preživetje tumorja je zato bistvena zmožnost razvoja žil – angiogeneza, na katero vpliva tudi AM.

Intaktna AM z AEC onemogoča angiogenezo (14,15). AEC namreč izločajo protiangiogene dejavnike, ki zavirajo nastajanje novih krvnih žil in s tem preprečujejo oskrbo tumorja s hranili ter kisikom. AM vsebuje tudi različne proteine zunajceličnega matriksa, npr. kolagen IV, fibronektin in kolagen VII, ki so vpleteni v zaviranje angiogeneze v roženici (8,15) (Slika 2). Če iz AM odstranimo AEC, prevladajo proangiogeni dejavniki, ki jih izločajo AMSC (Slika 2) (15,42).

Vse dosedanje študije kažejo, da AEC in proteini zunajceličnega matriksa AM zavirajo angiogenezo, medtem ko jo AMSC spodbujajo (15,42).

5 Amnijska membrana zmanjšuje energijsko presnovo rakavih celic

Za nenadzorovano celično proliferacijo je nujna sprememba celične energijske presnove, ki omogoča rast in preživetje rakavih celic. V primerjavi z



Slika 2: Učinek amnijske membrane (AM) na lastnosti rakavih celic. a) lastnosti rakavih celic. b) protirakavo delovanje AM je rezultat različnih učinkov AM na rakave celice, in sicer AM zavira proliferacijo rakavih celic ter njihovo energijsko presnovo, deluje imunoza viralno, zavira angiogenezo in sproži apoptozo rakavih celic (povzeto po Hanahan in Weinberg, 2011 (32)). BDNF (možganski nevrotrofični dejavnik), CCL5 (kemokin CCL 5), COX-2 (ciklooksigenaza 2), CXCL-10 (kemokin CXCL-10), GCP-2 (granulocitni kemotaktični protein), GM-CSF (granulocitne in monocitne kolonije stimulirajoči dejavnik), HGF (hepatocitni rastni dejavnik), HSP90 (protein toplotnega šoka 90), IL-1/-2/-4/-6/-7/-8/-10/-14/-15/-17 (interlevkin-1/-2/-4/-6/-7/-8/-10/-14/-15/-17), IFN γ (interferon γ), MCM-2/-4/-5 (komponenta -2/-4/-5 vzdrževalnega kompleksa mini kromosoma), M-CSF (makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik), NT-3 (nevrotrofin-3), PCNA (proliferajoči celični jedrni antigen), PEDF (dejavnik pigmentnega epitela), TGF β (transformirajoči rastni dejavnik β), TIMP 1/2/3/4 (tkivni inhibitor metaloproteinaze 1/2/3/4), TNF- α (tumor nekrotizirajoči dejavnik α), TSP-1 (trombospondin-1), VEGF (žilni endotelni rastni dejavnik).

normalnimi (zdravimi) celicami, ki pridobivajo energijo predvsem z oksidativno fosforilacijo, rakave celice večinoma pridobivajo energijo z aerobno glikolizo (t. i. Warburgov učinek) (43). Takšne

spremembe energijske presnove rakavim celicam omogočijo povečano tvorbo energije, zadostno biosintezo makromolekul in ohranjanje ravnovesja redoks ter s tem nastanek tumorjev (32,44).

Proteinski izvleček iz AM, pripravljen s homogenizacijo in sonikacijo AM, vpliva na presnovo rakavih celic (Slika 2). Mamede in sod. (2014) so dokazali, da proteinski izvleček iz AM zavira energijsko presnovno aktivnost pri 14 različnih celičnih linijah, pri petih celičnih linijah celo več kot 50 % presnovne aktivnosti (celične linije raka prostate PC3, raka črevesja WiDr, raka trebušne slinavke PANC-1, hepatokarcinoma HepG2 in Hep3B2.1-7) (45). Obenem so dokazali, da proteinski izvleček iz AM spodbuja presnovno aktivnost štirih drugih celičnih linij (celične linije raka debelega črevesja C2BBel in LS1034, raka dojke HCC1954, raka žolčevodov TFK-1), zato predvidevajo, da je odziv rakavih celic na AM specifičen glede na genetski profil oziroma tip rakave celice (40).

6 Ali lahko imunozaviralno delovanje amnijske membrane izkoristimo v prid zdravljenju raka?

Vpliv imunskega sistema na rakave celice je predmet številnih raziskav, ki so pokazale, da lahko imunski sistem omogoči transformacijo normalnih celic v rakave celice, vpliva na imunogenost tumorja ter glede na stopnjo razvoja tumorja in njegovega mikrookolja prepreči ali nadzoruje rast tumorja (46). Tako npr. vnetje prispeva k razvoju tumorja, saj z njim pridejo v mikrookolje tumorja *a)* rastni dejavniki, ki spodbujajo delitve rakavih celic, *b)* proangiogeni dejavniki, *c)* encimi, ki modulirajo zunajcelični matriks in omogočajo angiogenezo, invazijo ter metastaziranje, *č)* signalne molekule, ki vodijo v aktiviranje epitelno-mezenhimskega prehoda in *d)* dejavniki, ki zavirajo apoptozo (32,46). Poleg tega imunske celice izločajo reaktivne

kisikove zvrsti, ki delujejo mutageno na sosednje celice (47).

AM deluje imunozaviralno preko različnih signalnih poti. Celice AM zavirajo diferenciacijo monocitov v dendritične celice in s tem zmanjšajo njihovo sposobnost stimulacije limfocitov T. Celice AM namreč ustavijo monocite v fazi G₀ celičnega cikla in sintetizirajo IL-6, ki je vključen v zaviranje diferenciacije celic CD34+ in monocitov v dendritične celice (35) (Slika 2).

Celice AM (AMSC in AEC) zavirajo proliferacijo enojedrnih celic iz periferne krvi (*angl.* peripheral blood mononuclear cell, PBMC) tako v kokulturi (celice so v neposrednem stiku) kot v sistemu, kjer so celice različnih tipov med seboj fizično ločene (na nosilcih s porozno membrano). Zaviralni učinek na proliferacijo PBMC pa ima tudi zgolj kondicionirani medij iz celic AM (Slika 2) (41,48-50).

Različne študije kažejo, da rakave celice pogosto povečajo izločanje vnetnega kemokina IL-8 pri odzivu na kemoterapevtike ali druge stresne okoljske razmere (npr. hipoksijo) (51). S tem privabijo imunske celice v tumorsko mikrookolje in zato spodbudijo nastanek metastaz (52). Signalizacija IL-8 hkrati vpliva tudi na stimulacijo proliferacije (53), migracije, invazijo rakavih celic (54,55) in celo pomaga rakavim celicam, da se izognejo apoptozi (51,56). Magatti in sod. poročajo, da AEC in AMSC zavirajo izločanje IL-8 v kokulturi z dendritičnimi celicami (57). Predvidevamo, da tovrstni imunozaviralni učinek AM lahko z zaviranjem vnetja prispeva tudi k omejevanju razvoja tumorja.

Po drugi strani lahko imunozaviralni učinek AM tudi omejuje imunski odziv, ki ščiti pred razvojem tumorjev. Naravne celice ubijalke zaradi svoje citolitične aktivnosti in sinteze vnetnih citokinov igrajo pomembno vlogo pri protivirusnem in protirakavem imunskem odzivu.

Delovanje naravnih celic ubijalk močno uravnava receptorji na površini celic, saj je za lizo tarčne celice potrebno izražanje liganda/ligandov na površini tarčne celice, ki ga/jih prepozna receptor naravne celice ubijalke. AEC sintetizirajo inhibicijski dejavnik migracije (MMIF), ki je zaviralec migracije makrofagov in hkrati zaviralec z naravnimi celicami ubijalkami posredovane lize celic (49,58).

Celice AM torej delujejo imunozaviralno, in sicer: a) celice AM so hipoinmunogene in zavirajo tvorbo ter diferenciacijo antigen predstavitev celic, b) celice AM so sposobne modulacije fenotipa limfocitov T in imunskega odziva *in vitro*, predvsem pa so sposobne zaviranja alogene proliferacije limfocitov, c) celice AM zavirajo sintezo vnetnih citokinov ter povzročijo imunozaviralno delovanje lokalnega okolja (11). Prednost imunozaviralnega delovanja AM v mikrookolju tumorja je predvsem v tem, da na mestu vnosa AM ne pride do vnetja. S tem bi lahko preprečili dostop rastnih in proangiogenih dejavnikov ter encimov, ki bi modulirali zunajcelični matriks, v tumorsko mikrookolje in s tem onemogočili/omejili nadaljnji razvoj tumorja. V prihodnosti bodo vsekakor potrebne dodatne raziskave, ki bodo pokazale, ali lahko imunozaviralni učinek AM izkoristimo pri zdravljenju raka tudi v pogojih *in vivo*.

7 Zaključek

AM se zdaj najpogosteje uporablja v oftalmologiji in dermatologiji (26), hkrati pa narašča število študij, ki raziskujejo možnosti uporabe AM na drugih kliničnih področjih. Od leta 2002 je bilo v okviru ameriških Nacionalnih inštitutov za zdravje (National Institutes of Health, NIH) zaključenih 127 kliničnih študij, v katerih so preverjali mož-

nost uporabe AM v kliniki, trenutno pa poteka 128 tovrstnih študij (59). Ker je področje uporabe AM pri potencialnem zdravljenju oziroma preprečevanju napredovanja rakavih bolezni sorazmerno novo področje, zaključenih kliničnih študij s tega področja še ni. Rezultati predkliničnih študij *in vitro* ter *in vivo* kažejo, da AM selektivno citotoksično deluje na različne tipe rakavih celic, medtem ko na normalne (zdrave) celice ne učinkuje. To je pomembno za potencialno uporabo AM pri zdravljenju raka, saj s tem zagotovimo, da zdravilo ne poškoduje zdravih celic. Trenutno na Univerzi v Miamiu v sodelovanju s podjetjem Vivex Biomedical izvajajo drugo fazo klinične študije (identifikacijska številka NCT02710422), za katero še evidentirajo bolnike s karcinomom prostate. V študiji bodo nevrovaskularni vozeli, ki ostane po prostatektomiji, pokrili z dehidrirano AM, nato pa na vsake 3 mesece do 12 mesecev po operaciji merili raven prostatičnega specifičnega antigena (PSA) v krvi, ovrednotili uhajanje urina ter erektilno funkcijo preiskovancev. Študija se je začela maja 2016, trajala pa bo do aprila 2021. Študija je odprtega tipa, vanjo bo vključenih 280 bolnikov – 140 v kontrolno (placebo) skupino, 140 pa jih bo prejelo AM (59). Zagotovo bodo ta in prihodnje raziskave pomembno dopolnile naše znanje o protirakavem delovanju AM ter s tem morda še razširile nabor uporabe AM v terapevtske namene.

8 Seznam kratic

- AM – amnijska membrana
- AMSC – amnijske mezenhimske stromalne celice
- AEC – amnijske epitelne celice
- BDNF – možganski nevrotrofični dejavnik (*angl.* brain-derived neurotrophic factor)

- CCL_{2/5/18} – kemokin CCL_{2/5/18} (*angl.* chemokine (C-C motif) ligand 2/5/18)
- Cdk_{4/6} – od ciklinov odvisna kinaza 4/6 (*angl.* cyclin-dependent kinase 4/6)
- CXCL_{1/9/10} – kemokin CXCL_{1/9/10} (*angl.* chemokine (C-X-C motif) ligand 1/9/10)
- COX-2 – ciklooksigenaza 2
- GCP-2 – granulocitni kemotaktični protein (*angl.* granulocyte chemotactic protein 2)
- GM-CSF – granulocitne in monocitne kolonije stimulirajoči dejavnik (*angl.* granulocyte macrophage colony-stimulating factor)
- HSP₉₀ – protein toplotnega šoka 90 (*angl.* heat shock protein 90)
- ICAM – intravaskularna adhezijska molekula (*angl.* Intravascular adhesion molecule)
- IL – interlevkin
- IFN γ – interferon γ
- M-CSF – makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik (*angl.* macrophage colony-stimulating factor)
- MCM_{2, -4, -5} – komponenta 2/4/5 vzdrževalnega kompleksa mini kromosoma (*angl.* mini-chromosome maintenance complex 2)
- MMIF – inhibicijski dejavnik migracije makrofagov (*angl.* macrophage migration inhibitory factor)
- PCNA – proliferirajoči celični jedrni antigen (*angl.* proliferating cell nuclear antigen)
- PEDF – dejavnik pigmentnega epitelja (serpin F1 (SERPINF1)) (*angl.* pigment epithelium-derived factor)
- P BMC – enojedrne celice iz periferne krvi (*angl.* peripheral blood mononuclear cells)
- PSA – prostatični specifični antigen (*angl.* prostate specific antigen)
- TNF α – tumor nekrotizirajoči dejavnik α (*angl.* tumor necrosis factor α)
- TGF β – transformirajoči rastni dejavnik β (*angl.* transforming growth factor β)
- TIMP 1/2/3/4 – tkivni inhibitor metaloproteinaze 1/2/3/4 (*angl.* tissue inhibitor of metalloproteinase 1/2/3/4)
- TSP-1 – trombospondin-1
- VEGF – žilni endotelni rastni dejavnik (*angl.* vascular endothelial growth factor)

9 Zahvala

Avtorji se iskreno zahvaljujemo Ginekološki kliniki Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani in vsem porodnicam, ki so darovale amnijsko membrano v raziskovalne ali klinične namene. Najlepša hvala tudi Cvetani Tavzes za jezikovno redakcijo besedila. Delo je nastalo v okviru raziskovalnega programa št. P3-0108, projekta št. J4-7494 in projekta mladi raziskovalec, ki jih je sofinancirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz državnega proračuna.

Literatura

1. Hilmy N, Yusof N. Anatomy and Histology of Amnion. Human Amniotic Membrane. WORLD SCIENTIFIC; 2017. pp. 87–101.
2. Cirman T, Beltram M, Schollmayer P, Rožman P, Kreft ME. Amniotic membrane properties and current practice of amniotic membrane use in ophthalmology in Slovenia. Cell Tissue Bank. 2014 Jun;15(2):177–92.
3. Jerman UD, Veranič P, Kreft ME. Amniotic membrane scaffolds enable the development of tissue-engineered urothelium with molecular and ultrastructural properties comparable to that of native urothelium. Tissue Eng Part C Methods. 2014 Apr;20(4):317–27.
4. Parolini O, Soncini M, Evangelista M, Schmidt D. Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine? Regen Med. 2009 Mar;4(2):275–91.

5. Caruso M, Evangelista M, Parolini O. Human term placental cells: phenotype, properties and new avenues in regenerative medicine. *Int J Mol Cell Med*. 2012;1(2):64–74.
6. Cornwell KG, Landsman A, James KS. Extracellular matrix biomaterials for soft tissue repair. *Clin Podiatr Med Surg*. 2009 Oct;26(4):507–23.
7. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res*. 2000 Mar;20(3):173–7.
8. Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea*. 1999 Jan;18(1):73–9.
9. Kim JS, Kim JC, Na BK, Jeong JM, Song CY. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res*. 2000 Mar;70(3):329–37.
10. Jerman UD, Kreft ME, Veranič P. Epithelial-Mesenchymal Interactions in Urinary Bladder and Small Intestine and How to Apply Them in Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015 Dec;21(6):521–30.
11. Insausti CL, Blanquer M, García-Hernández AM, Castellanos G, Moraleda JM. Amniotic membrane-derived stem cells: immunomodulatory properties and potential clinical application. *Stem Cells Cloning*. 2014 Mar;7:53–63.
12. Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol*. 2002 Nov-Dec;21(6):471–95.
13. Koob TJ, Lim JJ, Massee M, Zabek N, Denozière G. Properties of dehydrated human amnion/chorion composite grafts: implications for wound repair and soft tissue regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014 Aug;102(6):1353–62.
14. Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H, Abolghasemi H. Human amniotic epithelial cells induce apoptosis of cancer cells: a new anti-tumor therapeutic strategy. *Cytotherapy*. 2014 Jan;16(1):33–40.
15. Niknejad H, Paeini-Vayghan G, Tehrani FA, Khayat-Khoei M, Peirovi H. Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. *Placenta*. 2013 Apr;34(4):340–5.
16. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta*. 2007 Feb-Mar;28(2-3):161–9.
17. Kjaergaard N, Hein M, Hyttel L, Helmig RB, Schönheyder HC, Ulbjerg N, et al. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001 Feb;94(2):224–9.
18. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*. 2000 May;19(3):348–52.
19. Rocha SC, Baptista CJ. Biochemical Properties of Amniotic Membrane. V: Mamede AC, Botelho MF, ur. *Amniotic Membrane*. Netherlands: Springer; 2015. pp. 19–40.
20. Niknejad H, Yazdanpanah G, Mirmasoumi M, Abolghasemi H, Peirovi H, Ahmadiani A. Inhibition of HSP90 could be possible mechanism for anti-cancer property of amniotic membrane. *Med Hypotheses*. 2013 Nov;81(5):862–5.
21. Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J*. 1910;15:87.
22. Costa E, Murta JN. Amniotic Membrane in Ophthalmology. In: Mamede AC, Botelho MF, editors. *Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2015. pp. 105–22.
23. Lo V, Pope E. Amniotic membrane use in dermatology. *Int J Dermatol*. 2009 Sep;48(9):935–40.
24. Kubanyi A. Prevention of peritoneal adhesions by transplantation of amnion. *BMJ*. 1947 Jul;2(4514):55–6.
25. Gharib M, Ure BM, Klose M. Use of amniotic grafts in the repair of gastroschisis. *Pediatr Surg Int*. 1996 Mar;11(2-3):96–9.
26. Silini AR, Cargnoni A, Magatti M, Pianta S, Parolini O. The Long Path of Human Placenta, and Its Derivatives, in Regenerative Medicine. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015 Oct;3:162.
27. Koziak A, Salagierski M, Marcheluk A, Szcześniewski R, Sosnowski M. Early experience in reconstruction of long ureteral strictures with allogenic amniotic membrane. *Int J Urol*. 2007 Jul;14(7):607–10.
28. Iijima K, Igawa Y, Imamura T, Morizumi T, Nikaido T, Konishi I, et al. Transplantation of preserved human amniotic membrane for bladder augmentation in rats. *Tissue Eng*. 2007 Mar;13(3):513–24.
29. Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, et al.; Global Burden of Disease Cancer Collaboration. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol*. 2015 Jul;1(4):505–27.
30. Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers (Basel)*. 2015 Dec;7(4):2443–58.
31. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan;100(1):57–70.
32. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
33. Magatti M, De Munari S, Vertua E, Parolini O. Amniotic membrane-derived cells inhibit proliferation of cancer cell lines by inducing cell cycle arrest. *J Cell Mol Med*. 2012 Sep;16(9):2208–18.
34. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009 Mar;9(3):153–66.
35. Magatti M, De Munari S, Vertua E, Nassauto C, Albertini A, Wengler GS, et al. Amniotic mesenchymal tissue cells inhibit dendritic cell differentiation of peripheral blood and amnion resident monocytes. *Cell Transplant*. 2009;18(8):899–914.

36. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011 Sep;30(1):87.
37. Mcllwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Apr;5(4):a008656.
38. Jiao H, Guan F, Yang B, Li J, Song L, Hu X, et al. Human amniotic membrane derived-mesenchymal stem cells induce C6 glioma apoptosis *in vivo* through the Bcl-2/caspase pathways. *Mol Biol Rep*. 2012 Jan;39(1):467–73.
39. Chan KT, Lung ML. Mutant p53 expression enhances drug resistance in a hepatocellular carcinoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004 Jun;53(6):519–26.
40. Mamede AC, Guerra S, Laranjo M, Carvalho MJ, Oliveira RC, Gonçalves AC, et al. Selective cytotoxicity and cell death induced by human amniotic membrane in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol*. 2015 Dec;32(12):257.
41. Kang NH, Hwang KA, Kim SU, Kim YB, Hyun SH, Jeung EB, et al. Potential antitumor therapeutic strategies of human amniotic membrane and amniotic fluid-derived stem cells. *Cancer Gene Ther*. 2012 Aug;19(8):517–22.
42. Paeini-Vayghan G, Peirovi H, Niknejad H. Inducing of angiogenesis is the net effect of the amniotic membrane without epithelial cells. *Irn J Med Hypotheses Ideas*. 2011;5:16–21.
43. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009 May;324(5930):1029–33.
44. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011 Feb;11(2):85–95.
45. Mamede AC, Laranjo M, Carvalho MJ, Abrantes AM, Pires AS, Brito AF, et al. Effect of amniotic membrane proteins in human cancer cell lines: an exploratory study. *J Membr Biol*. 2014 Apr;247(4):357–60.
46. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014 Apr;27:16–25.
47. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010 Mar;140(6):883–99.
48. Roelen DL, van der Mast BJ, in't Anker PS, Kleijburg C, Eikmans M, van Beelen E, et al. Differential immunomodulatory effects of fetal versus maternal multipotent stromal cells. *Hum Immunol*. 2009 Jan;70(1):16–23.
49. Chang CJ, Yen ML, Chen YC, Chien CC, Huang HI, Bai CH, et al. Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma. *Stem Cells*. 2006 Nov;24(11):2466–77.
50. Banas RA, Trumpower C, Bentelejewski C, Marshall V, Sing G, Zeevi A. Immunogenicity and immunomodulatory effects of amnion-derived multipotent progenitor cells. *Hum Immunol*. 2008;69(6):321–8.
51. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 Nov;14(21):6735–41.
52. De Larco JE, Wuertz BR, Furcht LT. The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8. *Clin Cancer Res*. 2004 Aug;10(15):4895–900.
53. Takamori H, Oades ZG, Hoch OC, Burger M, Schraufstatter IU. Autocrine growth effect of IL-8 and GROalpha on a human pancreatic cancer cell line, Capan-1. *Pancreas*. 2000 Jul;21(1):52–6.
54. Lang K, Niggemann B, Zanker KS, Entschladen F. Signal processing in migrating T24 human bladder carcinoma cells: role of the autocrine interleukin-8 loop. *Int J Cancer*. 2002 Jun;99(5):673–80.
55. Yao C, Lin Y, Chua MS, Ye CS, Bi J, Li W, et al. Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Int J Cancer*. 2007 Nov;121(9):1949–57.
56. Maxwell PJ, Gallagher R, Seaton A, Wilson C, Scullin P, Pettigrew J, et al. HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells. *Oncogene*. 2007 Nov;26(52):7333–45.
57. Magatti M, Caruso M, De Munari S, Vertua E, De D, Manuelpillai U, et al. Human Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal and Epithelial Cells Exert Different Effects on Monocyte-Derived Dendritic Cell Differentiation and Function. *Cell Transplant*. 2015;24(9):1733–52.
58. Li H, Niederhorn JY, Neelam S, Mayhew E, Word RA, McCulley JP, et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 Mar;46(3):900–7.
59. U.S. National Institutes of Health. Clinical Trials. U.S. Bethesda: National Library of Medicine; 2017 [cited 2018 Feb 26]. Dostopno: <https://clinicaltrials.gov>