

# Uspostava trodimenzionalne sferoidne kulture stanica tumora glave i vrata

---

**Vučemilo, Nikolina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:306904>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-21**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Nikolina Vučemilo

**Uspostava trodimenzionalne sferoidne  
kulture stanica tumora glave i vrata**

Diplomski rad

Zagreb, 2022

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Nikolina Vučemilo

**Establishing a three-dimensional spheroid  
culture of head and neck tumor cells**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj je rad izrađen u Laboratoriju za nasljedni rak, na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“, pod mentorstvom dr.sc. Maje Sabol te komentorstvom dr.sc. Sofie Ane Blažević, doc. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

# Zahvale

*Beskrajno hvala mojoj mentorici dr.sc. Maji Sabol na ukazanom povjerenju, predloženoj temi, strpljenju, savjetima te velikoj pomoći pri izradi i pisanju.*

*Hvala cijeloj ekipi Laboratorija za nasljedni rak i proteinsku dinamiku! Nikolina, Matea, Tina, Josipa, Ana i svi iz potkrovlja-hvala što ste uvijek bili tamo za savjet/šalu/razmjenu recepata/utjehu kad rezultati nisu išli kako sam zamislila 😊 Želim vam svima puno uspjeha u daljnjem radu, a prije svega da ostanete ljudi kakvi ste sada!*

*Hvala doc.dr.sc. Sofiji Ani Blažević što je pristala na komentorstvo te što je savjetima pridonijela u ostvarenju ovog rada.*

*Hvala svim mojim prijateljicama i prijateljima, na i izvan faxesa; posebno Lovri, Antoniu, Lei i Nori koji su slušali moja jadanja i bespotrebna paničarenja-svi smo znali da će sve biti dobro 😊*

*Hvala mojoj i Josipovoj obitelji što su mi omogućili da unatoč svemu dospijem do ovdje. Odužit ću se nekada 😊*

*I na kraju, hvala Josipu na bezuvjetnoj potpori svih 5 godina; na svim ispraćanjima i dočekivanjima s kolodvora, selidbama, determinacijama biljaka i životinja, strpljenju. Ova diploma je tvoja, koliko i moja.*

*Hvala Njemu čija mi je Riječ bila vodilja i utjeha na ovome putu.*

*„Ne trudite se postati uspješan, već vrijedan čovjek.“ Einstein*

---

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Uspostava trodimenzionalne sferoidne kulture stanica tumora glave i vrata Nikolina Vučemilo

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Dvodimenzionalne stanične kulture (2D) čest su alat u istraživanjima malignih oboljenja jer su jednostavne za uspostavu, održavanje te interpretaciju rezultata. Ipak, mnogi potencijalni novi lijekovi koji se ispituju na adherentnim staničnim kulturama *in vitro* nisu uspješni kada se testiraju u živim sustavima. Uvođenje trodimenzionalnih (3D) staničnih modela kao međukoraka u testiranju lijekova prije primjene na živim organizmima postaje sve zanimljivije u pretkliničkim ispitivanjima. Uz navedeno, rastuća otpornost na postojeće terapije, kao i molekularni mehanizmi nastanka iste, bili su neki od razloga uspostave trodimenzionalnih staničnih kultura. Cilj je ovog diplomskog rada bio uspostaviti 3D staničnu kulturu dviju staničnih linija karcinoma glave i vrata (FaDu i Detroit562) metodom viseće kapljice (eng. *hanging drop*), morfološki ih analizirati, tretirati inhibitorima signalnog puta HH-GLI, provjeriti ekspresiju ciljnih gena kao odgovor na tretmane te usporediti rezultate s 2D kulturom.

Ključne riječi: signalni put HH-GLI, mikrotumor, 3D stanična kultura

(76 stranica, 37 slika, 6 tablica, 71 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: dr.sc. Maja Sabol  
Komentor: dr.sc. Sofia Ana Blažević, docent

Ocjenitelji:  
Doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević  
Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić  
Izv.prof. dr. sc. Petra Peharec-Štefanić

Rad prihvaćen: 30.6.2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology  
Master thesis

### Establishing a three-dimensional spheroid culture of head and neck tumor cells

Nikolina Vučemilo

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Two-dimensional cell cultures (2D) are a common tool in malignancy research because they are easy to establish, maintain, and interpret results. However, many potential new drugs tested *in vitro* on adherent cell cultures are not successful when tested in living systems. The introduction of three-dimensional cell cultures (3D) cell models as an intermediate step in drug testing before application to living organisms is becoming increasingly interesting in preclinical trials. In addition, the growing resistance to existing therapies, as well as the molecular mechanisms of its development, were some of the reasons for the establishment of three-dimensional cell cultures. The aim of this thesis was to establish a 3D cell culture of two head and neck cancer cell lines (FaDu and Detroit562) using the hanging drop method, morphologically analyze them, treat them with HH-GLI signaling inhibitors, check the expression of target genes in response on treatments and compare results with 2D culture.

**Keywords:**

(76 pages, 37 figures, 6 tables, 71 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Maja Sabol

Cosupervisor: Asst. Prof. Dr. Sofia Ana Blažević

**Reviewers:**

Asst. Prof. Sofia Ana Blažević, PhD

Assoc. Prof. Maja Matulić, PhD

Assoc. Prof. Petra Peharec-Štefanić, PhD

Thesis accepted: 30.6.2022.

# SADRŽAJ

1.1.	Signalni put Hedgehog-Gli (HH-GLI).....	1
1.1.1.	Kanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI.....	1
1.1.2.	Nekanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI.....	4
1.1.3.	Transkripcijski faktori GLI.....	5
1.1.4.	Signalni put HH-GLI u karcinogenezi.....	7
1.1.5.	Spojevi koji modificiraju aktivnost signalnog puta HH-GLI.....	8
1.2.	Tumori glave i vrata.....	10
1.2.1.	Otpornost na postojeće terapije u tumorima glave i vrata .....	11
1.3.	Stanične kulture .....	12
1.3.1.	Dvodimenzionalne stanične kulture (2D) .....	12
1.3.2.	Trodimenzionalne stanične kulture (3D).....	13
1.3.3.	Sferodi .....	14
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	16
3.	MATERIJALI I METODE.....	17
3.1.	MATERIJALI .....	17
3.2.	METODE.....	17
3.2.1.	Odmrzavanje stanica i uspostava dvodimenzionalne (2D) adherentne stanične kulture .....	17
3.2.2.	Optimizacija uvjeta za uspostavu trodimenzionalne (3D) sferoidne kulture .....	18
3.2.3.	Ispitivanje citotoksičnosti arsenovog(III)oksida metodom MTT .....	20
3.2.4.	Tretiranje staničnih linija inhibitorima signalnog puta HH-GLI .....	22
3.2.5.	Izolacija RNA i mjerenje koncentracije RNA.....	26
3.2.6.	Reverzna transkripcija i kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (qPCR) .....	27
4.	REZULTATI.....	31
4.1.	Morfologija 2D staničnih kultura linija FaDu i Detroit562 .....	31
4.2.	Optimizacija uvjeta za uspostavu trodimenzionalne (3D) sferoidne kulture.....	31
4.3.	Ispitivanje citotoksičnosti ATO metodom MTT .....	34
4.4.	Analiza morfoloških karakteristika sferoida .....	35
4.4.1.	Analiza sferoida tretiranih inhibitorima signalnog puta HH-GLI tijekom formiranja .....	36
4.4.2.	Analiza naknadno tretiranih sferoida inhibitorima signalnog puta HH-GLI .....	47
4.5.	Analiza ekspresije gena <i>SHH</i> , <i>PTCH1</i> , <i>GLI1</i> , <i>GLI2</i> , <i>GLI3</i> .....	58
4.5.1.	Ekspresija gena <i>SHH</i> u adherentnoj staničnoj liniji FaDu te sferoidima .....	60
4.5.2.	Ekspresija gena <i>PTCH1</i> u adherentnoj staničnoj liniji FaDu te sferoidima .....	61
4.5.3.	Ekspresija gena <i>GLI1</i> u adherentnoj staničnoj liniji FaDu te sferoidima .....	61



<b>4.5.3. Ekspresija gena <i>GLI2</i> i <i>GLI3</i> u adherentnoj staničnoj liniji FaDu te sferoidima</b>	62
<b>5. RASPRAVA</b>	64
<b>6. ZAKLJUČAK</b>	69
<b>7. LITERATURA</b>	70
<b>ŽIVOTOPIS</b>	76

## POPIS KRATICA

ATO arsenov(III)oksid

BCC karcinom bazalnih stanica kože (eng. *basal cell carcinoma*)

BMP protein koštane morfogeneze (eng. *bone morphogenetic proteins*)

Caco-2 stanična linija adenokarcinoma debelog crijeva

CK1 kazein kinaza 1 (eng. *casein kinase 1*)

CSC tumorske matične stanice (eng. *cancer stem cells*)

*DHH* gen Desert Hedgehog

DHH protein Desert Hedgehog

DMEM Dulbeccov modificirani Eagle medij (eng. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

EDTA etilendiamintetraoctena kiselina

EMEM Eagleov minimalni medij (eng. *Eagle's Minimum Essential Medium*)

EMT epitelno-mezenhimalna tranzicija

FBS fetalni goveđi serum (eng. *fetal bovine serum*)

FDA Američka agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*)

GANT- Gli antagonist

GSK3 $\beta$  kinaza glikogen sintaze 3 $\beta$  (eng. *glycogen synthase kinase 3 $\beta$* )

HNSCC karcinom pločastih stanica glave i vrata (eng. *head and neck squamous cell carcinoma*)

HPV humani papiloma virus

IGF inzulinski faktor rasta (eng. *insulin-like growth factor*)

*IHH* gen Indian Hedgehog

IHH protein Indian Hedgehog

JAK/STAT Janus kinaza/prenositelji signala i aktivatori transkripcije (eng. *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*)

KIF7 protein KIF7 (eng. *kinesine-like protein 2*)

KRAS protein *KRAS* (eng. *Kristen rat sarcoma viral oncogene*)

LD<sub>50</sub> središnja letalna doza (eng. *lethal dose 50*)

LRP5/6 proteini povezani s receptorom za lipoproteine niske gustoće (LDL) 5 i 6  
(eng. *low density lipoprotein receptor-related proteins 5 and 6*)

MAPK proteinska kinaza aktivirana mitogenom (eng. *mitogen-activated protein kinase*)

MCF 10a stanična linija epitelnih stanica

NRAS protein NRAS (eng. *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*)

NRP2 protein neuropilin-2

*PTCH1* i 2 gen Patched 1 i 2

PTCH1 i 2 protein Patched 1 i 2

PBS fosfatni pufer (eng. *Phosphate-Buffered Saline*)

PCR lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*)

PDD domena koja određuje mjesto doradbe (eng. *processing determinant domain*)

PDGF trombocitni faktor rasta (eng. *platelet-derived growth factor*)

PI3K fosfoinozimid 3-kinaza (eng. *phosphoinositide 3-kinase*)

PKA proteinska kinaza A (eng. *protein kinase A*)

SMAD2/3 protein SMAD2/3

*SMO* gen Smoothened

SMO protein Smoothened

*SHH* gen Sonic Hedgehog

SHH protein Sonic Hedgehog

SUFU protein supresor fuzije (eng. *Suppresor of Fused protein*).

TCF-4 transkripcijski faktor 4 (eng. *transcription factor 4*)

VEGF vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*)

# 1. UVOD

## 1.1. Signalni put Hedgehog-Gli (HH-GLI)

Hedgehog-GLI (HH-GLI) evolucijski je konzerviran signalni put neophodan za razvoj organizma, a otkriven je osamdesetih godina prošlog stoljeća na vinskoj mušici *Drosophila melanogaster*. Proučavajući segmentalni razvoj vinske mušice, Nüsslein-Volhard i Wieschaus (1980) otkrili su gensku mutaciju koja je dovela do specifičnog izgleda ličinke. Uočene su dlačice promjenjenog rasporeda na leđima mutante ličinke što je podsjetilo na bodlje ježa (eng. *hedgehog*). Tako je gen odgovoran za uočeni izmjenjeni raspored ventralnih segmenata nazvan upravo Hedgehog (HH) (Sigafos i sur. 2021). Signalni put HH-GLI ključan je u embrionalnom razvoju, dok u je u odraslom organizmu slabo aktivan ili inaktivan, ali posjeduje ulogu u tkivnoj homeostazi, zacjeljivanju, održavanju somatskih matičnih stanica te regeneraciji tkiva (Aberger i sur. 2012).

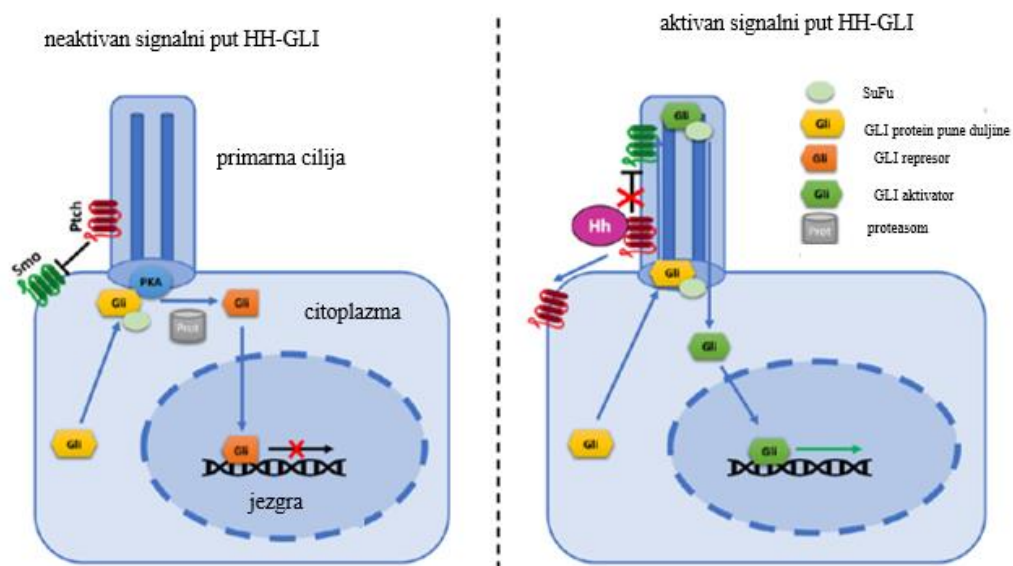
Osnovne komponente signalnog puta u sisavaca su ligandi Hedgehog (HH), transmembranski receptori Patched 1 i 2 (PTCH1 i 2), receptor vezan s G proteinom Smoothened (SMO) te transkripcijski faktori GLI (eng. *glioma-associated oncogene*) koji su regulirani proteinom SUFU (eng. *Suppressor of Fused protein*). Sisavci imaju tri tkivno specifična homologa gena Hedgehog; *Sonic Hedgehog (SHH)*, *Indian Hedgehog (IHH)* i *Desert Hedgehog (DHH)* te tri transkripcijska faktora GLI: GLI1, GLI2 i GLI3. Signalni put može biti aktiviran kanonski te nekanonski.

### 1.1.1. Kanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI

Ligand HH tijekom sinteze u stanicama podliježe posttranslacijskim modifikacijama u endoplazmatskom retikulumu. Translatira se u prekursorski oblik veličine 45 kDa koji se potom procesira u aktivni oblik. Dolazi do autokatalitičkog cijepanja; krajnji produkt veličine 19 kDa na C-terminalnom kraju nosi kolesterol, na N-terminalnom palmitinsku kiselinu te se takav izlučuje iz stanice (Qi i Li 2020).

Kanonska aktivacija signalnog puta može biti autokrini, što znači da stanica koja izlučuje ligand HH ujedno ga i veže i aktivira prijenos signala, ili parakrini, što znači da se ligand HH veže i aktivira prijenos signala na drugim stanicama. Parakrini ili autokrini kanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI započinje vezanjem liganda HH na primarni receptor PTCH1. Vezanjem liganda dolazi do internalizacije represora PTCH1 čime prestaje njegova inhibicija koreceptora SMO. Koreceptor SMO translocira se u primarnu ciliju te aktivira signalnu kaskadu (Slika 1) (Aberger i sur. 2012; Li i sur. 2020).

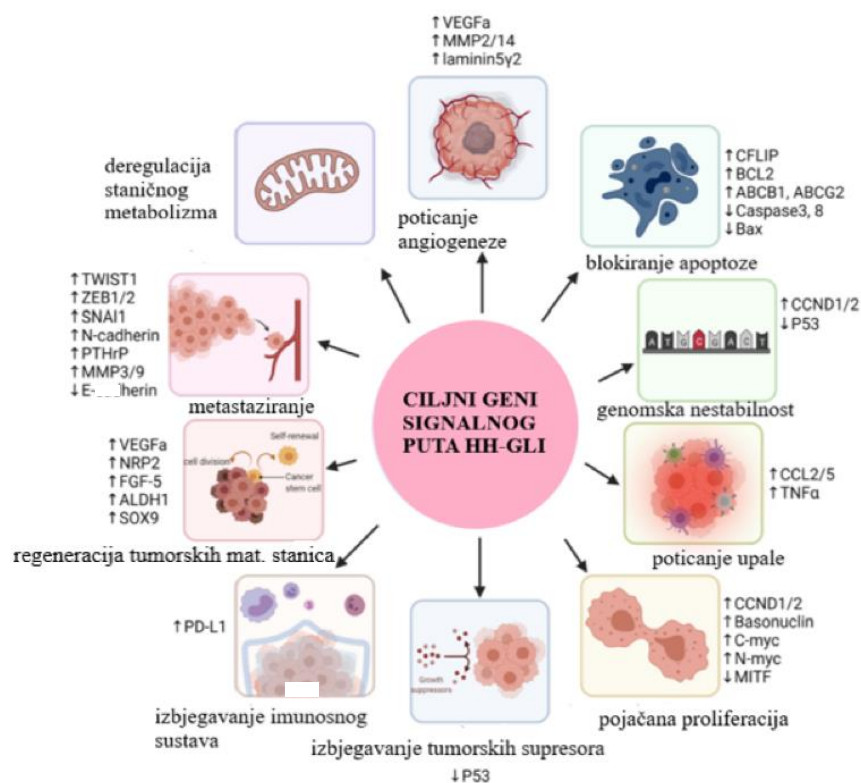
Detalji interakcije PTCH1 i SMO nisu do kraja razjašnjeni, međutim pretpostavlja se postojanje posredničkih molekula koje omogućuju opisani mehanizam. Nove spoznaje uključuju kolesterol kao endogeni regulator za kojega se utvrdilo kako je sam dovoljan i neophodan za aktivaciju SMO (Byrne i sur. 2018). Također, translokacijom SMO u ciliju, dolazi do inaktivacije protein kinaze A (PKA) koja prestaje fosforilirati proteine GLI što pospješuje njihovu transkripcijsku aktivnost (Levanat i sur. 2016). Uz navedene uloge, SMO potiče otpuštanje proteina GLI iz kompleksa s proteinom SUFU; proteini GLI translociraju se u jezgru te vrše transkripciju ciljnih gena (Slika 1) (Aberger i Ruiz i Altaba 2014).



**Slika 1.** Shematski prikaz signalnog puta HH-GLI. Slika lijevo prikazuje neaktivan signalni put: koreceptor PTCH1 sprječava translokaciju SMO u primarnu ciliju; proteini GLI u kompleksu su s represorom SUFU, a dodatno ih fosforilira PKA. Nakon fosforilacije, proteini GLI obilježeni su za proteosomsku razgradnju pri čemu nastaju represorske forme koje sprječavaju transkripciju ciljnih gena. Desni dio slike prikazuje vezanje liganda HH što omogućuje translokaciju SMO u membranu primarne cilije. SMO potiče oslobađanje proteina GLI represora SUFU; pune duljine, proteini GLI odlaze u jezgru gdje se ponašaju kao transkripcijski aktivatori (preuzeto i prilagođeno prema Niewiadomski i sur. 2020).

U odsustvu liganda HH, PTCH1 je represor, odnosno negativni regulator signalizacije, smješten na membrani primarne cilije. Inhibira SMO sprječavajući njegovu translokaciju u primarnu ciliju što dovodi do inhibicije signalnog puta (Slika 1). U negativnoj regulaciji signalnog puta HH-GLI sudjeluje i SUFU koji zadržava GLI2 i GLI3 u citoplazmi te zajedno s KIF7 promovira njihovu parcijalnu degradaciju kako bi se spriječila translokacija i nakupljanje u jezgri (Skoda i sur. 2018). Protein kinaza A (PKA), kazein kinaza I (CK1) te glikogen-sintaza kinaza (GSK3) odgovorne su za fosforilaciju proteina GLI2 i GLI3 pri čemu ih obilježavaju za proteasomsku degradaciju (Aberger i sur. 2012). U proteasomu se proteini GLI2 i GLI3 pune duljine cijepaju u skraćene oblike te nastaju transkripcijski represori GLI2R i GLI3R koji inhibiraju ekspresiju ciljnih gena.

Ciljni geni ovog signalnog puta uključeni su u proliferaciju, diferencijaciju, preživljenje stanica te druge procese koji pospješuju tumorigenezu (Slika 2).



**Slika 2.** Shematski prikaz procesa tumorigeneze u koji su uključeni ciljni geni signalnog puta HH-GLI. Znak strelice prema gore označava pojačavanje aktivnost, a strelica prema dolje snižavanje aktivnosti ciljnih gena (preuzeto i prilagođeno prema Chai i sur. 2021).

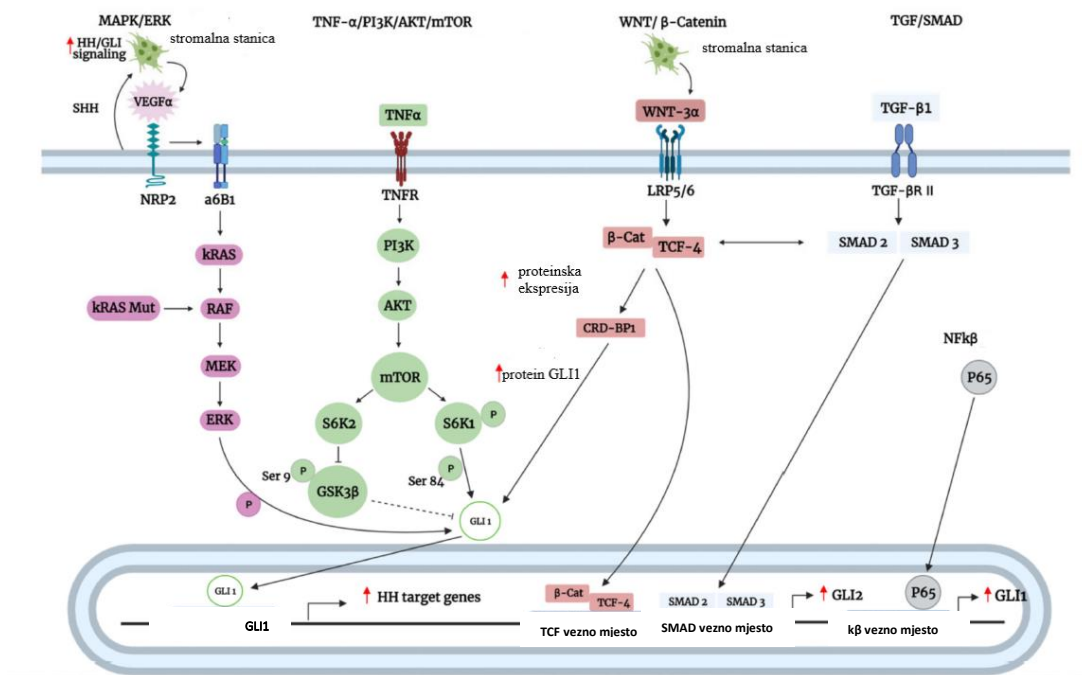
### 1.1.2. Nekanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI

Nekanonska aktivacija uključuje interakciju s drugim signalnim putevima zaduženim za staničnu proliferaciju ili stanično preživljenje, signalizaciju putem receptora PTCH1 neovisno o nizvodnim komponentama, djelovanje koreceptora SMO neovisno o faktorima GLI te epigenetske mehanizme (Aberger i sur. 2012). Posljedica međusobne interakcije signalnih puteva nekontrolirana je aktivacija proteina GLI (Pietrobono i sur. 2019).

RAS-RAF-MEK-ERK signalni je put uključen u staničnu proliferaciju i rast. Pojačana aktivnost povezana je brojnim malignim oboljenjima, primjerice karcinomom gušterače, želuca, mijelomima i ostalim (Keysar i sur. 2013; Stecca i Ruiz i Altaba 2009). Riobo i suradnici pokazali su komunikaciju signalnih puteva HH-GLI i MAPK gdje su primijetili pojačanu transkripcijsku aktivnost GLI1 uslijed konstitutivne aktivnosti MEK1. Također, bioinformatičkim metodama otkrivena je regija na proteinu GLI1 koja je pod transkripcijskom kontrolom signalnog puta MAPK. Delecijom spomenute regije aktivacija GLI1 bila je smanjena (Pietrobono i sur. 2019; Riobo i sur. 2006). U melanomu, onkogen N-RAS potiče jezgenu lokalizaciju i transkripcijsku aktivnost GLI1 (Stecca i sur. 2007). Stanično preživljenje regulirano je signalnim putem PI3K-AKT, a pokazano je kako protein AKT sprječava proteasomsku razgradnju GLI2, odnosno nastanak represorske forme te pojačava transkripcijsku aktivnost GLI1 u karcinomu jajnika i gušterače (Singh i sur. 2017; Stecca i sur. 2007).

Uz navedeno, PTCH1 u odsustvu liganda potiče apoptozu aktivacijom kaspaze 9, dok se vezanjem liganda SHH blokira aktivnost PTCH1 te dolazi do inhibicije apoptoze (Mille i sur. 2009). Upravo je inhibicija apoptoze jedan od mehanizama kojima tumorske stanice postižu otpornost na dostupne terapije (Azharuddin i sur. 2019). Također, PTCH1 djeluje i na zaustavljanje staničnog ciklusa inhibirajući aktivnost ciklina B1, međutim, vezanjem proteina SHH ciklin B1 se otpušta, translocira u jezgru te dovršava diobu stanica (Ansari i sur. 2018).

Stecca, Ruiz i Altaba (2009) na neuralnim matičnim stanicama pokazali su interakciju tumorskog supresora p53 i proteina GLI1. Fosfoprotein 53 negativno regulira transkripcijsku aktivnost GLI1 te njegovu jezgenu lokalizaciju, dok povećana aktivnost GLI1 dovodi do aktivacije ubikvitin ligaze HDM2 čime se reducira tumor-supresorsku aktivnost p53 (Stecca i Ruiz i Altaba 2009; Weissman i sur. 2008).



**Slika 3.** Shematski prikaz nekanonske aktivacije signalnog puta HH-GLI. Transkripcijski faktori GLI mogu biti regulirani na transkripcijskoj ili proteinskoj razini, ovisno o signalnom putu. U signalnom putu MAPK, tumorske stanice luče ligand SHH te se aktivira signalni put HH-GLI u stromalnim stanicama. Dolazi do pojačane ekspresije VEGF koji se potom veže za receptor NRP2 te potiče MEK-ERK kaskadu koja aktivira GLI1. Nadalje, mutacije onkogenog K-RAS potiču fosforilaciju, a time i aktivaciju GLI1. U signalnom putu WNT, stromale stanice luče ligand WNT3A koji se veže za membranski receptor LRP5/6. U citoplazmi se potom formira kompleks β-katenin/TCF-4 koji stabilizira mRNA GLI1 te tako povećava razinu proteina GLI1. Slično se događa i u signalnom putu TGF/SMAD gdje dolazi do aktivacije SMAD2/3 koji ulazi u interakciju s kompleksom β-katenin/TCF-4 što dovodi do pojačane ekspresije proteina GLI2. Podjedinica p65 NFκβ veže se za promotorsko mjesto GLI1 te tako vodi u njegovu pojačanu ekspresiju (preuzeto i prilagođeno prema Chai i sur. 2021).

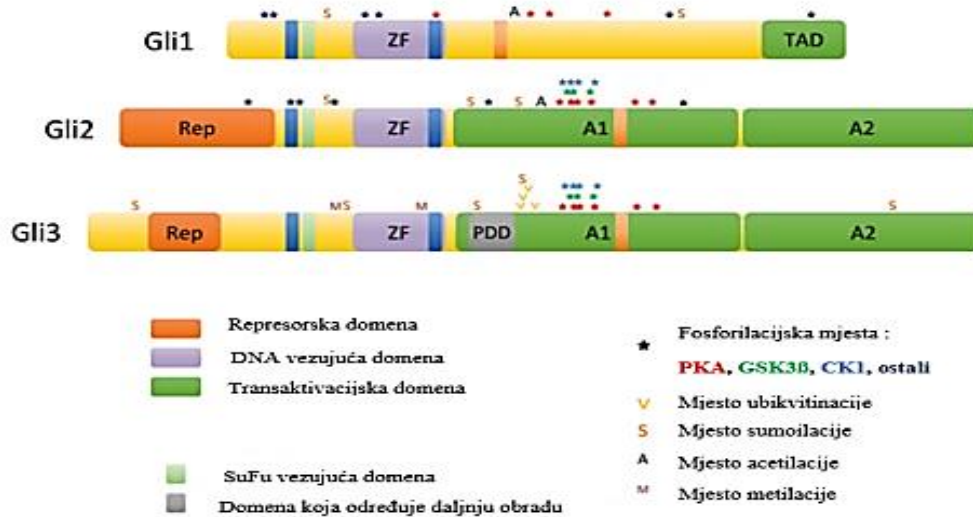
### 1.1.3. Transkripcijski faktori GLI

Proteini GLI pripadaju proteinskoj obitelji Kruppel s motivom cinkovih prstiju koji je ujedno domena koja veže DNA (Kinzler W.K. 1988). Iako je navedena domena konzervirana u sva tri GLI proteina, sastav amino-terminalnog (N- kraj) i karboksi-terminalnog (C- kraj) dijela sekvence određuje uloge u stanici. GLI2 i GLI3 sadrže N-terminalnu domenu koja je represorska te C-terminalnu koja je aktivatorska (Slika 4).



Za razliku od navedena dva proteina, GLI1 ne sadrži N-terminalnu represorsku domenu te je zbog toga isključivi aktivator puta (Sabol i sur. 2018). Sva tri proteina sadrže konzerviranu prolin-tirozinsku domenu koja je dio jezgrinog lokalizirajućeg signala, vezno mjesto za SUFU i fosforilaciju. Prema C-kraju, nalazi se domena PDD (eng. *processing determinant domain*) čiji sastav određuje hoće li u proteasomu doći do proteolitičke razgradnje proteina GLI u okrnjene represore (GLI2, GLI3) ili potpune razgradnje (GLI1) (Pan i Wang 2007). U svojoj punoj duljini, proteini GLI su transkripcijski aktivatori (Niewiadomski i sur. 2019).

Fosforilacija, posebno protein kinazom A, ključan je inhibitor signalnog puta HH-GLI. Potiče djelovanje CK1 i GSK3 $\beta$  te tako posreduje ubikvitinaciju ligazom  $\beta$ -TrCP i osigurava nastanak represorskih formi GLI2R i GLI3R (Aberger i Ruiz i Altaba 2014). S druge strane, defosforilacija vodi u pojačanu transkripcijsku aktivnost GLI2 (Niewiadomski i sur. 2019). Odnosi proteina GLI1, GLI2 i GLI3 naziva se GLI kodom, a omjer represorskih i aktivatorskih formi kritičan je za normalno funkcioniranje stanice (Aberger i Ruiz i Altaba 2014).



**Slika 4.** Shematski prikaz proteina GLI. Sva tri proteina GLI sadrže konzerviranu domenu koja veže DNA te prolin-tirozinsku domenu koja je dio jezgrinog lokalizirajućeg signala, vezno mjesto za SUFU i fosforilaciju. Razlikuju se prema sastavu N- i C- terminalnog kraja; GLI2 i GLI3 na N- terminalnom kraju posjeduju represorsku domenu, a na C-terminalnom aktivatorsku domenu. GLI1 sadrži samo C-terminalnu aktivatorsku domenu. Sva tri proteina prolaze postrlacijske modifikacije ubikvitinaciju, sumoilaciju, acetilaciju, metilaciju (preuzeto iz Potkonjak, 2019).

#### 1.1.4. Signalni put HH-GLI u karcinogenezi

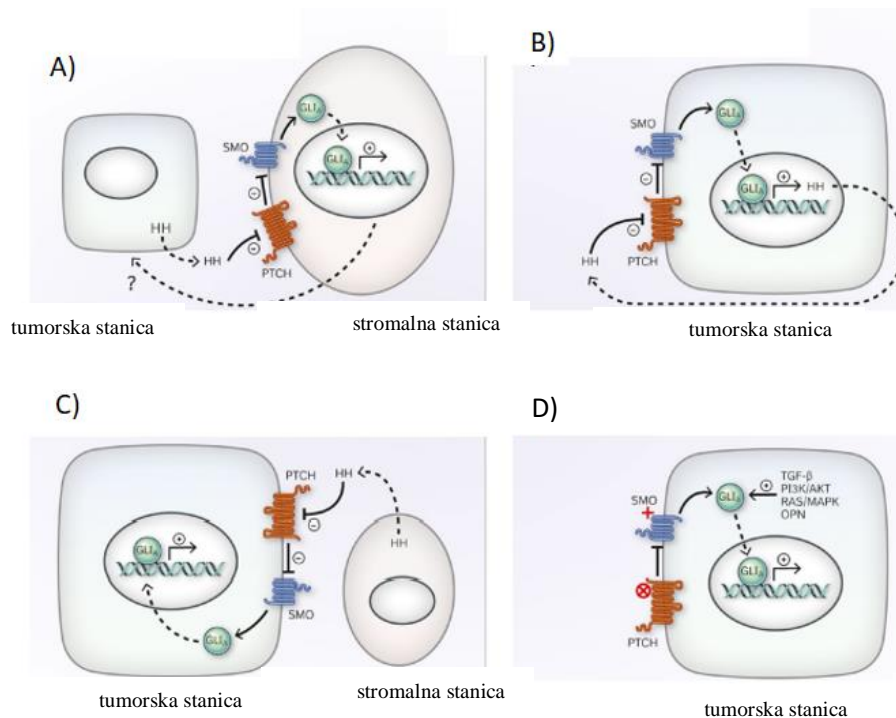
Aberantna aktivacija signalnog puta HH-GLI povezana je s pojavom razvojnih anomalija kao što je Gorlinov sindrom, ali i malignih oboljenja kao što su melanom, rabdomiosarkom, karcinomi glave i vrata i dr. (Guimaraes i sur. 2020; Skoda i sur. 2018). Četiri su pretpostavljena mehanizma deregulacije signalnog puta HH-GLI; (1) aktivacija neovisna o ligandu, (2) autokrina aktivacija ovisna o ligandu, (3) parakrina aktivacija ovisna o ligandu te novije opisani (4) reverzno-parakrini model (Rubin i de Sauvage 2006).

Aktivacija signalnog puta neovisna o ligandu posljedica je inaktivirajućih mutacija negativnih regulatora puta PTCH1 i SUFU te mutacija koje uzrokuju konstitutivnu aktivaciju proteina SMO što dovodi do nekontrolirane aktivnosti puta. Gorlinov sindrom prva je bolest u kojoj je determinirana poveznica između mutacije receptora PTCH1 i pojave bolesti. Istraživanja rađena na heterozigotnim mišjim modelima koji su imali samo jedan alel gena *PTCH1* aktivan, pokazala su pojačanu sklonost razvoju karcinoma bazalnih stanica kože (eng. *basal cell carcinoma*, BCC) (Johnson i sur 1996). S druge strane, Lee i suradnici radili su istraživanje na mišjim heterozigotima za represor SUFU. Miševi s delecijom gena *SUFU* nisu imali povećanu sklonost razvoju BCC, stoga se zaključuje kako on sam nije dostatan za aktivaciju tumorigeneze (Lee i sur. 2007).

Autokrina aktivacija signalnog puta podrazumijeva lučenje liganda HH iz tumorske stanice, koja zatim taj isti signal prima i aktivira signalni put. Dokazana je povećana ekspresija *PTCH1* te *GLII* u karcinomu želuca, jednjaka, jajnika, dojke i mnogim drugim (Rubin i de Sauvage 2006; Skoda i sur. 2018).

Parakrina signalizacija ovisna o ligandu je ona u kojoj tumorske stanice luče ligande HH, stanice strome zaprimaju signal te luče faktore koji održavaju rast tumorskih stanica. Ligandi HH izlučeni iz tumorskih stanica vežu se na PTCH1 stromalnih stanica te se put HH-GLI aktivira. Potom stanice strome luče faktore rasta VEGF, IGF, BMP, PDGF i WNT te tako potiču proliferaciju tumorskih stanica (Skoda i sur. 2018).

Uz opisano, postoji i reverzno-parakrini model signalizacije zabilježen u limfomu B stanica, multiplom mijelomu i leukemiji. Stromalne stanice luče ligande HH koji osiguravaju primjeren mikrookoliš za proliferirajuće tumorske stanice (Slika 5) (Scales i de Sauvage 2009).



**Slika 5.** Shematski prikaz mogućih mehanizama aktivacije signalnog puta HH-GLI. Slika A odnosi se na parakrini model ovisan o ligandu gdje tumorske stanice luče ligande HH, stanice strome zaprimaju signal te luče faktore koji održavaju rast tumorskih stanica. Slika B predstavlja autokrini aktivaciju ovisnu o ligandu koja podrazumijeva samostalno lučenje liganda HH iz tumorske stanice koja zatim taj signal i prima, slika C se odnosi na reverzno-parakrini model gdje stromalne stanice luče ligande HH koji osiguravaju primjeren mikrookoliš za proliferirajuće tumorske stanice, a slika D autokrini model neovisan o ligandu koji opisuje inaktivirajuće mutacije negativnog regulatora puta PTCH1 te mutacije koje uzrokuju konstitutivnu aktivaciju proteina SMO (preuzeto i prilagođeno iz Habib i O'Shaughnessy, 2016)

### 1.1.5. Spojevi koji modificiraju aktivnost signalnog puta HH-GLI

S obzirom na to da je signalni put HH-GLI uključen u nastanak brojnih malignih oboljenja, nametnuo se kao meta za istraživanje potencijalnih inhibitora samog puta ili njegovih komponenti. Strategije inaktivacije puta uglavnom su usmjerene na inhibiranje liganada pomoću antitijela ili kemijsko blokiranje funkcije proteina SMO i GLI. Najistraživanija skupina terapeutika jesu inhibitori proteina SMO; ciklopamin, vismodegib i sonidegib. Ciklopamin je steroidni alkaloid prirodnog porijekla, izoliran iz biljke *Veratrum californicum*. Blokira djelovanje SMO vežući se za njega i stabilizirajući ga u inaktivnoj formi (Chen i sur. 2002). Prvotni spoj nije zaživio u kliničkoj primjeni zbog loše bioraspodjelivosti, ali derivati poboljšane farmakokinetike jesu.

Ipak, sintetski SMO inhibitori poput vismodegiba i sonidegiba odobreni su od strane FDA (eng. *Food and Drug Administration*) za tretmane bazalnih karcinoma kože (Amakye i sur. 2013; Pak i Segal 2016). Na aktivnost SMO moguće je utjecati i uzvodno, blokirajući vezanje liganda HH na PTCH1 pomoću specifičnih antitijela. Zbog nekanonske aktivacije puta, brojne vrste tumora nisu osjetljive na inhibitore proteina SMO, stoga je bilo potrebno razviti nizvodne blokatore puta. Toftgård sa suradnicima uvodi nove spojeve, inhibitore proteina GLI, GANT-61 i GANT-58 (od eng. *GLI antagonist*). Istraživanjima *in vivo* i *in vitro* pokazali su mehanizam djelovanja inhibitora proteina GLI; sprječavaju transkripcijsko djelovanje proteina GLI, smanjuju proliferaciju i potiču apoptozu tumorskih stanica. GANT-61 ima potentnije djelovanje te potiče postranslacijske modifikacije, posebno fosforilaciju, koje blokiraju vezanje proteina GLI1 na DNA (Lauth i sur. 2007). de Araújo (2020) je na staničnim linijama karcinoma glave i vrata pokazao inhibitornu aktivnost GANT-61. Ekspresija *PTCH1*, *GLI1*, *GLI2* te *GLI3* bila je značajno smanjena u odnosu na kontrolu, ali i u odnosu na konvencionalne tretmane kao što je cisplatina (de Araújo i sur. 2020). Također, specifični su za signalni put HH-GLI jer nije utvrđeno djelovanje na kaskadu RAS-RAF i druge interakcijske puteve (Lauth i sur. 2007). Nadalje, FDA je odobrila itrakonazol te arsenov (III) oksid (ATO) kao inhibitore puta ovisnog o SHH. Itrakonazol je antifungalni lijek koji blokira SMO preko drugačijeg veznog mjesta od ciklopamina, dok se ATO standardno koristi u tretmanu akutne promijeloične leukemije. ATO sprječava nakupljanje GLI2 u primarnim cilijama te potiče njegovu degradaciju. Djeluje i na GLI1 vežući se za nj te mu tako blokira transkripcijsku aktivnost. Međutim, potencijalno je toksičan te ima nespecifične mete, stoga su potrebna iscrpnija istraživanja (Chen i sur. 2002; Pak i Segal 2016).

Litij je lijek koji se primjenjuje za liječenje bipolarnog poremećaja, ali posljednjih godina našao je primjenu i kao antitumorska terapija. Wang i sur. (2017) su na modelu karcinoma gušterače pokazali inhibicijski učinak tretmana litijevim kloridom na aktivnost kinaze GSK3 $\beta$ . Fosforilacija kinazom GSK3 $\beta$ , kao i PKA, regrutira ubikvitinske ligaze pri čemu dolazi do degradacije GLI. Također, kompleks SUFU-GLI se dodatno stabilizira i na taj način smanjuje transkripcijska aktivnost proteina GLI (Wang i sur. 2017). U karcinomu glave i vrata utvrđena je slična aktivnost kinaze GSK3 $\beta$ ; tretman litijevim kloridom stimulirao je fosforilaciju GLI3 proteina čime je nastala represorska forma GLI3R pune duljine te se aktivnost signalnog puta HH-GLI smanjila (Zubčić i sur. 2020).

## 1.2. Tumori glave i vrata

Maligni tumori glave i vrata heterogena su skupina u koje ubrajamo tumore gornjega aerodigestivnog trakta – usnice i usne šupljine, orofarinksa, nazofarinksa, hipofarinksa, grkljana, žlijezda slinovnica, nosne šupljine i sinusa (Prgomet 2021). Karcinom pločastih stanica glave i vrata (eng. *head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) šesta je najčešća vrsta malignog oboljenja u svijetu, a uključuje zloćudne tvorbe ždrijela, grkljana te usne šupljine (Fan i sur. 2020). Povezan je s učestalom konzumacijom alkohola, duhanskih proizvoda te virusnim infekcijama npr. humanim papiloma virusom (Prgomet 2021). Postotak preživljenja oboljelih osoba je oko 50% u periodu od 5 godina, a postotak pada na 20% ukoliko dođe do metastaziranja u lokalne limfne čvorove (Goričan i sur. 2020; Wang i sur. 2020). Prema podacima hrvatskog Registra za rak iz 2019. godine, 5% od 13 547 muškaraca te 2% od 11 527 žena oboljelih od malignih bolesti, imalo je neki oblik karcinoma glave ili vrata. Najčešće oboljenje jest karcinom grkljana čija je stopa incidencije 6,7 na 100 000 stanovnika, a slijede ga karcinom jezika, usne, orofarinksa te hipofarinksa (Šekerija i sur. 2021). Strategije liječenja ovise o lokalizaciji primarnog tumora te metastaza, a metode izbora su kirurško odstranjivanje tumorske mase te radioterapija i kemoterapija (Kadletz i sur. 2015).

Molekularna podloga bolesti leži u aberantnoj aktivaciji signalnih puteva koji su uključeni u procese samoobnavljanja, proliferacije i diferencijacije stanica kao što su HH-GLI, EGFR, WNT te NOTCH. U karcinomima glave i vrata, istraživanja su uglavnom usmjerena na aktivnost GLI1, dok su GLI2 i GLI3 proteini manje zastupljeni. Međutim, posljednja istraživanja pokazuju glavnu regulatornu ulogu GLI3, koji je zadužen za staničnu proliferaciju i invaziju tumorskih matičnih stanica oralnih karcinoma (Rodrigues i sur. 2018).

Važna je i uloga tumorskih matičnih stanica (eng. *cancer stem cells*, CSC) koje su odgovorne za inicijaciju, progresiju, metastaziranje te recidive tumora, ali i za rezistenciju na dostupne terapije (Zubčić i sur. 2020). Pronalazak novih strategija liječenja cilj je novih istraživanja, a naglasak je na inhibiciji molekularnih mehanizama koji dovode do nastanka malignih tumora.

### 1.2.1. Otpornost na postojeće terapije u tumorima glave i vrata

Otpornost tumorskih stanica na postojeće terapije izazov je u liječenju većine malignih oboljenja pa tako i karcinoma glave i vrata. Dva su općenita mehanizma kojima se postiže otpornost: stečeni i intrinzični. Stečena otpornost javlja se nakon određenog razdoblja primjene terapije, dok je intrinzična posljedica unutarstaničnih mehanizama koji su postojali i prije primjene terapije. Općenito, mreža signalnih puteva te njihova kompleksnost omogućavaju razvijanje otpornosti na terapiju. Od signalnih puteva, najznačajniji u razvitku rezistencije su signalni putevi PI3K-AKT, RAS-RAF-MEK-ERK te JAK/STAT. Lu i suradnici povezuju aberantnu aktivaciju signalnog puta HH-GLI i rezistencije na terapije. U stanicama karcinoma glave i vrata koje su bile izložene kemoterapiji, vidljiva je pojačana ekspresija SHH, PTCH1 te SMO (Lu i sur. 2020). Ipak, protein SHH bio je najviše eksprimiran, stoga se on predlaže kao glavni okidač otpornosti na terapiju.

Proces epitelno-mezenhimalne tranzicije te prisutnost CSC također osiguravaju neadekvatan odgovor na terapiju (Picon i Guddati 2020). CSC su mala populacija stanica koje se sporo dijele, imaju sposobnost samoobnavljanja te mogu tvoriti sve vrste stanica u tumoru. Otporne su na radio- i kemoterapiju te se smatraju odgovornima za recidive i rezistencije na terapije (Nicolis 2007; Scales i de Sauvage 2009). Pretpostavlja se kako je visoka smrtnost pacijenata oboljelih od nekog oblika tumora glave i vrata posljedica prisutnosti tumorskih matičnih stanica. Razvijeni su brojni prognostički markeri na temelju kojih se može predvidjeti tijek bolesti. Jedan od njih je izolacija CSC pomoću površinskih markera. Prince i sur. (2007) po prvi su puta detektirali površinski marker CD44 pomoću kojega je moguće izolirati tumorske matične stanice iz oralnih karcinoma. Daljnjim istraživanjima pokazano je kako stanice s visokom ekspresijom CD44 pokazuju veću sklonost metastaziranju. Dolazi do aktivacije tirozinskih kinaza i signalnih puteva proliferacije, primjerice PI3K-AKT (Prince i sur. 2007; Chen i Wang 2019). Nadalje, CD24 jedan je od onkogeno zaduženih za staničnu adheziju i metastaziranje. Stanične populacije unutar tumorske mase koje nose navedeni marker pokazuju veću sklonost rezistenciji na terapiju cisplatinom. Modur sa suradnicima na staničnoj liniji karcinoma ždrijela pokazuje pozitivnu korelaciju visoke ekspresije CD24 tumorskih matičnih stanica te rezistencije na terapiju cisplatinom (Modur i sur. 2016). Zajedno s CD44, koristi se za izolaciju CSC iz različitih tumora, iako je CD24 tkivno specifičniji o odnosu na CD44 (Chen i Wang 2019; Rodrigues i sur. 2018).

Epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT) proces je u kojemu tumorske stanice gube svojstvo adhezije, mogu migrirati te naseljavati druga tkiva i organe. Stečena otpornost neophodna je za ovaj proces, a Keysar i sur. (2013) utvrdili su u tumorskih stanicama glave i vrata koje su bile tretirane inhibitorima epitelnog faktora rasta pojačanu transkripcijsku aktivnost GLI1. Također, stanice tretirane monoklonskim antitijelom cetuximabom pokazale su povećanu ekspresiju proteina TWIST i SNAIL koji su nužni za EMT (Keysar i sur. 2013).

### **1.3. Stanične kulture**

Prve stanične kulture uspostavljene su 1907. godine prošlog stoljeća te se od tada koriste kao pouzdani i jednostavni modeli u znanstvenim istraživanjima stanične biologije te molekularnih mehanizama (Białkowska i sur. 2020). Stanice se uzimaju direktno iz tkiva te se u laboratorijskim uvjetima oponašaju uvjeti *in vivo* kako bi se uspostavila vijabilna primarna kultura. Daljnjom subkultivacijom i imortalizacijom stanica nastaju stanične linije (Butler 2005). Stanice se uzgajaju u specifičnom mediju, ovisno o tipu stanica, plastičnim Petrijevim posudama ili bočicama, u inkubatoru pri 37°C i 5% CO<sub>2</sub> (Freudenrich i Shafer 2020). S obzirom na vrstu rasta, stanične kulture dijele se na dvodimenzionalne (2D) i trodimenzionalne (3D).

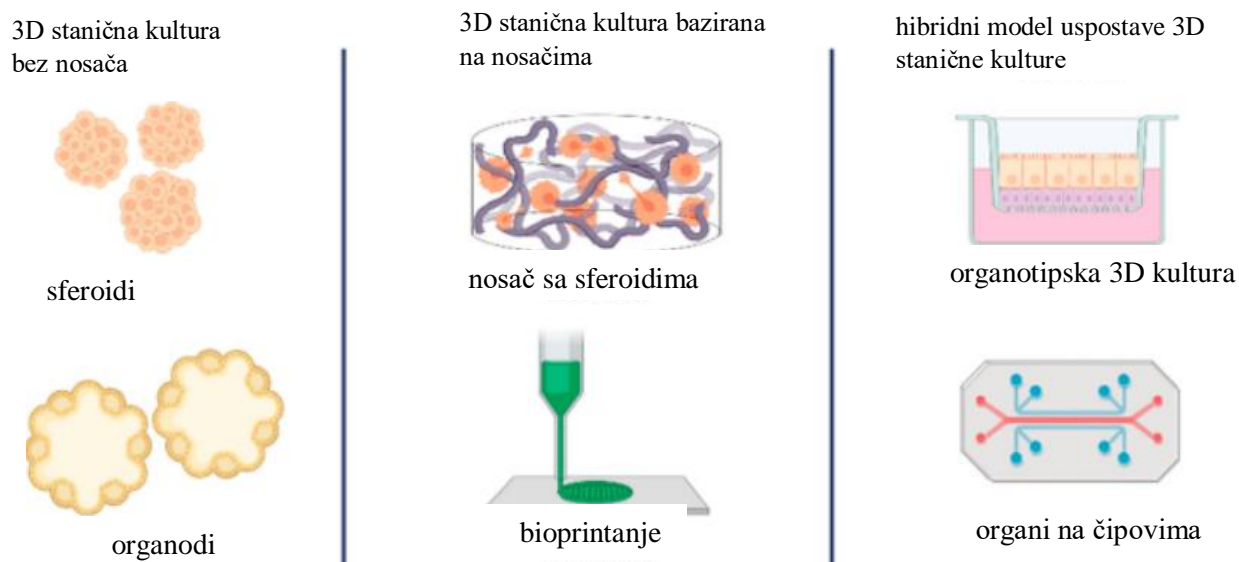
#### **1.3.1. Dvodimenzionalne stanične kulture (2D)**

U većini znanstvenih istraživanja, 2D stanične kulture uobičajen su model za proučavanje staničnog ponašanja. Dvodimenzionalna kultura stanica podrazumijeva prihvaćanje stanica na površinu plastike ili stakla u jednom sloju (eng. *monolayer*). Sve stanice na podlozi imaju jednaku opskrbu nutrijentima, što rezultira homogenim rastom i proliferacijom (Duval i sur. 2017). Iako jednostavna za uspostavu te interpretaciju rezultata, 2D kultura nije idealan model za proučavanje bolesti ili učinka lijekova. Upravo rast u jednom sloju na ravnoj površini može dovesti do promjena u staničnom metabolizmu te funkcioniranju stanica jer stanična kultura ne oponaša u potpunosti njihovo prirodno okruženje. Nedostadni kontakti stanica-stanica te stanica-izvanstanični matriks mogu dovesti do drugačije proteinske i genske ekspresije, u odnosu na 3D kulturu (Białkowska i sur. 2020). Posljedično dolazi do neusporedivih rezultata s uvjetima *in vivo*.

### 1.3.2. Trodimenzionalne stanične kulture (3D)

Trodimenziionalne stanične kulture koriste se za istraživanje tumora, međustaničnih interakcija, stanične diferencijacije te učinka potencijalnih terapija (Białkowska i sur. 2020). 3D kultura teži tvorbi prirodnog mikrookoliša za stanice, a posebno je važan kontakt stanica s izvanstaničnim matriksom. Upravo kontakti stanica-stanica te stanica-matriks osiguravaju lučenje faktora rasta te staničnu signalizaciju i komunikaciju. Osim navedenog, stanice u trodimenzionalnoj kulturi su stabilnije, polarnije te dugotrajnije (Andersen i sur. 2015).

S vremenom, razvile su se brojne mogućnosti uspostave 3D kulture, a razlikuju se prema složenosti te korištenim tehnologijama (Slika 6) (de Dios-Figueroa i sur. 2021). Danas se za uspostavu 3D kulture koriste posebni nosači koji omogućuju rast suspenzijske kulture bez mogućnosti prihvaćanja stanica u mikrotitarskim pločicama sa zaobljenim dnom, metoda viseće kapi, posebni uređaji bazirani na mikrofluid-čipovima te gelovima za uzgoj stanica. Freshney (2016) razlikuje dva pristupa 3D staničnoj kulturi; prvi uključuje izolaciju svih stanica tkiva te uspostavu kulture organa. Drugi pristup uključuje pojedine tipove stanica koje se zasebno izoliraju i umnože te na kraju udruže kako bi se proučile njihove međusobne interakcije.



**Slika 6.** Shematski prikaz mogućnosti uspostave 3D stanične kulture. Trodimenzionalnu staničnu kulturu moguće je uspostaviti bez nosača, npr. samoorganizirajuće sferoide ili organoide te uz pomoć materijala (nosača) koji oponašaju izvanstanični matriks. Hibridni model koristi komponente nosača kako bi se uspostavila 3D kultura bez nosača (preuzeto i prilagođeno prema de Dios-Figueroa i sur. 2021).



### 1.3.3. Sferodi

Sferoidi su samoorganizirajući stanični agregati uzgajani na neprijanjajućim podlogama. Stanično udruživanje moguće je zbog kontakta stanica-stanica, što predstavlja mikrookoliš nalik na uvjete *in vivo* (Białkowska i sur. 2020). Osnovna ideja agregacije stanica u sferične strukture je smanjiti površinu te slobodnu energiju sustava čime se postiže stabilnost agregata (Decarli i sur. 2021). Stanični adhezijski proteini, integrini i kadherini, imaju važnu ulogu u formiranju sferoidne kulture. An i suradnici (2021) predložili su integrin alfa 6 kao jedan od glavnih receptora za ulazak HPV u epitelne stanice glave i vrata, što dovodi do nastanka karcinoma. Također, tvorba staničnih agregata neovisna o podlozi svojstvo je tumorskih stanica *in vivo* (Smyrek i sur. 2018).

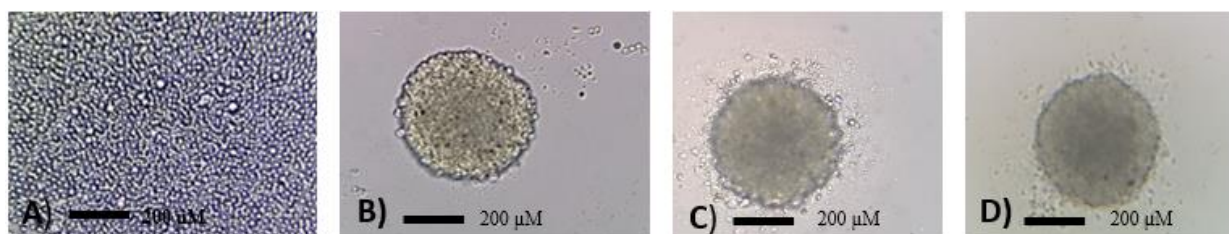
Sferoidne kulture mogu uključivati više tipova stanica stoga su posebno važne u istraživanjima kompleksnih procesa kao što su angiogenza i hematopoeza (Decarli i sur. 2021) Tijekom formiranja sferoida, tri su glavna procesa:

1. aktivacija integrina i kadherina na površini stanica
2. akumulacija kadherina na staničnoj membrani
3. interakcija susjednih kadherina što dovodi do formiranja sferoida

Sferoidi su heterogenog sastava, pri čemu je vanjski sloj stanica viskoproliferativan. Stopa proliferacije ovisi o dostupnosti kisika i nutrijenata; ukoliko isti postanu nedostupni, stanice odlaze u senescenciju. Također, nedostatak glukoze i kisika dovodi do nekroze, posebno stanica u središtu sfere. Zona nekroze uvjetovana je i niskim pH; dolazi do nakupljanja laktata i zakiseljavanja mikrookoliša stanica (Khanna i sur. 2020). Brojne su metode uspostave sferoida, a ugrubo se dijele na one koje uključuju nosač i one bez nosača. Metode bez nosača (eng. *scaffold-free*) su metoda viseće kapljice (eng. *hanging drop*), magnetske levitacije te uzgoj sferoida na neadherentnim površinama. Rotirajući sustavi te sustavi koji uključuju matriks pripadaju metodi baziranoj na nosačima (Slika 5) (Nath i Devi 2016). Također, prema morfologiji dijele se na čvrste, kompaktne te rastresite sferoide. Smyrek i suradnici (2018) predlažu 3 osnovna koraka u nastanku sferoida: agregacija, kompakcija i rast. Sferoidi porijeklom iz oralnih karcinoma pokazuju veći udio tumor-inicirajućih stanica što govori u prilog epitelno-mezenhimalnoj tranziciji koja se događa u 3D kulturama (Kapałczyńska i sur. 2018).

Metoda viseće kapljice prvotno je razvijena na embrionalnim stanicama kako bi se proučavala morfogeneza te formiranje tkiva (Khanna i sur. 2020). Za izradu se koriste mali alikvoti stanične suspenzije (otprilike 20  $\mu\text{L}$ ) koji se pipetiraju u bunariće bez dna, a stanice ostaju zarobljene u kapljici pod utjecajem površinske napetosti. Stanice potom spontano agregiraju te formiraju sferoid (Slika 7). Također, moguće je alikvote suspenzije nanositi na poklopac Petrijeve posude, okrenuti isti i zatvoriti posudu. Petrijeva posuda mora sadržavati pufer kako stanice ne bi dehidrirale (Nath i Devi 2016).

Iako jednostavna i pristupačna metoda, ima i svoja ograničenja. Pojedine stanične linije ne mogu formirati sferoide (pr. MCF 10a, Caco-2), a mijenjanje medija formiranim sferoidima zahtjevan je postupak (Decarli i sur. 2021)



**Slika 7.** Fotografije formiranja sferoida stanične linije Fadu kroz 72 h. A) stanice 15 min nakon nasadivanja, B) nakon 24 h, C) nakon 48 h, a D) sferoid nakon 72 h (fotografirala: Nikolina Vučemilo).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Dvodimenzionalne stanične kulture uobičajene su u istraživanjima tumorskih stanica, međutim, zbog brojnih ograničenja, nastoje se uspostaviti nove metode koje će vjernije oponašati uvjete *in vivo*. Tvorba prirodnog mikrokoliša za stanice, kontakt stanica s izvanstaničnim matriksom te mogućnost usporedbe rezultata s uvjetima *in vivo*, glavne su odlike trodimenzionalne (3D) stanične kulture. Brojne su mogućnosti uspostave 3D kulture, a razlikuju se prema složenosti te korištenim tehnologijama. U malignim oboljenjima posebno je važna i molekularna patogeneza nastanka bolesti. Dolazi do deregulacije signalnih puteva zaduženih za procese samoobnavljanja, proliferacije te staničnog preživljenja. Otpornost na dostupne terapije prisutna je u većini oboljenja, stoga su potrebne nove strategije istraživanja same bolesti. Trodimenzionalna stanična kultura omogućava uspostavu uvjeta *in vivo* te na taj način i proučavanje mehanizama rezistencije, ali i signalnih puteva uključenih u istu.

### **Glavni su ciljevi diplomskog rada:**

- 1) uspostava i optimizacija trodimenzionalne (3D) stanične kulture dvaju staničnih linija tumora glave i vrata metodom viseće kapljice (eng. *hanging drop*),
- 2) tretman 2D i 3D staničnih kultura inhibitorima signalnog puta Hedgehog-Gli (HH-GLI)
- 3) praćenje aktivnosti signalnog puta HH-GLI kroz mjerenje genske ekspresije u 2D i 3D staničnim kulturama nakon tretmana inhibitorima signalnog puta HH-GLI
- 4) analiza morfologije 3D kultura tijekom i nakon tretmana inhibitorima signalnog puta HH-GLI

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. MATERIJALI**

U izradi diplomskog rada korištene su stanične linije FaDu i Detroit562. FaDu (ATCC® HTB-43™) je stanična linija karcinoma donjeg dijela ždrijela, a Detroit562 (ATCC® CCL-138™) je stanična linija karcinoma ždrijela. Obje su linije adherentne, a za rast u kulturi potreban im je EMEM (eng. *Eagle's Minimum Essential Medium*) komplementiran s 10% goveđeg fetalnog seruma (eng. *fetal bovine serum*, FBS), 5% miješane otopine antibiotika penicilin-streptomycin te 5% L-glutamina. Linije su uzgajane u inkubatoru s kontroliranom atmosferom od 95% zraka i 5% CO<sub>2</sub> te pri temperaturi od 37°C.

### **3.2. METODE**

#### **3.2.1. Odmrzavanje stanica i uspostava dvodimenzionalne (2D) adherentne stanične kulture**

Obje stanične linije bile su pohranjene u mediju za zamrzavanje (50% FBS, 40% DMEM medij, 10% DMSO) u krio-ampulama na -80°C. Za uspostavu dvodimenzionalne stanične kulture, bilo ih je potrebno odmrznuti. Odmrzavanje, kao i sve što sam radila sa staničnim kulturama, provodilo se u sterilnom kabinetu za animalnu staničnu kulturu, s laminarnim protokom zraka. Medij, puferi, epruvete, pipete te sav ostali pribor bili su sterilni. Prije i nakon rada u sterilnom kabinetu, radnu sam površinu prebrisala 70% etanolom, a dodatno se steriliziralo UV svjetlom.

Sterilne staklene epruvete označila sam oznakama FaDu i Detroit562 te u njih ispipetirala staklenom pipetom 5 mL kompletnog medija EMEM (Capricorn Scientific, Njemačka). Krio-ampule nakon vađenja iz tekućeg dušika pohranila sam na ledu, a potom ih zagrijala u rukama; kada su stanice bile napola odmrznute, prebacila sam ih u sterilne staklene epruvete s 5 mL kompletnog medija. Kako bi citotoksični učinak krioprotektanta DMSO bio što manji, važno je ovaj postupak brzo obaviti. Potom sam stanice resuspendirala sterilnom staklenom pipetom te centrifugirala na 1000 x g 5 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant sam odlila, a na talog stanica koje su bile isprane od DMSO, dodala 10 mL kompletnog medija te stanice resuspendirala pipetom. Sadržaj epruvete staklenom pipetom sam prenijela u petrijevku promjera 10 cm (Sarstedt, Njemačka).

Petrijevke sam lagano protresla kako bi se stanice ravnomjerno rasporedile te pohranila u inkubator (Kambič) s kontroliranim uvjetima (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Staničnim linijama mijenjala sam medij svaka 3 dana, a do konfluencije od 80% nakon čega su rasađivane u nove petrijevke. Rasađivanje se provodi u sterilnom kabinetu na način da se sterilnom staklenom pipetom ukloni stari medij, tako da se petrijevka lagano nagne na stranu. Potom se adherirane stanice isperu s 5 mL PBS (eng. *Phosphate-Buffered Saline*; 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, pH 7,2) lagano protresajući petrijevku. Pufer sam uklonila pipetom, a na stanice dodala 1 mL 0,25% otopine tripsina koji sadrži 1 mM EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina). Na staničnu liniju FaDu tripsin je djelovao već nakon 2 min, dok je za odvajanje od podloge (tripsinizaciju) linije Detroit562 bilo potrebno oko 8 min. Petrijevke sam snažno protresala kako bih potaknula odvajanje od podloge. Proces odvajanja pratila sam mikroskopom (Boeco), a zatim sam tripsin inaktivirala s 3 mL kompletnog medija te stanice resuspendirala pipetom. Po 1 mL stanične suspenzije prenijela sam u nove petrijevke te nadodala 10 mL kompletnog medija.

### 3.2.2. Optimizacija uvjeta za uspostavu trodimenzionalne (3D) sferoidne kulture

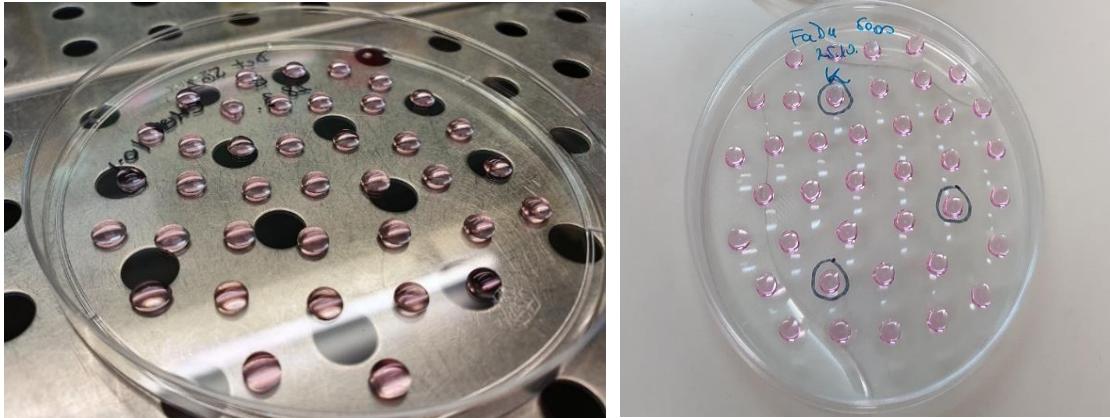
Za provođenje daljnjeg istraživanja bilo je potrebno uspostaviti protokol prema kojemu ću izrađivati sferoide metodom viseće kapljice. Prema dostupnim recentnim radovima, odabrala sam početni broj stanica: 1000, 2000 te 5000 stanica po sferi (1 sfera=25 µL) (Gaskell i sur. 2016; Goričan i sur. 2020). Adherentne stanične linije koje su postigle dovoljnu konfluenciju (oko 70%) koristila sam za izradu sferoida. Falcon epruvete volumena 15 mL označila sam oznakama „Fadu suspenzija“ i „Det suspenzija“. Potom sam u sterilnom kabinetu, prema ranije opisanom protoklu, odvojila stanice od podloge, inaktivirala tripsin s 5 mL kompletnog medija te staničnu suspenziju prenijela u Falcon epruvetu. Pripremila sam Neubauerovu komoricu za brojanje stanica te 20 µL suspenzije pomiješala s 80 µL metilenskog modrila. Dvadeset mikrolitara sadržaja ispipetirala sam u pripremljenu komoricu te prebrojala stanice pod mikroskopom. Pomoću formule  $\frac{\text{broj stanica}}{0,4} * 5 \times 10^3$  odredila sam broj stanica po mililitru medija. Preko omjera, izračunala sam koliki je volumen suspenzije stanica potreban da bi se napravila suspenzija stanica odgovarajuće gustoće za pripremu sferoida, s obzirom da se sferoidi formiraju u kapljicama volumena 25 µL. Primjerice, za sferoide od 1 000 stanica po svakoj kapljici volumena 25 µL, broj stanica u 1 mL iznosi  $4 \times 10^4$ , za 2 000 stanica/25µL  $8 \times 10^4$ , a za 5 000 stanica/25µL sferoida broj stanica u 1 mL medija iznosi  $2 \times 10^5$  (Tablica 1).

**Tablica 1. Izračun broja stanica za sferoide**

<b>Broj stanica po sferoidu</b>	<b>Volumen kapljice</b>	<b>Ukupan broj stanica u 1 ml suspenzije</b>
<b>1 000</b>	25 $\mu$ L	$4 \times 10^4$
<b>2 000</b>	25 $\mu$ L	$8 \times 10^4$
<b>5 000</b>	25 $\mu$ L	$2 \times 10^5$

Broj prebrojanih stanica po 1 mL medija podijelila sam s navedenim izračunom za određen broj stanica u sferi te dobila volumen stanične suspenzije koji moram razrijediti s kompletnim medijem kako bi ukupan volumen smjese iznosio 1 mL.

Ukupno sam za svaki broj stanica (1000, 2000, 5000) nasađivala po 1 petrijevku, a volumen suspenzije koji sam koristila za nasađivanje bio je 1 mL. Pipetom sam na unutarnju stranu poklopca petrijevke nanosila 25  $\mu$ L stanične suspenzije u pravilnim razmacima, oko 40 kapljica. U samu posudicu ispipetirala sam 5 mL PBS kako se sfere ne bi osušile tijekom višednevnog uzgoja. Po završetku nasađivanja, poklopac sam okrenula i zatvorila petrijevku, a sfere su zbog površinske napetosti ostale visiti (Slika 8). Petrijevke s nasađenim sferoidima pohranjene su u inkubatoru (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Formiranje sferoida pratila sam pod mikroskopom te ih fotografirala mobilnim uređajem (Huawei P20 Pro) i DinoEye kamericom (Dino-Lite, Nizozemska) kroz 5 dana, a zatim na temelju morfologije odredila broj stanica koji ću koristiti za naredne eksperimente.



**Slika 8.** Prikaz nasađenih sferoida prije okretanja petrijevke (lijevo) i nakon okretanja (desno) (fotografirala: Nikolina Vučemilo)

### 3.2.3. Ispitivanje citotoksičnosti arsenovog(III)oksida metodom MTT

MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid; Sigma Aldrich, SAD) kolorimetrijska je metoda kojom se mjeri citotoksičnost *in vitro* te vijabilnost stanica. Temelj metode je redukcija žute tetrazolijeve soli u netopljivi ljubičasti formazan, a koju mogu napraviti samo vijabilne stanice pomoću mitohondrijskih enzima. Nakon inkubacije, kristali formazana se otapaju u organskom otapalu (npr. DMSO) te se potom spektrofotometrijski mjeri apsorbancija na 570 nm. Očitana apsorbancija je direktno proporcionalna količini vijabilnih stanica (Gutiérrez i sur. 2017). Pomoću ovog testa moguće je dobiti vrijednosti srednje smrtonosne doze supstancije (eng. *lethal dose*,  $LD_{50}$ ), odnosno dozu lijeka koja uzorkuje smrt 50 % populacije istraživane skupine, primjerice životinja ili stanica (Mahajan i sur. 2012).

Kako bih odredila središnju smrtonosnu dozu ATO (Sigma Aldrich, SAD) kojeg Laboratorij za nasljedni rak do sada nije koristio, provela sam MTT test. Za nasađivanje sam koristila adherentne stanične linije koje sam prema ranije opisanom protokolu odvojila od podloge, prebrojala stanice te napravila stanične suspenzije. Konačan broj stanica u 100  $\mu$ L suspenzije koji sam nasađivala u bunariće iznosio je 2000 stanica po bunariću. Pločicu s 96 bunarića (Sarstedt, Njemačka) označila sam tako da su bunarići od A do D bili namijenjeni staničnoj liniji FaDu, a od E do H Detroit562. Suspenzije sam nasadila višenakalnom mikropipetom pipetirajući po 100  $\mu$ L suspenzije stanica po bunariću, tako da je za svaku staničnu liniju bilo nasađeno 44 bunarića. Osam bunarića ostalo je prazno kako bi se na dan očitavanja u njih stavila kontrolna otopina.

Pločicu s nasadenim stanicama pohranila sam u inkubator na 24 h kako bi se stanice prihvatile za podlogu. Sutradan, pločicu sa stanicama pogledala sam pod mikroskopom kako bih provjerila jesu li stanice prihvaćene za podlogu. Pripremila sam tretman ATO tako što sam napravila serijska razrjeđenja 50 mM otopine (Tablica 2.). Svaku koncentraciju spoja sam nanijela u četiri bunarića kako bih imala četiriplikate, a u jedan set od četiri bunarića sam umjesto spoja dodala medij. Pločicu s tretiranim stanicama stavila sam u inkubator na 72 h. Nakon 72 h, radila sam MTT esej. Sa stanica sam uklonila medij vakum sisaljkom te pripremila otopinu MTT tako da sam 10x koncentriranu otopinu MTT razrijedila na 1x pomoću kompletnog medija. Potom sam 40 µL razrjeđenja MTT pipetirala u svaki bunarić, uključujući i kontrolne prazne bunariće. Pločicu sam zatvorila poklopcem, omotala aluminijskom folijom te stavila na inkubaciju 4 h u inkubator.

Po isteku inkubacije, u svaki bunarić sam ispipetirala 160 µL DMSO te stavila na tresilicu 10 min kako bi se kristali formazana otopili. Potom sam pločicu umetnula u spektrofotometrijski čitač LabSystems Multiskan MS (Thermo Fisher Scientific) te očitala apsorbanciju na 570 nm. Dobivene vrijednosti sam normalizirala u programu Excel, dok sam Programom LD50 calculator (AAT Bioquest, <https://www.aatbio.com/tools/ld50-calculator>) odredila LD<sub>50</sub> vrijednost ATO za svaku staničnu liniju.

**Tablica 2. Serijska razrjeđenja arsenovog (III) oksida**

Redni broj razrjeđenja	V (medij, EMEM 10%, µL)	V(ATO, µl)	konačna konc.otopine (µM)
I.	1500	7,5 (50 mM)	125
II.	750	750 (I)	62,5
III.	1200	300 (II)	15,625
IV.	750	750 (III)	7,813
V.	1200	300 (IV)	1,950
VI.	750	750 (V)	0,976
VII.	1200	300 (VI)	0,244
VIII.	750	750 (VII)	0,122
IX.	1200	300 (VIII)	0,030

\*rimskim brojevima su prikazane smjese korištene u pripremi razrjeđenja



### 3.2.4. Tretiranje staničnih linija inhibitorima signalnog puta HH-GLI

Za tretiranje stanica koristila sam inhibitore signalnog puta HH-GLI: GANT-61 (Selleckchem SAD), ciklopamin (CYC) (Selleckchem, SAD), ATO (Sigma-Aldrich SAD), te litijev klorid (LiCl) (Kemika, RH). Sferoidi su tretirani na dva načina; odmah tijekom formiranja ili nakon što su sferoidi potpuno formirani kako bih ustanovila djelovanje inhibitora u oba uvjeta. Za usporedbu, istim sam dozama tretirala i dvodimenzionalne kulture (2D) obje stanične linije. Ideja ovakve postavke eksperimenta je uvidjeti postoji li razlika u odgovoru 2D, odnosno 3D modela stanica tumora glave i vrata. Stanice u sva tri modela tretirane u jednakim uvjetima te su korištene iste koncentracije (Tablica 3.) Doze primijenjene za ove pokuse utvrđene su prethodno na istim staničnim linijama (Zubčić i sur. 2020), dok doze ATO predstavljaju LD<sub>50</sub> dozu sa svaku liniju.

**Tablica 3. Priprema tretmana inhibitora signalnog puta HH-GLI za ukupni volumen od 2 mL**

spoj	početna konc. (c <sub>1</sub> )	konačna konc.(c <sub>2</sub> )	volumen spoja (V <sub>1</sub> )
<b>GANT-61</b>	5 mM	10 μM	4 μL
<b>LiCl</b>	1M	20 mM	40 μL
<b>CYC</b>	2 μg/mL	2 ng/mL	2 μL
<b>ATO (FaDu)</b>	50 mM (125 μM)	5 μM	80 μL
<b>ATO (Det562)</b>	50 mM (125 μM)	0,5 μM	8 μL

#### 3.2.4.1. Tretman 2D staničnih kultura

Za tretiranje adherentnih staničnih linija, stanice je bilo potrebno odvojiti od podloge procesom tripsinizacije te ih prebrojati prema već opisanom protokolu. Stanice su nasađivane u pločice sa 6 bunarića (Sarstadt, Njemačka), tako da u svakom bunariću ima  $2 \times 10^5$  stanica u 2 mL stanične suspenzije. Poklopac pločice označila sam oznakama K, GANT, LiCl, CYC i ATO, pri čemu K označava netretiranu kontrolu. Pločice s nasađenim stanicama stavila sam u inkubator 24 h kako bi se stanice prihvatile za podlogu. Nakon 24 h, pločicu sa stanicama sam izvadila iz inkubatora, provjerila pod mikroskopom jesu li prihvaćene za podlogu te pripremila otopine s tretmanima. Adherentnim stanicama odsisala sam medij pipetom, isprala stanice s 1 mL PBS, uklonila PBS te ispipetirala po 2 mL kompletnog medija s dodanim spojevima prema Tablici 3. Pločicu s tretiranim stanicama vratila sam u inkubator na 72 h.

Nakon 72 h, pločicu sam izvadila iz inkubatora, stanicama odsisala medij s tretmanima, dodala 200  $\mu$ L tripsina te ovisno o staničnoj liniji, pričekala djelovanje tripsina. Inaktivaciju tripsina napravila sam s 800  $\mu$ L kompletnog medija, a zatim sam dodatno nastavkom za pipete odvajala stanice od podloge te sadržaj prenosila u čiste, označene mikroeprovete od 1,5 mL. Sadržaj sam centrifugirala (Eppendorf) 5 min na 1000 x g, odlila supernatant, a taloge zamrznula na -20°C.

#### **3.2.4.2. Tretman sferoida tijekom formiranja**

Na temelju morfologije, odredila sam kako su sferoidi sačinjeni od 5000 stanica po sferi najprikladniji za daljnje eksperimente. Adherentne stanične linije odvojila sam od podloge tripsinizacijom te prebrojala stanice. Pripremila sam mikroeprovete od 1,5 mL, označila ih te pripremila otopine tretmana prema Tablici 3. U otopine tretmana dodala sam određeni volumen stanične suspenzije kako bi ukupni volumen smjese za nasađivanje bio 1 mL, a broj stanica odgovarao broju od 5000 stanica po sferoidu. Također, nasadila sam i petrijevku koja je služila kao kontrola; umjesto tretmana, u mikroeprovetu volumena 1,5 mL ispipetirala sam određeni volumen kompletnog medija. Sferoide sam pripremila na način opisan u potpoglavlju 3.2.2. Sferoidi su u mediju s inhibitorima rasli 72 h dok nisu sakupljeni za daljnje analize. Nakon 72 h, izdvojila sam ih s poklopca pipetom u čistu mikroeprovetu od 1,5 mL. Sadržaj sam centrifugirala 5 min na 1000 x g, odlila supernatant, a taloge zamrznula na -20°C.

#### **3.2.4.3. Tretman sferoida nakon formiranja**

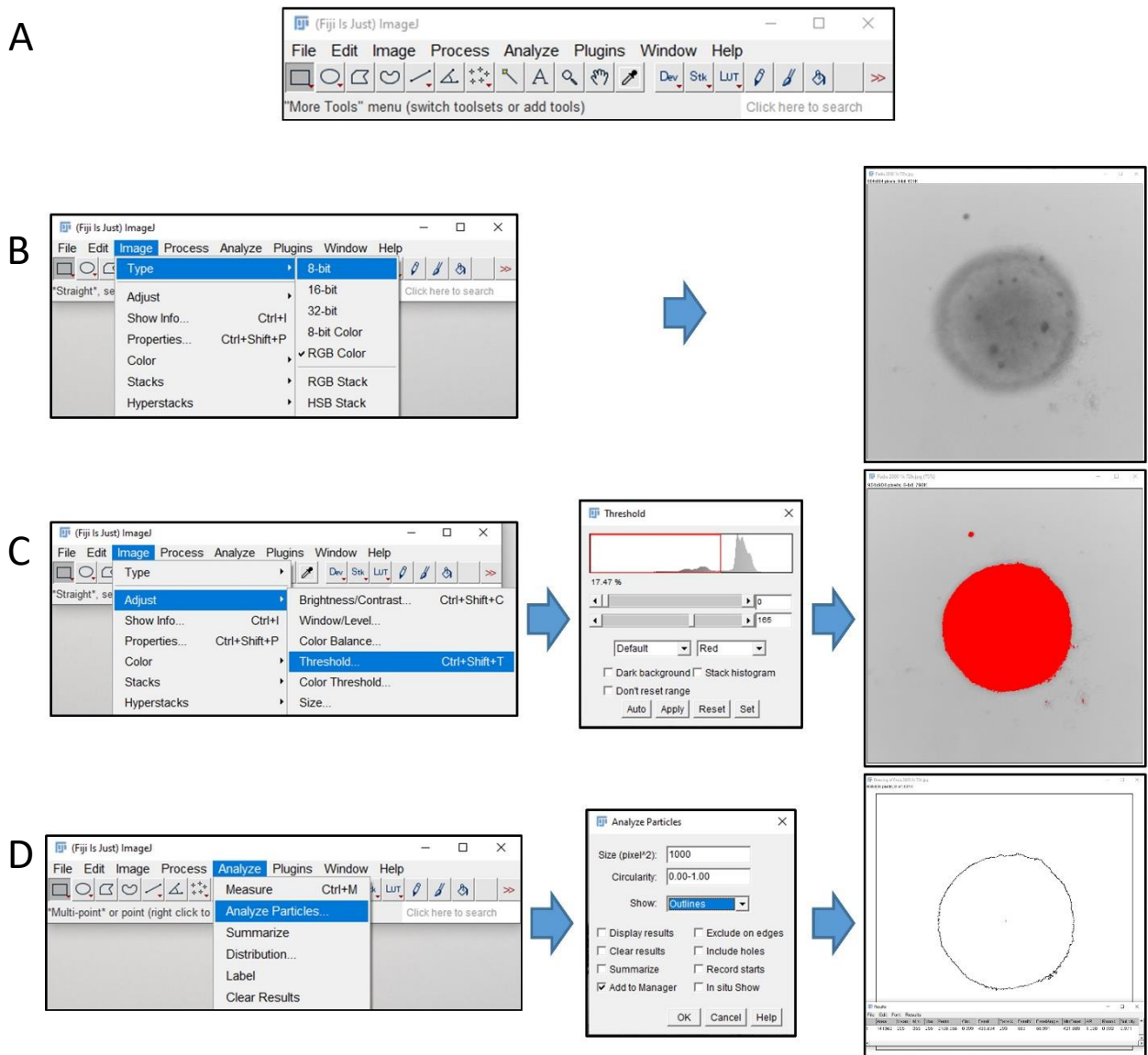
Adherentne sam stanične linije odvojila od podloge, prebrojala stanice te pripremila stanične suspenzije za nasađivanje. Kao i sferoide koji su rasli u formiranju, na poklopac petrijevke nasadila sam sferoide za naknadne tretmane koje sam pohranila u inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) na 24 h kako bi se formirali sferoidi. Nakon 24 h, petrijevke s formiranim sferoidima izvadila sam iz inkubatora te odložila u sterilni kabinet.

Male neadherentne petrijevke promjera 3 cm (Greiner, Njemačka) označila sam oznakama K, GANT-61, LiCl, CYC i ATO. U Tablici 3 navedene su početne i konačne koncentracije otopina korištenih za tretiranje sferoida, a konačni volumen smjese sferoida i tretmana iznosio je 2 mL.

U mikropruветama volumena 1,5 mL pripremila sam otopine tretmana, a potom sam jedan mililitar pripremljene otopine prebacila označene neadherentne petrijevke. Nastavkom za mikropipetu jedan po jedan sferoid prenosila sam u tako pripremljen medij. Neaderentne petrijevke sa sferoidima pohranila u inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) na 72 h do sakupljanja istih. Po isteku 72 h, pipetom sam skupila sadržaj neaderentnih petrijevki u čiste mikropruветe od 1,5 mL, centrifugirala 5 min na 1000 x g, odlila supernatant, a taloge zamrznula na -20°C.

#### **3.2.4.4. Analiza karakteristika sferoida u programu FIJI**

Sve sferoide sam fotografirala nakon 24 h, 48 h te 72 h kamericom DinoEye koja je bila spojena na prijenosno računalo te mikroskop. Fotografije sam naknadno obradila u programu FIJI (Schindelin i sur. 2012) kako bih dobila podatke o cirkularnosti te površini sfera koje sam koristila u svrhu kvantifikacije. Fotografije koje sam obrađivala izrezala sam na jednake dimenzije, a potom ih pretvorila u 8-bit format. Kako bi program mjerio vrijednosti od interesa samo na području sfere, namjestila sam prag detekcije (eng. *threshold*). Potom sam opcijom *Analyze particles* dobila morfološke parametre sfere od interesa; površinu (*area*) te cirkularnost (*circularity*) koje sam koristila za kvantifikaciju. Dodatno, kako bih izbjegla očitavanja nepotrebnih dijelova slike (npr. ostaci drugih sfera koje su se raspale) namjestila sam veličinu očitavanja sfere, opcija *Size (pixel<sup>2</sup>)*. Opcija *Outline* prikazuje vanjske rubove sfere koje će biti mjerene (Slika 9). Nakon prilagodbe veličine, dobila sam rezultate mjerenja sferoida koje sam prebacila u Excel te napravila izračune površine i cirkularnosti. Cirkularnost (okruglost) sferoida računa se prema formuli  $4\pi * \frac{\text{površina}}{\text{opseg}^2}$ , pri čemu dobivena vrijednost 1,0 predstavlja savršenu kružnicu, a vrijednosti između 0 i 1 raspon pravilnosti okruglog oblika sferoida.



**Slika 9.** Prikaz obrade fotografije sferoida u programu FIJI. A) sučelje programa, B) postupak pretvaranja slike u 8-bit format, C) postupak podešavanja praga detekcije, D) analiziranje sferoida, uz opciju *Size pixel<sup>2</sup>* pomoću koje se podešava veličina očitavanja sfere od interesa kako bi se isključile čestice malih veličina koje nisu dio sferoida.

### 3.2.5. Izolacija RNA i mjerenje koncentracije RNA

Izdvajanje RNA iz taloga stanica sferoida i adherentnih stanica, provela sam pomoću NuceloZOL reagensa (Macherey-Nagel, Njemačka). Na otopljene taloge stanica dodala sam 500  $\mu$ L Nucelozol reagensa i 200  $\mu$ L vode očišćene od RNAza te resuspendirala sadržaj pipetom. Uzorci su se inkubirali 5 min na sobnoj temperaturi. Potom sam smjesu centrifugirala 15 min na 16 000 x g, a potom 500  $\mu$ L supernatanta prebacila u nove označene mikroeprovete volumena 1,5 mL. U ovom koraku važno je ne povući proteine i DNA iz taloga kako bi čistoća RNA bila dobra. Na izdvojeni supernatant dodala sam 700  $\mu$ L izopropanola kako bi se RNA istaložila; sadržaj se inkubirao 5 min na sobnoj temperaturi, a zatim sam stavila centrifugirati 10 min na 16 000 x g. Supernatant sam odvojila u otpad, a talog isprala sa 75% etanolom, centrifugirala 3 min na 10 000 x g te postupak ispiranja taloga ponovila još jednom. Isprane taloge otopila sam u 1x TE puferu (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) te pohranila na  $-20^{\circ}\text{C}$  do mjerenja koncentracije RNA. Postupak mjerenja koncentracije RNA dobivene iz taloga sferoida i adherentnih stanica provodila sam na spektrofotometru NanoPhotometer N50/N60 (Implen, Njemačka). Uzorke RNA koji su bili pohranjeni na  $-20^{\circ}\text{C}$  otapala sam na ledu te ih ondje čuvala za vrijeme mjerenja kako se RNA ne bi degradirala. Za početak, bilo je potrebno kalibrirati uređaj s 1  $\mu$ L 1x TE pufera u kojemu su talozi otopljeni. Potom sam mikroeprovete s otopljenim talozima kratko promiješala na vibracijskoj miješalici te pipetirala 1  $\mu$ L sadržaja na uređaj. Između uzoraka, površinu za mjerenje prebrisala sam maramicom. Valne duljine na kojima su mjerene koncentracije RNA su 230 nm, 260 nm te 280 nm. Omjer apsorbancija izmjerenih pri 260 nm i 280 nm pokazuje količinu kontaminacija, poput fenola i proteina. Za RNA taj bi omjer trebao biti 2,0, u protivnom je došlo do kontaminacije uzoraka što može ometati daljnje analize, poput kvantitativnog PCR.

### 3.2.6. Reverzna transkripcija i kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (qPCR)

Kako bih utvrdila djelovanje korištenih inhibitora na ekspresiju gena uključenih u signalni put HH-GLI, bilo je potrebno napraviti reverznu transkripciju RNA izolirane iz svih uzoraka te kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (qPCR). Procesom reverzne transkripcije, iz RNA molekule, dobiva se komplementarna DNA koja je stabilnija te stoga pogodnija za qPCR (Corthell 2014).

Reverznu transkripciju, u svrhu dobivanja komplementarne DNA (cDNA) provela sam pomoću komercijalnog seta High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific, SAD). Prije pipetiranja, sve komponente iz seta otopila sam na termobloku (36°C), izuzev enzima koji se čuvao na hladnom bloku. Potom sam mikroeprovete s kemikalijama promiješala na vibracijskoj miješalici te centrifugirala. U mikroeprovetu od 0,5 mL ispipetirala sam zajedničku smjesu koja se sastoji od pufera, dNTP, nasumičnih početnica te enzima reverzne transkriptaze (Tablica 4). Cijeli postupak radila sam na ledenom bloku kako bih spriječila inaktivaciju enzima. Označila sam mikroeprovete volumena 0,2 mL te u svaku ispipetirala 5,75 µL zajedničke smjese. Mikroeprovete s izoliranim RNA otopila sam na sobnoj temperaturi, promiješala na vibracijskoj miješalici te centrifugirala kako bi se sadržaj spustio u dno epruvete. U svakoj reakciji korišteno je 1000 ng RNA tako da je izračunat potrebni volumen iz ranije određenih koncentracija. Smjesu sam potom promiješala na vibracijskoj miješalici, centrifugirala te stavila u uređaj za PCR (Thermal Cycler 2720, Applied Biosystems). Uzorci su pohranjeni na -20°C.

**Tablica 4.** Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju

<b>KOMPONENTA</b>	<b>volumen (µL)</b>
10x pufer	2,5
dNTP	1
nasumične početnice	1
reverzna transkriptaza	1,25
H <sub>2</sub> O+RNA (1 µg)	19,25

Nakon reverzne transkripcije, uslijedilo je mjerenje razine ekspresije ciljnih gena *SHH*, *PTCH1*, *GLI1*, *GLI2* te *GLI3*, a u odnosu na endogenu kontrolu *RPLP0* metodom qPCR. Sekvence početnica koje sam koristila za umnažanje ciljnih gena navedene su u Tablici 5.

Površinu na kojoj sam radila, kao i pipete, prije pipetiranja prebrisala sam otopinom koja uklanja enzime DNaze te RNaze. Za svaki gen, u označene mikroeprovete od 0.5 mL ispipetirala sam reakcijsku smjesu, tzv. *master mix* (Tablica 6); za 6 gena napravila sam 6 reakcijskih smjesa. Svaka reakcijska smjesa sastojala se od para početnica za specifični gen (Sigma Aldrich, SAD), SYBR Green boje (SsoAdvanced, Bio-Rad Laboratories, SAD) te pročišćene vode. Promiješala sadržaj mikroeproveta na vibracijskoj miješalici te centrifugirala kako bi se smjesa spustila na dno mikroeprovete. Uzorke cDNA otopila sam na sobnoj temperaturi, promiješala na vibracijskoj miješalici te centrifugirala. Na ledeni blok postavila sam pločicu s 96 bunarića; filter nastavcima za pipete pipetirala sam 9 µL reakcijske smjese te 1 µL cDNA za svaki uzorak, u duplikatu (Slika 10). U posljednji stupac pipetirala sam reakcijsku smjesu za svaki gen te 1 µL vode koja je korištena u pripremi iste, a kako bi se provjerila čistoća kemikalija. Po završetku pipetiranja, pločicu sam zalijepila prozirnom folijom, pazeći da rubove pločice dobro zatvorim kako sadržaj ne bi ispario pod utjecajem visoke temperature u uređaju. Pločicu sam potom postavila na centrifugu kako bi se sadržaj u bunarićima spustio na dno bunarića te postavila u uređaj (CFX 96, Bio-Rad Laboratories, SAD) na sljedeći program:

95°C	30 min	}	40x
95°C	10 min		
61°C	30 min		
60°C - 95°C - krivulja taljenja			

Po završetku programa, dobivene su Ct vrijednosti koje su bile potrebne za izračun promjene ekspresije gena. Provjerom krivulja taljenja provjerila sam je li došlo do umnažanja specifičnog željenog fragmenta, ili se radi o nespecifičnom umnažanju. Oblik krivulje taljenja specifičan je za svaki umnoženi fragment i u svakoj reakciji mora biti na istom položaju te izgledati jednako kako bi se rezultat smatrao pouzdanim. Prema formuli  $2^{-\Delta\Delta CT}$  izračunala sam promjene u ekspresiji gena u odnosu na endogenu kontrolu programom Excel.

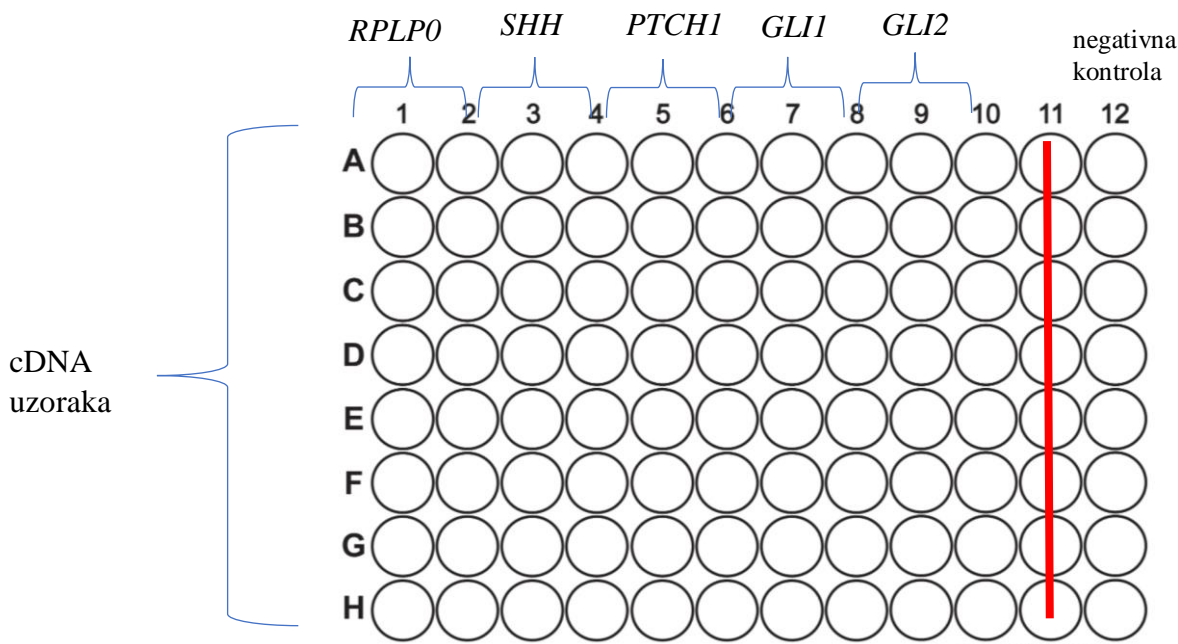
**Tablica 5.** Sekvence početnica korištenih u qPCR. Slovo F označava uzvodnu početnicu (eng. *forward*), a R nizvodnu (eng. *reverse*)

GEN	SEKVENCA
<b><i>SHH, F</i></b>	5'- CGAGTCCAAGGCACATATCC-3'
<b><i>SHH, R</i></b>	5'- GAAGCAGCCTCCCGATTT-3'
<b><i>PTCH1, F</i></b>	5'- TCCTCGTGTGCGCTGTCTTCCTTC-3'
<b><i>PTCH1, R</i></b>	5'- CGTCAGAAAGGCCAAAGCAACGTGA-3'
<b><i>GLI1, F</i></b>	5'- CTTGTGGTCCCCATGACTCT-3'
<b><i>GLI1, R</i></b>	5'- GTTGGGGCTGGACATATCAC-3'
<b><i>GLI2, F</i></b>	5'- GCCATCAAGACCGAGAGCTC-3'
<b><i>GLI2, R</i></b>	5'- CGGCCCATGAGCAGGAATCC-3'
<b><i>GLI3, F</i></b>	5'- CACTACCTCAAAGCGGGAAG-3'
<b><i>GLI3, R</i></b>	5'- TGTTGGACTGTGTGCCATTT-3'
<b><i>RPLP0, F</i></b>	5'- GGCACCATTGAAATCCTGAGTGATGTG-3'
<b><i>RPLP0, R</i></b>	5'- TTGCGGACACCCTCCAGGAAGC-3'

**Tablica 6.** Sastav reakcijske smjese za qPCR

KOMPONENTA	Volumen (µL)
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix®	5
uzvodna početnica (eng. <i>forward</i> , F)	0,3
nizvodna početnica (eng. <i>reverse</i> , R)	0,3
H <sub>2</sub> O	3,4





**Slika 10.** Shema izrade pločice za qPCR. Brojevi 1-10 predstavljaju istraživane gene; slova A-H uzorke cDNA. Stupić 12 predstavlja negativnu kontrolu gdje je umjesto cDNA pipetirana pročišćena voda. Smjese i uzorci pipetirani su u duplikatima, izuzev negativne kontrola koja je pipetirana u jednom primjerku. Pločica s GLI3 rađena je naknadno, također s kontrolnim genom *RPLP0*.

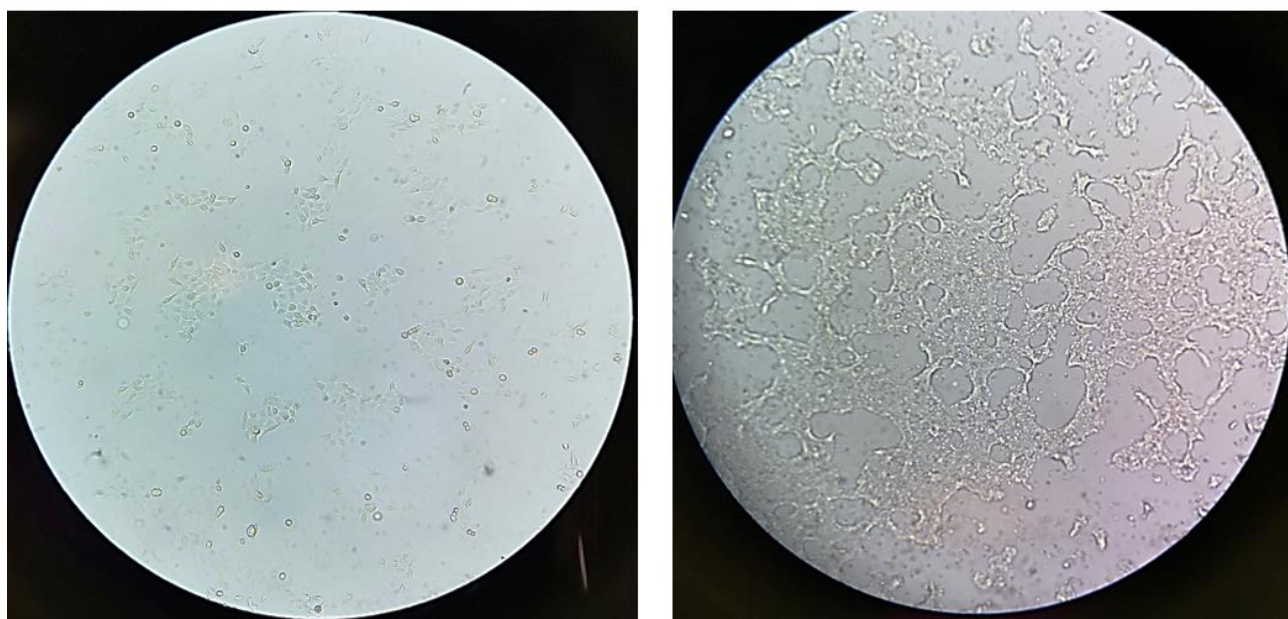
### 3.2.7. Statistička obrada podataka

Mjerenja sferoida rađena su u triplicatima, za oba parametra (površina i okruglost). Prvotno su kvantificirani programom Excel, a potom su dobiveni podaci obrađeni programom MedCalc for Windows (MedCalc Software, Belgija). Nakon toga, uslijedila je jednostruka analiza varijance ANOVA za uzorke koji su pokazivali normalnu distribuciju te Kruskal-Wallis test za uzorke koji nisu pokazivali normalnu distribuciju. Razlike u genskoj ekspresiji između kontrolnog tretmana i tetmana pojedinim spojem analizirane su t-testom. Sve P-vrijednosti testova s dvosmjernom vjerojatnošću manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Morfologija 2D staničnih kultura linija FaDu i Detroit562

Stanična linija FaDu epitelne je morfologije, gdje su stanice poligonalne te sklone brzom širenju u povoljnim uvjetima kulture. Stanična linija Detroit562 također je epitelnog porijekla, a za brzo širenje pogoduje joj gusto nasađivanje (Slika 11).



**Slika 11.** Fotografije adherentnih staničnih linija FaDu (desno) i Detroit562 (lijevo) (fotografirala: Nikolina Vučemilo)

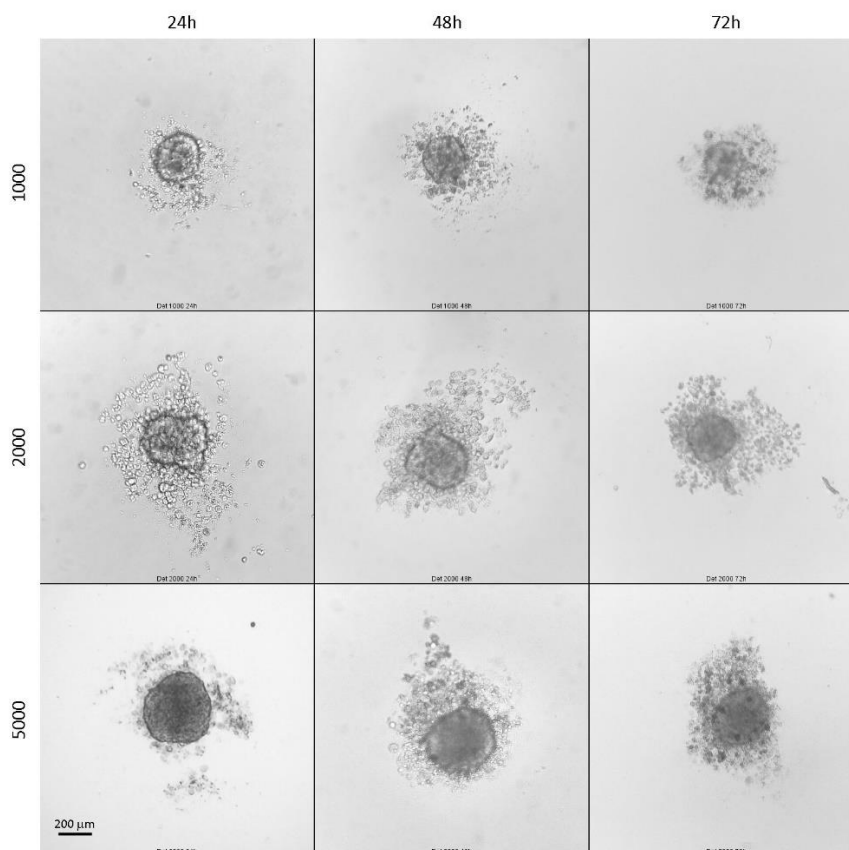
### 4.2. Optimizacija uvjeta za uspostavu trodimenzionalne (3D) sferoidne kulture

Sferoidi dvaju staničnih linija karcinoma ždrijela (FaDu i Detroit562) uzgajani su metodom viseće kapljice u jednakim uvjetima. Početni broj stanica po sferi iznosio je 1000, 2000 te 5000, a svaki je rezultirao nastankom sferoida. Nakon nasađivanja stanica, pratila sam nastanak sferoida te kroz 72 h iste fotografirala mobilnim uređajem (Huawei P20 Pro) i DinoEye kameicom. Iako su stanice nasađivane u jednakim uvjetima, pokazale su različite sposobnosti formiranja sferoida.

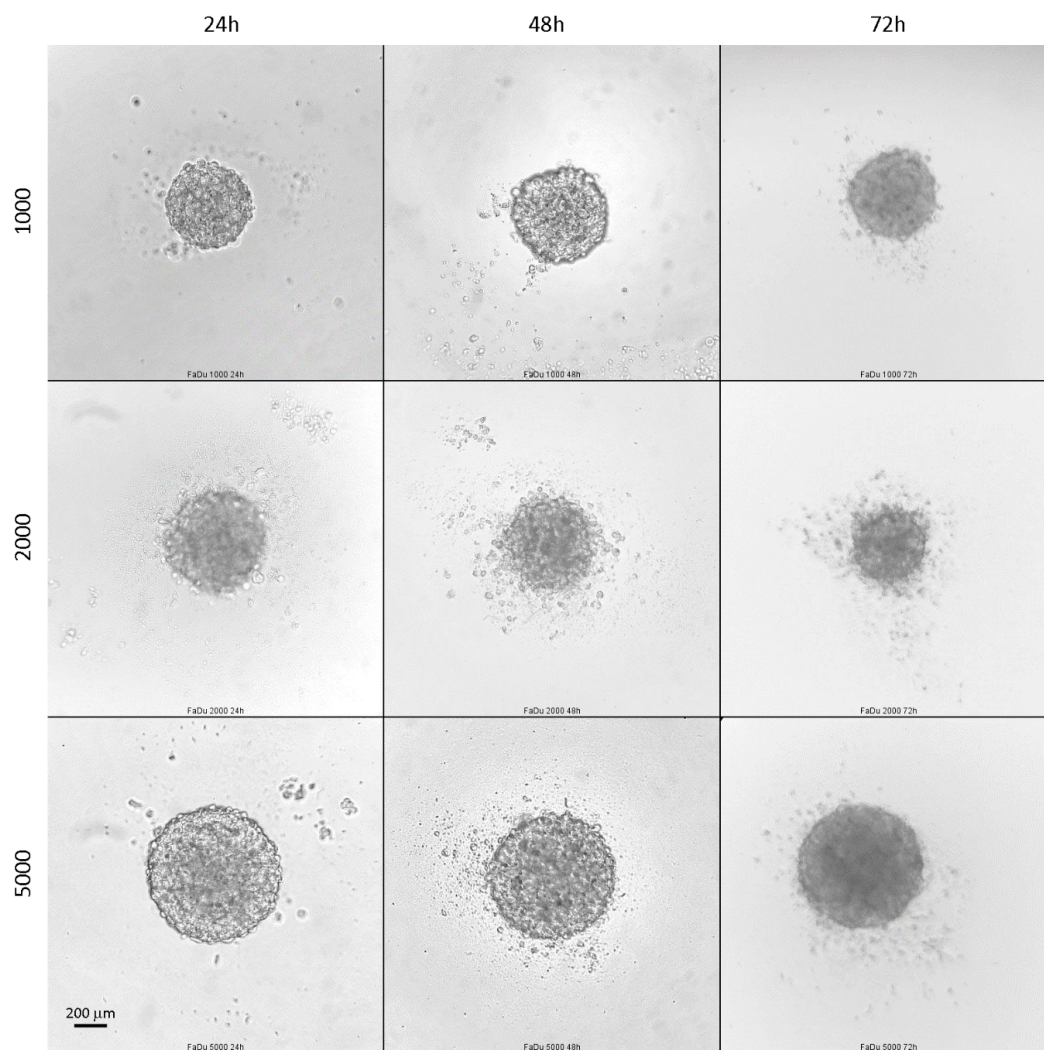
Stanična linija Detroit562 formirala je sferoide nepravilnih formi te su često bile prisutne pojedinačne stanice koje se nisu grupirale u sferoid. Sferoidi koji su sadržavali 1000 i 2000 stanica/sferi bili su skloniji rasipanju, u odnosu na sferoide sačinjene od 5000 stanica/sferi. Općenito, najnestabilnijima pokazali su se sferoidi 72 sata nakon nasađivanja, neovisno o broju stanica, jer je došlo do značajnog rasipanja stanica (Slika 12).

Sferoidi stanične linije FaDu pokazali su se veće veličine pri istom broju stanica od stanične linije Detroit562. Već 24 h nakon nasađivanja, sferoid je bio pravilnog sferoidnog oblika te čvrste forme. Manje su podložni rasipanju, a povećanjem broja stanica po sferi, sferoidi su bili proporcionalno veći (Slika 13). Također, nakon 72 h, došlo je do raspadanja sferoida, ali u manjoj mjeri u odnosu na liniju Detroit562.

Na temelju ovih pokusa ustanovljeno je da je optimalan broj stanica za nasađivanje 5000 sfera po kapljici jer obje stanične linije u tim uvjetima stvaraju najpravilnije sferoide te da je za formiranje sferoida obje stanične linije dovoljno 24h.



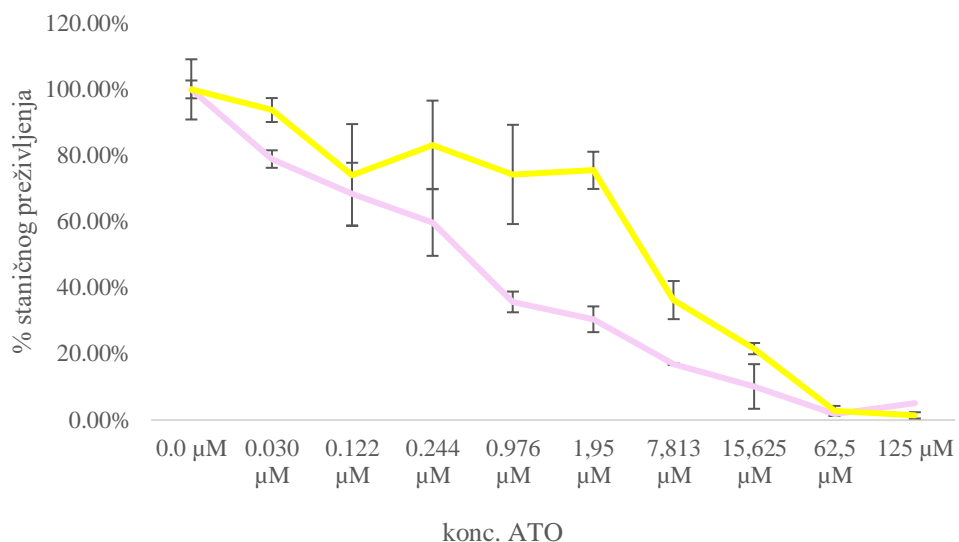
**Slika 12.** Fotografije formiranja sferoida stanične linije Detroit562 kroz 72 h s različitim početnim brojem stanica/sferi. Povećanjem broja stanica po sferi vidljivo je povećanje veličine sferoida. Sferoidi se formiraju već nakon 24 h od nasađivanja, a nakon 72 h dolazi do rasipanja stanica sferoida.



**Slika 13.** Fotografije formiranja sferoida stanične linije FaDu kroz 96 h s različitim početnim brojem stanica/sferi. Sferoidi linije FaDu također formiraju sferoide 24 h nakon nasađivanja. Formirani sferoidi su kompaktni te pravilnog oblika, a nakon 96 h također se rasipaju.

### 4.3. Ispitivanje citotoksičnosti ATO metodom MTT

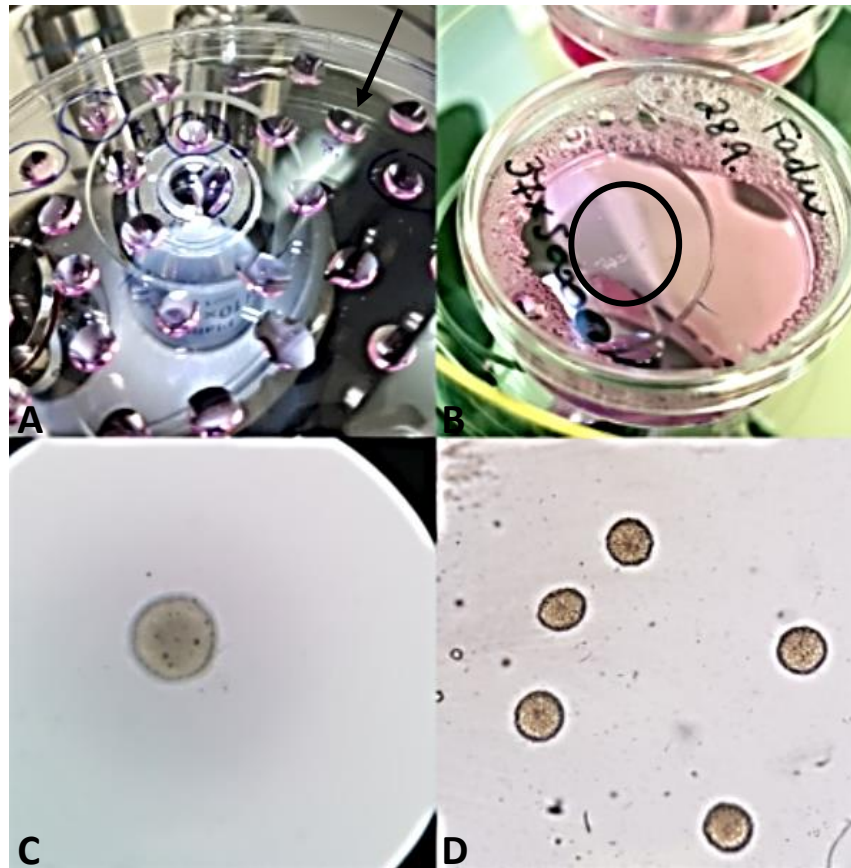
Kolorimetrijskom metodom MTT ispitivala sam citotoksični učinak ATO na adherentne stanične linije FaDu i Detroit562. Za obje stanične linije vrijedi kako je preživljenje obrnuto proporcionalno koncentraciji otopine ATO. Najniža koncentracija otopine ATO iznosila je 0,030  $\mu\text{M}$ , a stanično preživljenje FaDu i Detroit562 bilo je 100%. Pri koncentraciji od 62,5  $\mu\text{M}$ , 1,82% stanica linije Detroit562 preživljava, dok pri istoj koncentraciji preživljava 2,75% stanica linije FaDu., . Letalna doza za staničnu liniju FaDu iznosi 6,5  $\mu\text{M}$  ATO, što znači da navedena doza uzrokuje smrt 50% nasadenih stanica. Za staničnu liniju Detroit562  $\text{LD}_{50}$  otopine ATO iznosi 0,35  $\mu\text{M}$  (Slika 14).



**Slika 14.** Prikaz krivulje staničnog preživljenja za stanične linije FaDu i Detroit562. Žuta krivulja odnosi se na liniju FaDu, a ružičasta na liniju Detroit562.  $\text{LD}_{50}$  za staničnu liniju FaDu iznosi 6,5  $\mu\text{M}$  ATO, a za Detroit562 0,35  $\mu\text{M}$ .

#### 4.4. Analiza morfoloških karakteristika sferoida

Pretpostavka ovog rada je da bi se djelovanje inhibitora trebalo razlikovati ovisno o tome tretiraju li se adherentne 2D kulture, stanice u suspenziji tijekom samog procesa formiranja sferoida ili nakon što su sferoidi u potpunosti formirani. Zbog toga sam sferoide nasađivala, tretirala i pratila na oba načina, kako je prikazano u nastavku (Slika 15).



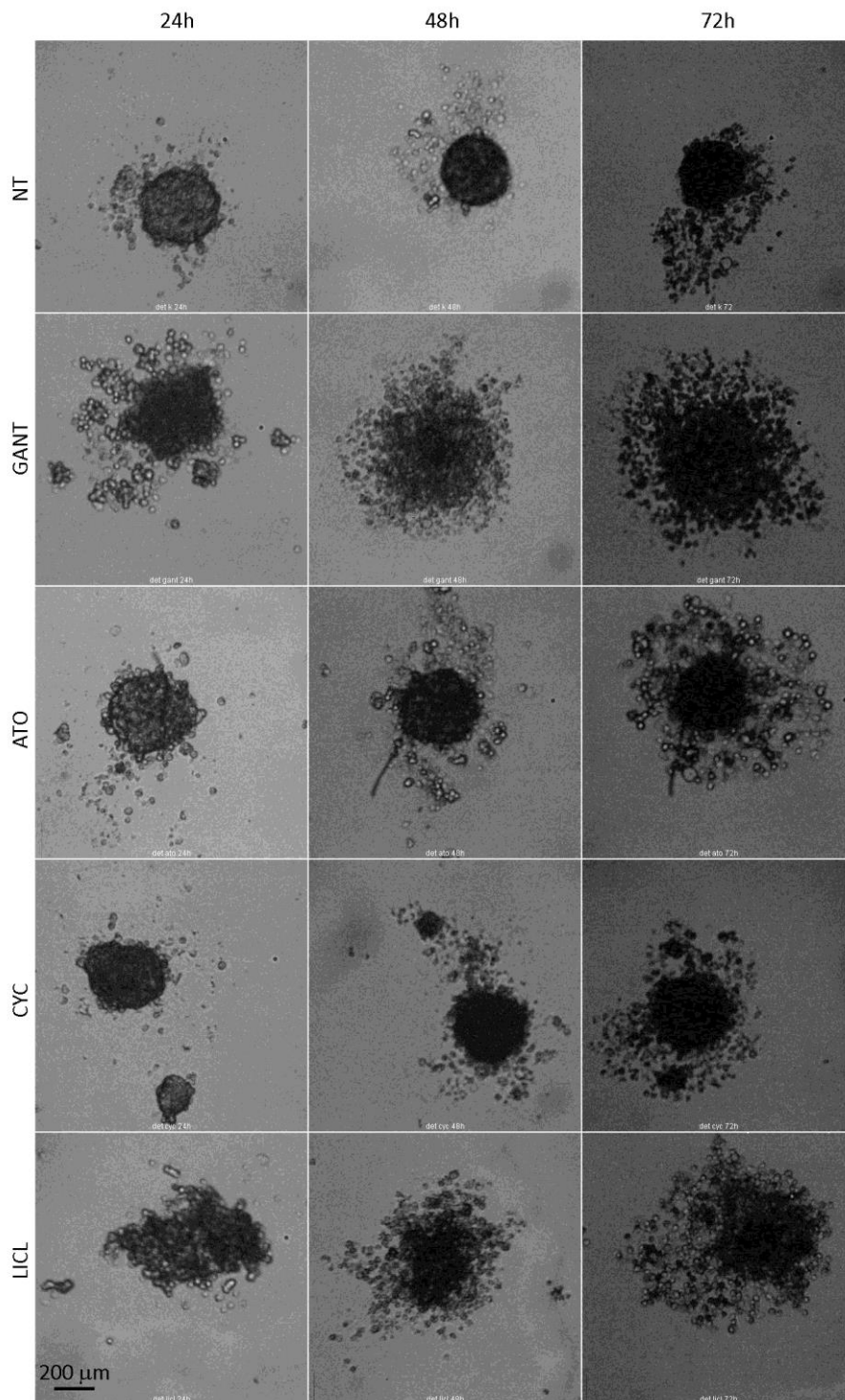
**Slika 15.** Razvoj sferoida: A) kapljice s formiranim sferoidom; B) nakupine pojedinačnih sferoida u neadherentnoj petrijevki; C) formirani sferoid promatran pod mikroskopom, a D) formirane sferoide u neadherentnoj petrijevki promatrane mikroskopski (fotografirala: Nikolina Vučemilo).

#### **4.4.1. Analiza sferoida tretiranih inhibitorima signalnog puta HH-GLI tijekom formiranja**

Sferoidi obje stanične linije nasađivani su direktno u kompletni medij EMEM 10% s inhibitora signalnog puta HH-GLI, a jedna petrijevka služila je kao kontrola. Fotografirani su 24 h, 48 h te 72 h nakon nasađivanja, DinoEye kamericom. Fotografije su obrađene softverom FIJI, a parametri koje sam pratila su veličina i okruglost.

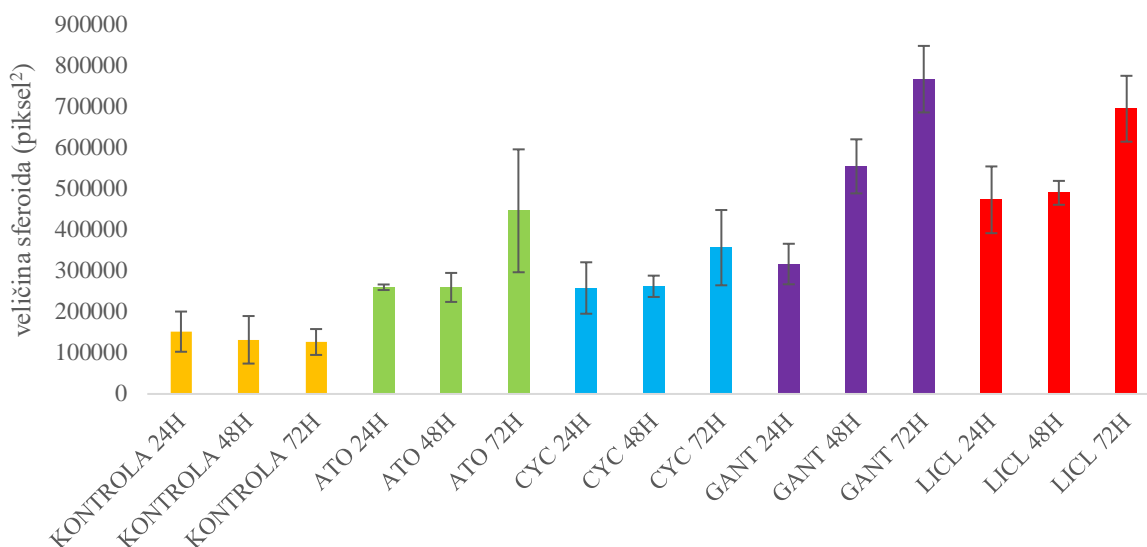
##### **4.4.1.1. Analiza sferoida stanične linije Detroit562**

U odnosu na kontrolnu skupinu sferoida stanične linije Detroit562, sve tretirane kulture pokazale su povećanje veličine tretiranih sferoida. Najizraženije povećanje veličine sferoida vidljivo je u tretmanu inhibitorima GANT-61 te LiCl, kroz 72 h. Najmanje povećanje veličine uzrokovali su tretmani inhibitorima CYC te ATO, u odnosu na kontrolnu skupinu. Ono što je zajedničko svim tretmanima, učinak je najizraženiji 72 h nakon nasađivanja, a u odnosu na sferoide kontrolne skupine. Povećanje veličine sferoida nije posljedica rasta stanica nego razdvajanja i rasipanja stanica, odnosno njihove nemogućnosti da se grupiraju u sferoide. Povećanje veličine je direktno proporcionalno duljini trajanja tretmana jer stanice koje su duže u tretmanu pokazuju rastresitije sferoide. Najveći učinak pokazuju GANT-61 i LiCl, dok najmanji učinak pokazuje ciklopamin (Slike 16 i 17). Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 0,5  $\mu$ M.



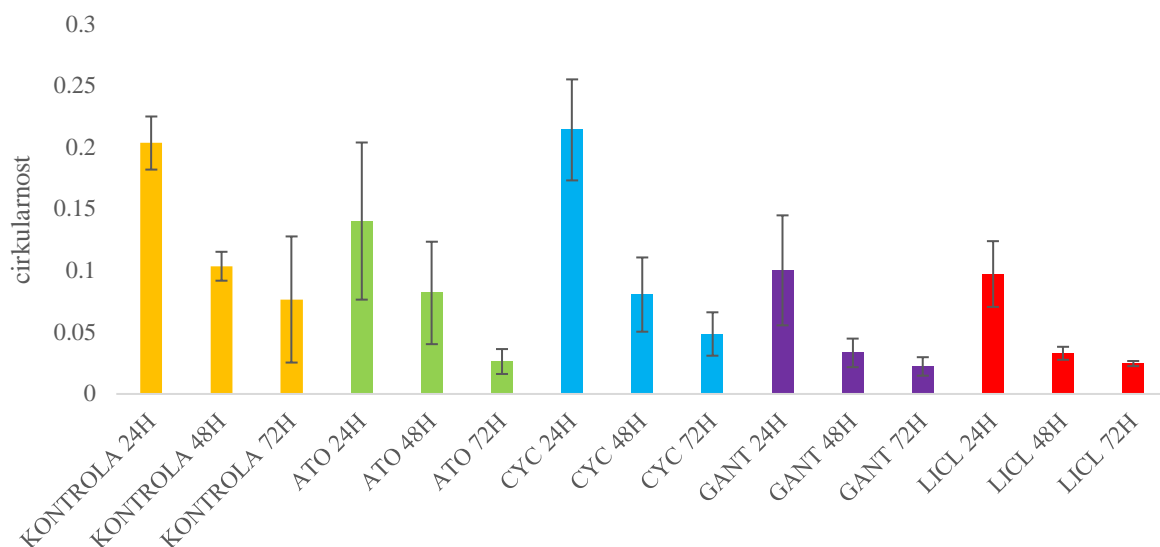
**Slika 16.** Morfološki prikaz promjene veličine sferoida linije Detroit562 u ovisnosti o tretmanima kroz 72 h. Ono što je zajedničko svim tretmanima, učinak je najizraženiji 72 h nakon nasadivanja. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 0,5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).





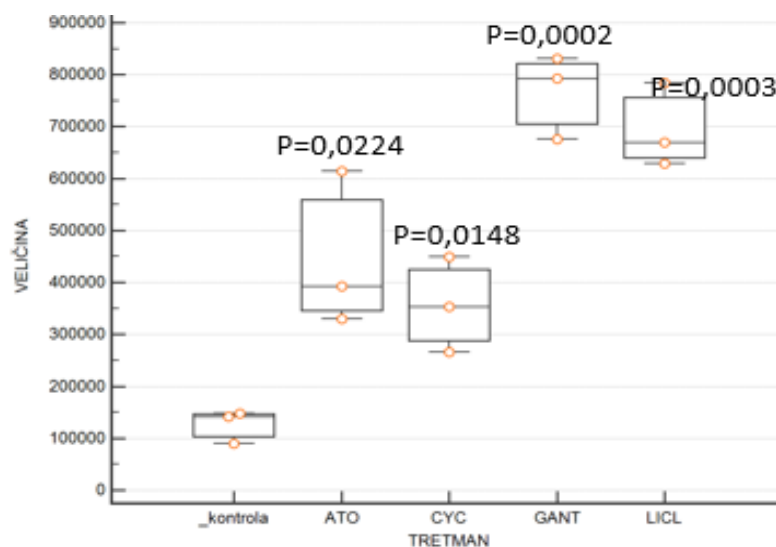
**Slika 17.** Grafički prikaz veličine sferoida linije Detroit562 u ovisnosti o tretmanima kroz 72 h. Mjerenje parametara provedeno je softverom FIJI. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 0,5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).

Drugi parametar koji sam pratila bio je okruglost (cirkularnost) sferoida. Sferoidi linije Detroit562, u odnosu na kontrolnu skupinu, mijenjali su okruglost ovisno o tretmanu. Okruglost sferoida bila je najveća 24 h nakon nasađivanja, a padala je ovisno o tretmanu. Inhibitor CYC 24 h nakon nasađivanja uzrokovao je najveće povećanje okruglosti sferoida, u odnosu na kontrolnu skupinu. Do smanjenja okruglosti došlo je i 48 h nakon nasađivanja, a tretmani GANT-61 te LiCl pokazali su najveći učinak, u odnosu na kontrolu. Kao i za parametar veličine sferoida, efekt tretmana najuočljiviji je 72 h nakon nasađivanja, gdje je vidljivo najzamjetnije smanjenje okruglosti sferoida (Slika 18).



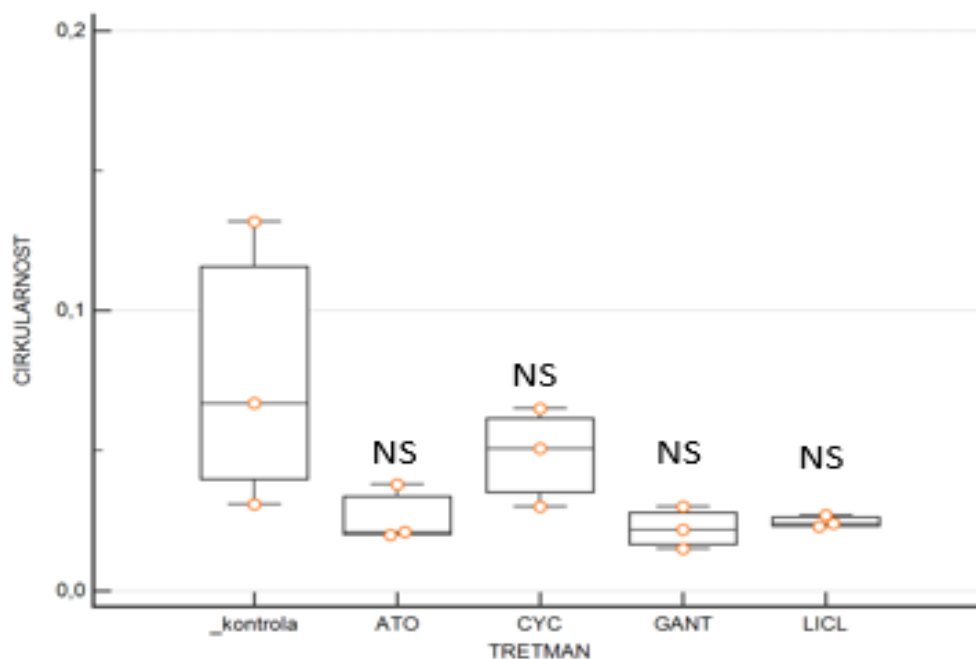
**Slika 18.** Grafički prikaz okruglosti (cirkularnosti) sferoida linije Detroit562 u ovisnosti o tretmanima kroz 72 h. Mjerenje je provedeno softverom FIJI, a obrada podataka programom Excel. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu\text{M}$ , LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 0,5  $\mu\text{M}$ . Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).

Učinak tretmana najizraženiji je 72 h nakon nasađivanja, u usporedbi s kontrolom skupinom. Statistička obrada dobivenih rezultata provedena je jednostrukom analizom varijance (ANOVA) s Tukey-Kramerovim *post hoc* testom. U odnosu na kontrolu, ovisno o tretmanu, sferoidi stanične linije Detroit562 statistički značajno mijenjaju veličinu sferoida. Tako su tretmani GANT-61 ( $P=0,0002$ ) i LiCl ( $P=0,0003$ ) uzrokovali najveće povećanje veličine, u odnosu na kontrolne sferoide. Ciklopamin je uzrokovao najmanju varijaciju u veličini sferoida ( $P=0,0148$ ), dok je tretman s ATO doveo do statistički značajnog povećanja veličine u odnosu na kontrolu ( $P=0,0224$ ) (Slika 19).



**Slika 19.** Statistička analiza promijene veličine sferoida linije Detroit562 u ovisnosti o tretmanima kroz 72 h, razine značajnosti u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistički test proveden je jednostrukom analizom varijance ANOVA. Sve P-vrijednosti testova s dvosmjernom vjerojatnošću manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 0,5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).

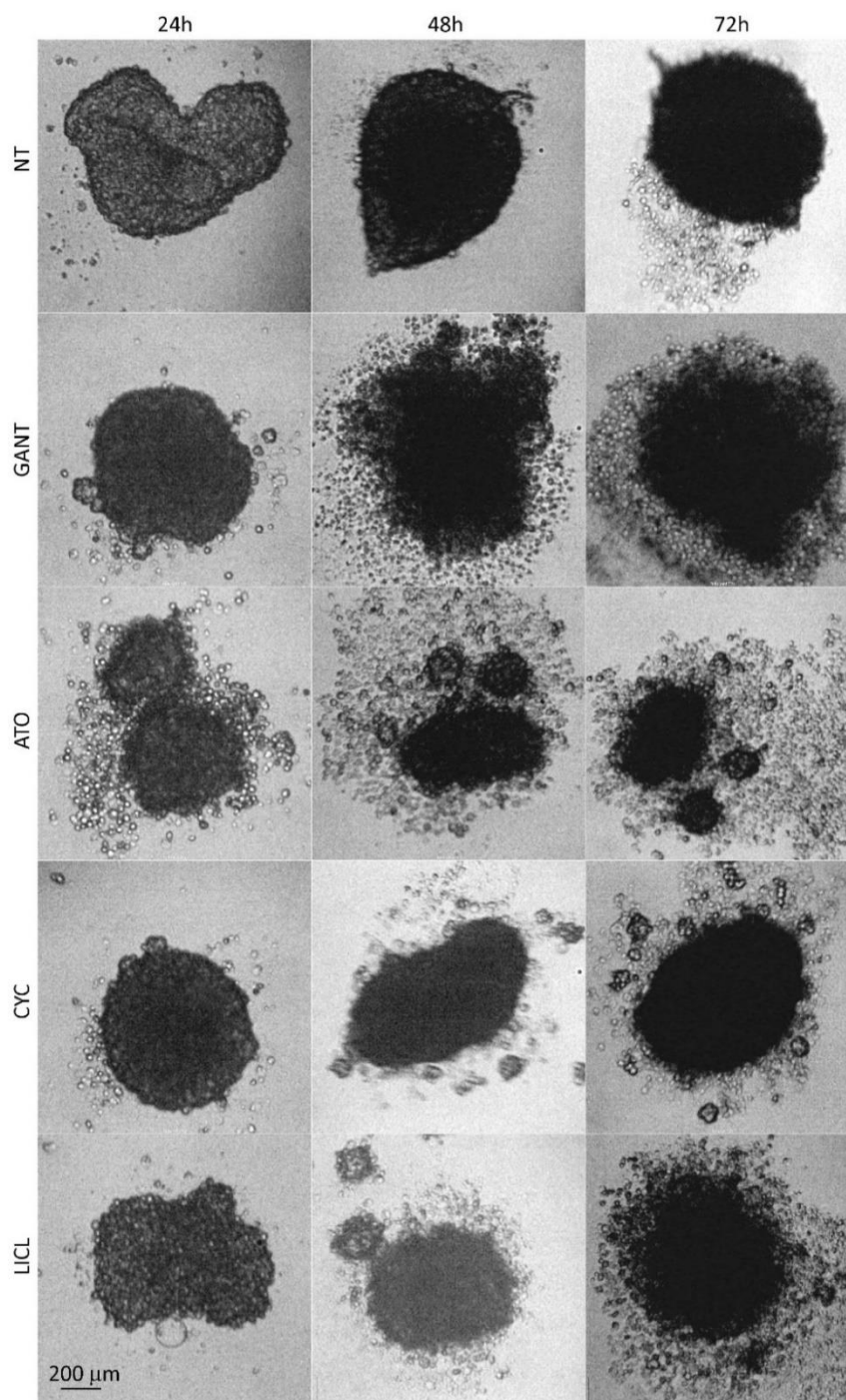
Statističkom obradom dobivenih rezultata jednostrukom analizom varijance (ANOVA) s Tukey-Kramerovim *post hoc* testom za sferoide linije Detroit562 utvrđeno je kako mijenjanje okruglosti (cirkularnosti) u ovisnosti o tretmanu nije statistički značajno, u odnosu na kontrolu (Slika 20).



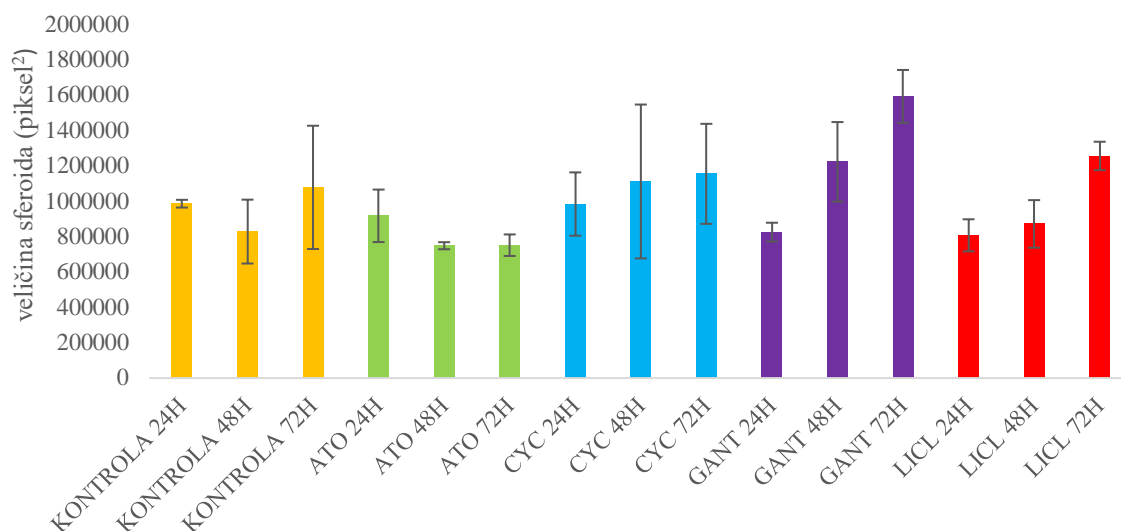
**Slika 20.** Statistička analiza promijene okruglosti (cirkularnosti) sferoida linije Detroit562 u ovisnosti o tretmanima kroz 72 h. Statistički test proveden je jednostrukom analizom varijance ANOVA. Sve P-vrijednosti testova s dvosmjernom vjerojatnošću manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 0,5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).

#### 4.4.1.2. Analiza sferoida stanične linije FaDu

Sferoidi stanične linije FaDu također pokazuju promjenu veličine u ovisnosti o tretmanu. Najveće povećanje veličine, u odnosu na kontrolnu skupinu, izazvali su tretmani GANT-61 i LiCl, kao i kod sferoida linije Detroit562. Smanjenje veličine sferoida 24 h nakon tretmana, u odnosu na kontrolnu skupinu, vidljivo je kod tretmana s GANT-61, ATO te LiCl. Tretman s ATO doveo je do smanjenja veličine sferoida 48 te 72 h nakon nasađivanja, u usporedbi s kontrolom. Svi tretmani doveli su do povećanja veličine sferoida 72 h nakon nasađivanja, u odnosu na kontrolne sferoide (Slike 21 i 22). Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 5  $\mu$ M.

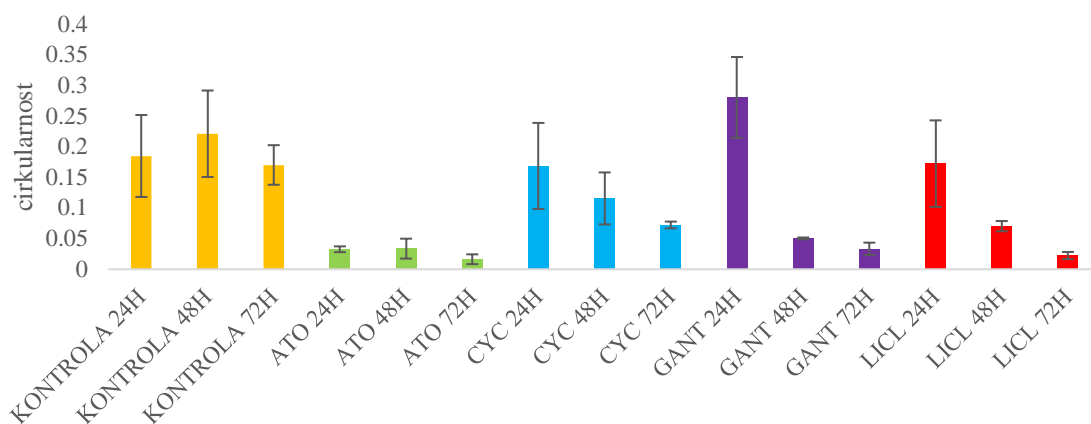


**Slika 21.** Morfološki prikaz promjene veličine sferoida linije FaDu u ovisnosti o tretmanima kroz 72 h.. Svi tretmani doveli su do povećanja veličine sferoida 72 h nakon nasađivanja, u odnosu na kontrolne sferoide. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).



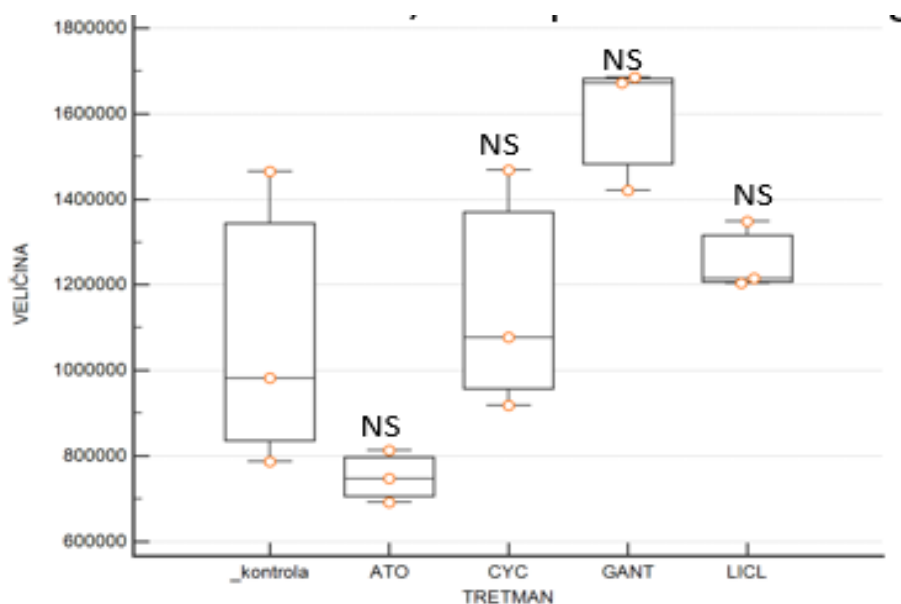
**Slika 22.** Grafički prikaz veličine sferoida stanične linije FaDu u ovisnosti o tretmanu kroz 72 h. Mjerenje je provedeno softverom FIJI, a obrada podataka programom Excel. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).

Okruglost (cirkularnost) sferoida FaDu smanjuje se tretmanima, u usporedbi s kontrolom. Tretman GANT-61 jedni je uzrokovao povećanje okruglosti sferoida, 24 h nakon nasađivanja, u odnosu na kontrolu. LiCl, CYC te ATO reducirali su okruglost sferoida, u odnosu na kontrolu, a pri tome je učinak ATO bio najjači kroz sva 3 dana rasta sferoida. Efekt tretmana na reduciranje okruglosti sferoida najizraženiji je 72 h nakon nasađivanja, u usporedbi s kontrolom (Slika 23).



**Slika 23.** Grafički prikaz okruglosti (cirkularnosti) sferoida stanične linije FaDu u ovisnosti o tretmanu kroz 72 h. Mjerenje je provedeno softverom FIJI, a obrada podataka programom Excel. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).

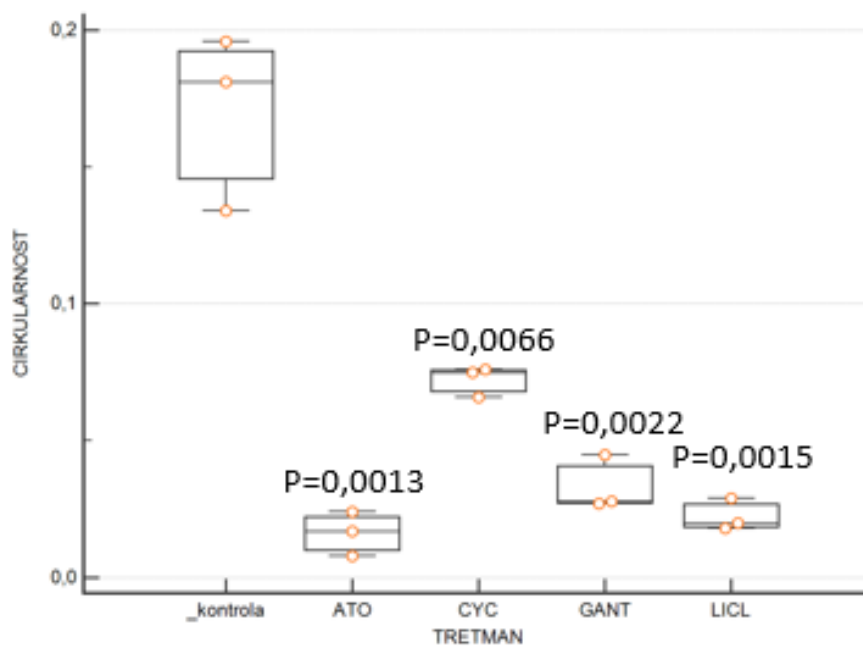
Tretmani sferoida FaDu, u odnosu na kontrolne sferoide, nisu doveli do statistički značajnog mijenjanja veličine, u odnosu na kontrolnu skupinu, 72 h nakon formiranja u tretmanu (Slika 24).



**Slika 24.** Statistička analiza veličine sferoida linije FaDu u ovisnosti o tretmanima kroz 72 h. Statistički test proveden je jednostrukom analizom varijance ANOVA. Sve P-vrijednosti testova s dvosmjernom vjerojatnošću manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).

S obzirom na to da ANOVA analizom nisu dobivene normalne distribucije uzoraka, za statističku obradu podataka sferoida linije FaDu koristio se Kruskal-Wallis test. Prema dobivenim rezultatima, promjena okruglosti sferoida FaDu ovisno o tretmanu, statistički je značajna. U odnosu na kontrolu, najizraženije statistički značajno smanjenje okruglosti sferoida 72 h nakon rasta u tretmanu, uzrokuju tretmani ATO ( $P=0,0013$ ) i LiCl ( $P=0,0015$ ). Tretman CYC uzrokovao je najmanje statistički značajno reduciranje okruglosti sferoida ( $P=0,0066$ ), a slijedi ga tretman GANT-61 ( $P=0,0022$ ) (Slika 25).





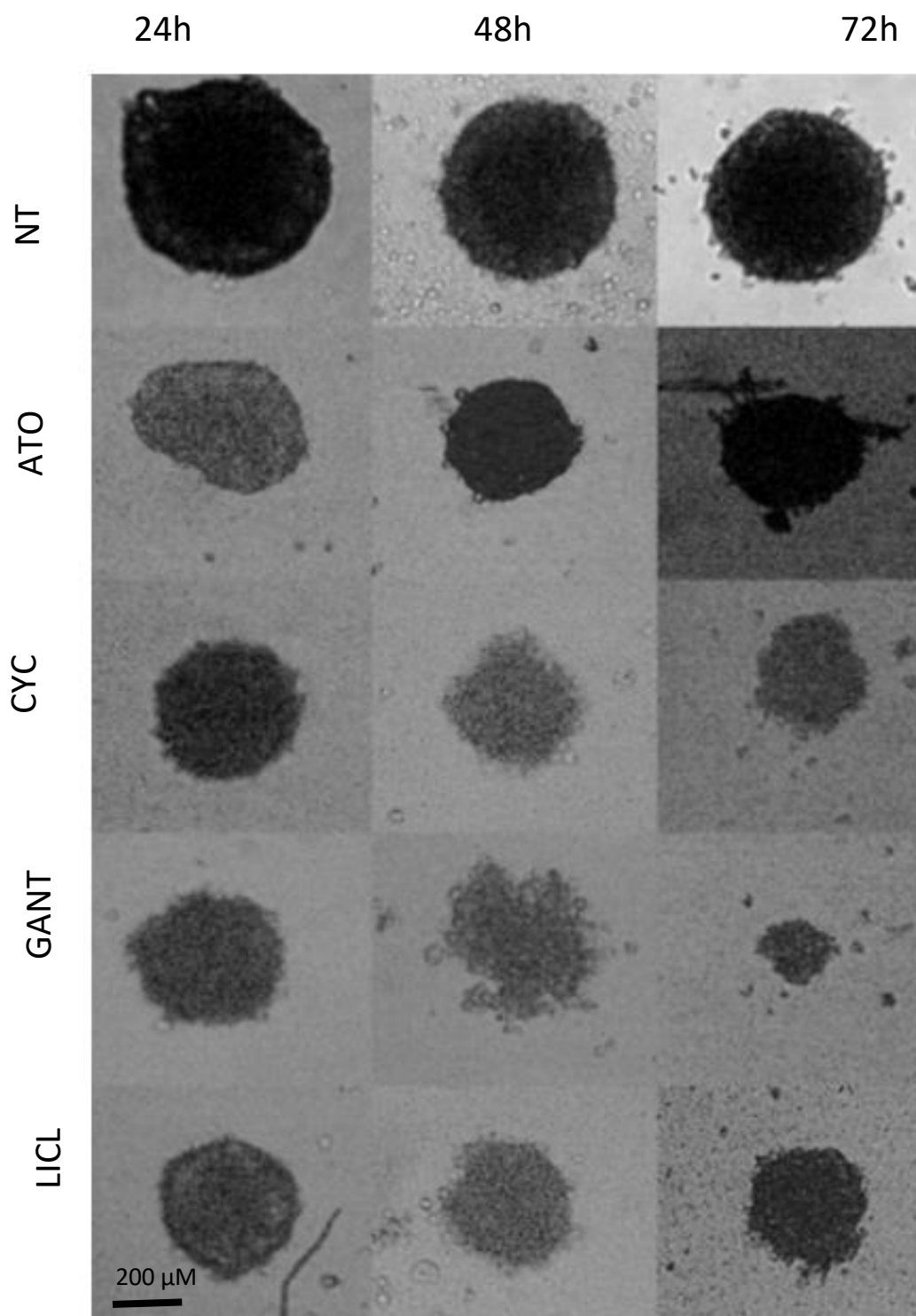
**Slika 25.** Statistička analiza okruglosti (cirkularnosti) sferoida linije FaDu u ovisnosti o tretmanima kroz 72 h, razine značajnosti u odnosu na kontrolnoj skupini. ANOVA analizom nisu dobivene normalne distribucije uzoraka stoga se za statističku obradu podataka sferoida linije FaDu koristio se Kruskal-Wallis test. Sve P-vrijednosti testova s dvosmjernom vjerojatnošću manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).

#### **4.4.2. Analiza naknadno tretiranih sferoida inhibitorima signalnog puta HH-GLI**

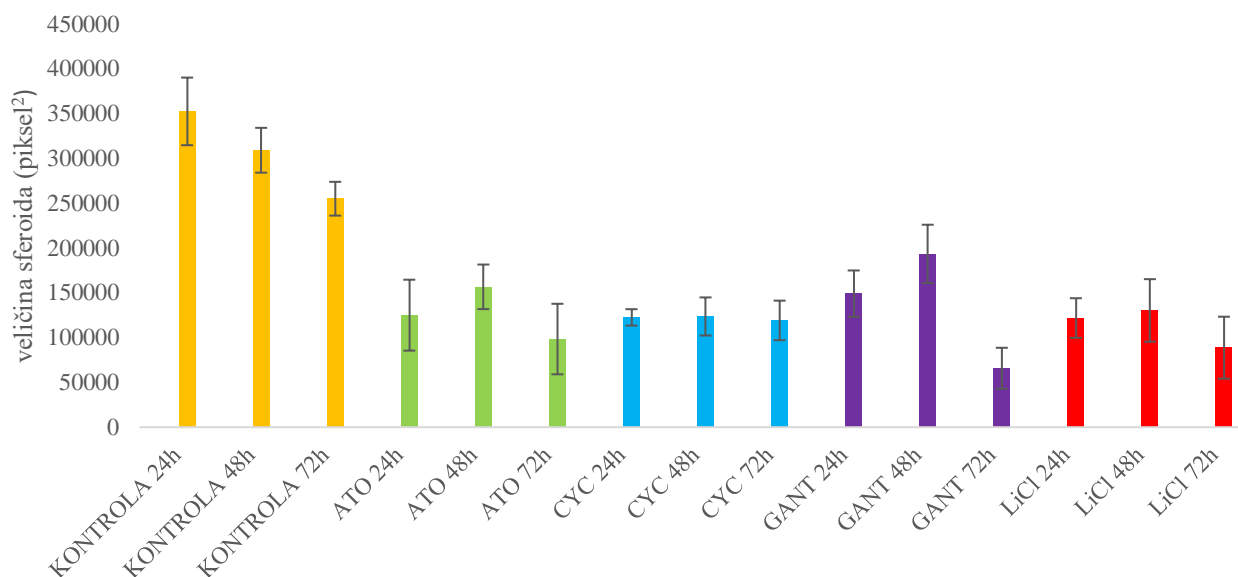
Sferoidi dvaju staničnih linija karcinoma ždrijela (FaDu i Detroit562) uzgajani su metodom viseće kapljice u jednakim uvjetima. 24 h nakon formiranja sferoida, prebačeni su male neadherentne petrijevke s pripremljenim otopinama inhibitora signalnog puta HH-GLI. Jedna petrijevka služila je kao kontrola te se u njoj nalazio 1 mL kompletnog medija. U mediju s dodatkom inhibitora – konc. inkubirani su 72 h, a nakon 24 h, 48 te 72 h su fotografirani DinoEye kamericom. Fotografije su obrađene softverom FIJI, a parametri koje sam pratila su veličina i okruglost. Statistička obrada podataka provedena je jednostrukom analizom varijance ANOVA.

##### **4.4.2.1. Analiza sferoida stanične linije Detroit562**

Već formirani sferoidi stanične linije Detroit562 naknadno tretirani inhibitorima mijenjaju veličinu ovisno o tretmanu. Svi tretmani uzrokovali su smanjenje veličine sferoida u odnosu na kontrolu, a najjači učinak imali su 72 h nakon prebacivanja sferoida u medij s inhibitorom. CYC je doveo do redukcije veličine u odnosu na kontrolu te nema promijene u veličini kroz 72 h. GANT-61 izazvao je najveće smanjenje veličine 72 h nakon tretiranja, u usporedbi s kontrolom (Slike 26 i 27). Korištene su koncentracije tretmana GANT-61 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 0,5  $\mu$ M.



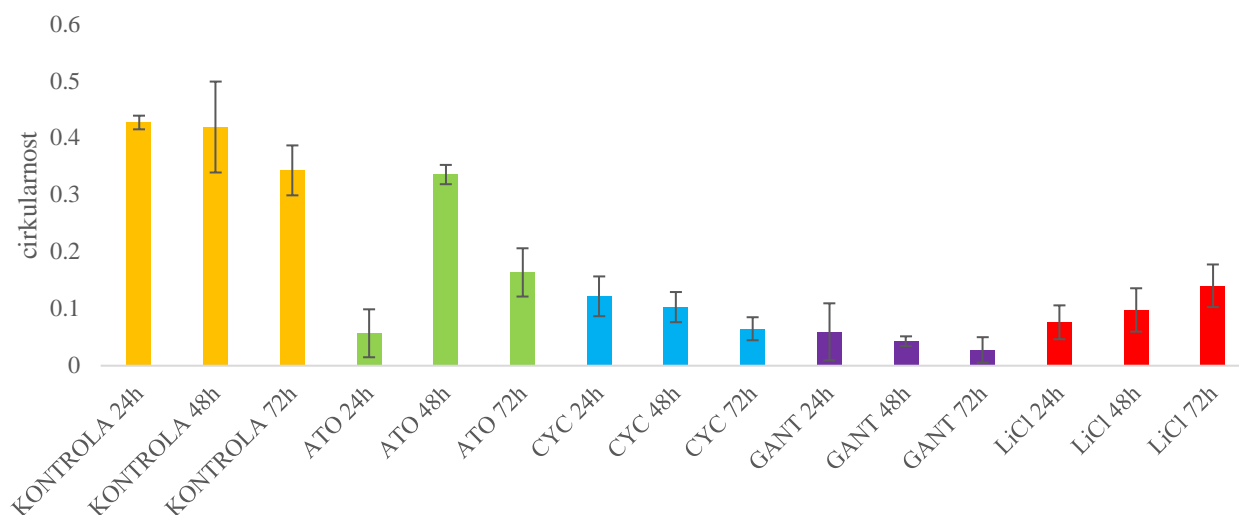
**Slika 26.** Morfološki prikaz promjene veličine naknadno tretiranih sferoida linije Detroit562 kroz 72 h. Svi tretmani uzrokovali su smanjenje veličine sferoida u odnosu na kontrolu; najjači učinak imali su 72 h nakon prebacivanja sferoida u tretman. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 0,5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).



**Slika 27.** Grafički prikaz veličine naknadno tretiranih sferoida stanične linije Detroit562 kroz 72 h. .

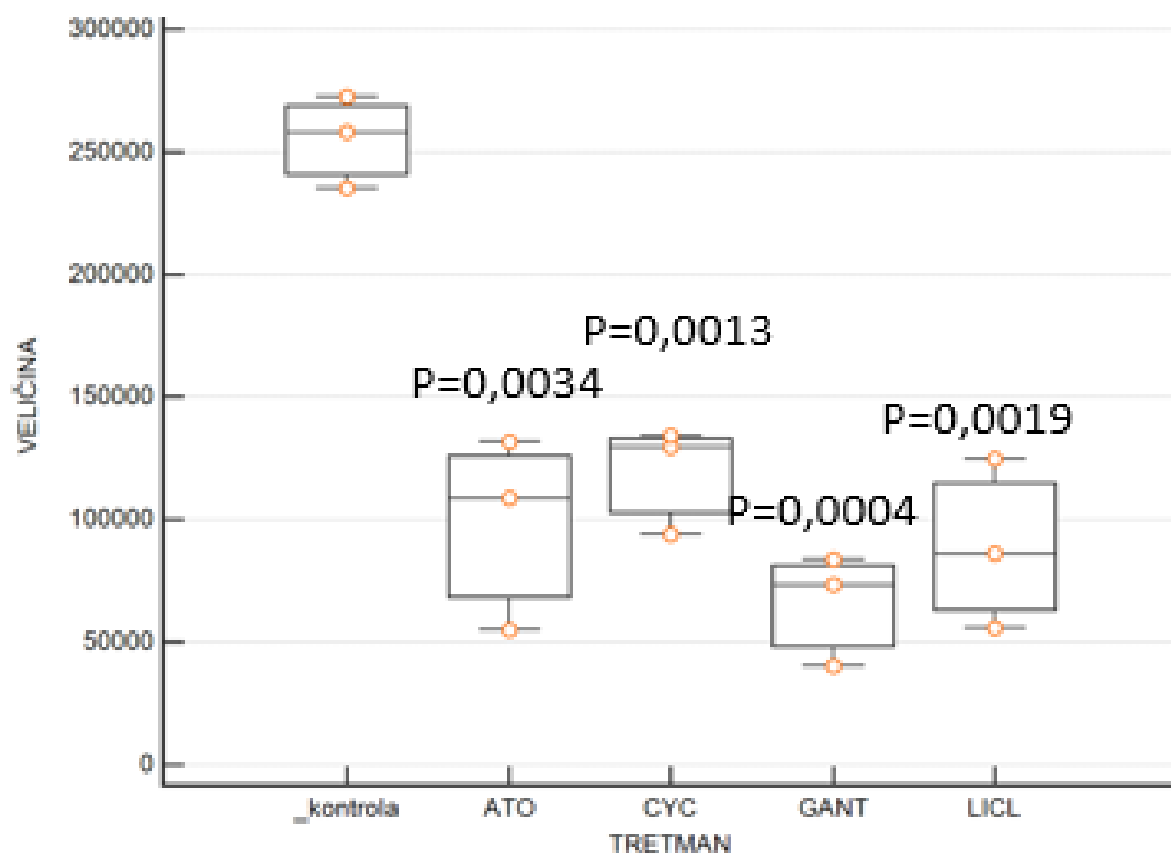
Mjerenje je provedeno softverom FIJI, a obrada podataka programom Excel. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 0,5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).

Okruglost naknadno tretiranih sferoida Detroit562 smanjuje se ovisno o tretmanu, u odnosu na kontrolu. Najjači učinak na smanjenje okruglosti pokazuje GANT-61, kroz sva 3 dana, u odnosu na kontrolu. Tretmani s GANT-61 te LiCl najjači učinak pokazuju 72 h nakon prebacivanja u tretman. Tretman s ATO najslabiji efekt ima 48 h nakon tretiranja, u usporedbi s kontrolom (Slika 28).



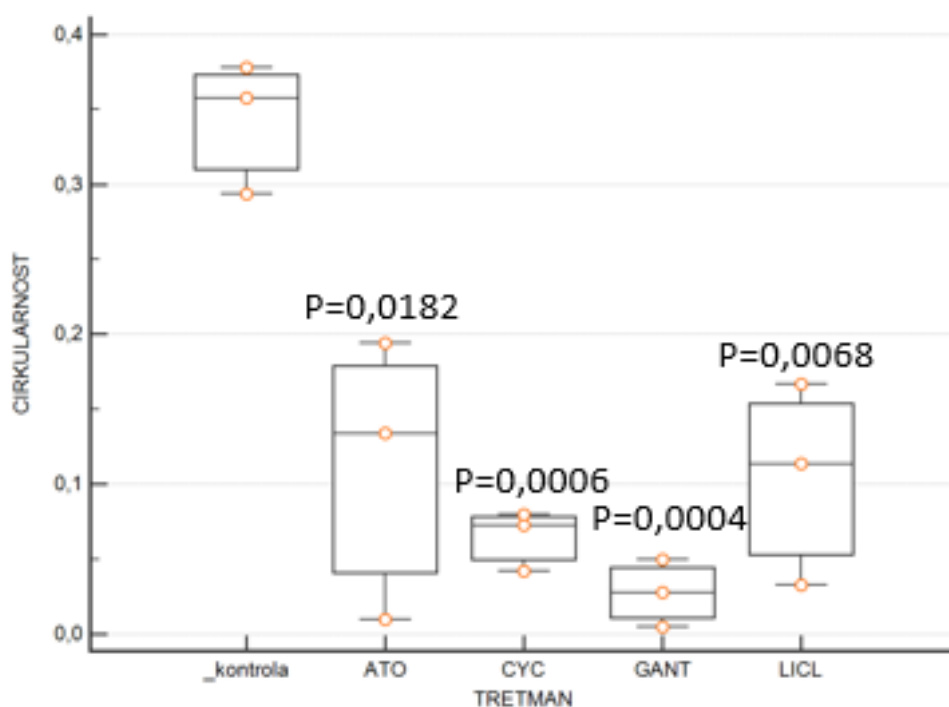
**Slika 28.** Grafički prikaz okruglosti (cirkularnosti) naknadno tretiranih sferoida stanične linije Detroit562 kroz 72 h. . Mjerenje je provedeno softverom FIJI, a obrada podataka programom Excel. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 0,5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).

Statističkom obradom dobivenih rezultata jednostrukom analizom varijance (ANOVA) s Tukey-Kramerovim *post hoc* testom utvrđeno je da naknadnim tretmanom dolazi do statistički značajnog smanjenje veličine sferoida Detroit562 72 h nakon tretiranja, u odnosu na kontrolu. Tretman GANT-61 doveo je do najizraženijeg smanjenja veličine sferoida, u odnosu na kontrolu ( $P=0,0004$ ). Tretmani CYC ( $P=0,0013$ ) i LiCl ( $P=0,0019$ ) također su statistički značajno reducirali veličinu sferoida, a najmanji učinak na smanjenje veličine imao je tretman ATO ( $P=0,0034$ ) (Slika 29).



**Slika 29.** Statistička analiza veličine naknadno tretiranih sferoida linije Detroit562 kroz 72 h. . Statistički test proveden je jednostrukom analizom varijance ANOVA. Sve P-vrijednosti testova s dvosmjernom vjerojatnošću manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 0,5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).

Najveću statistički značajnu redukciju okruglosti sferoida Detroit562 72 h nakon tretmana, uzorkovao je tretman GANT-61 ( $P=0,0004$ ), a slijedi ga tretman ciklopaminom ( $P=0,0006$ ). Najmanje statistički značajno smanjenje okruglosti naknadno tretiranih sferoida uzrokovao je tretman ATO ( $P=0,0182$ ). LiCl doveo je do statistički značajnog smanjenja okruglosti sferoida ( $P=0,0068$ ), 72 h nakon tretiranja, u odnosu na kontrolu (Slika 30).

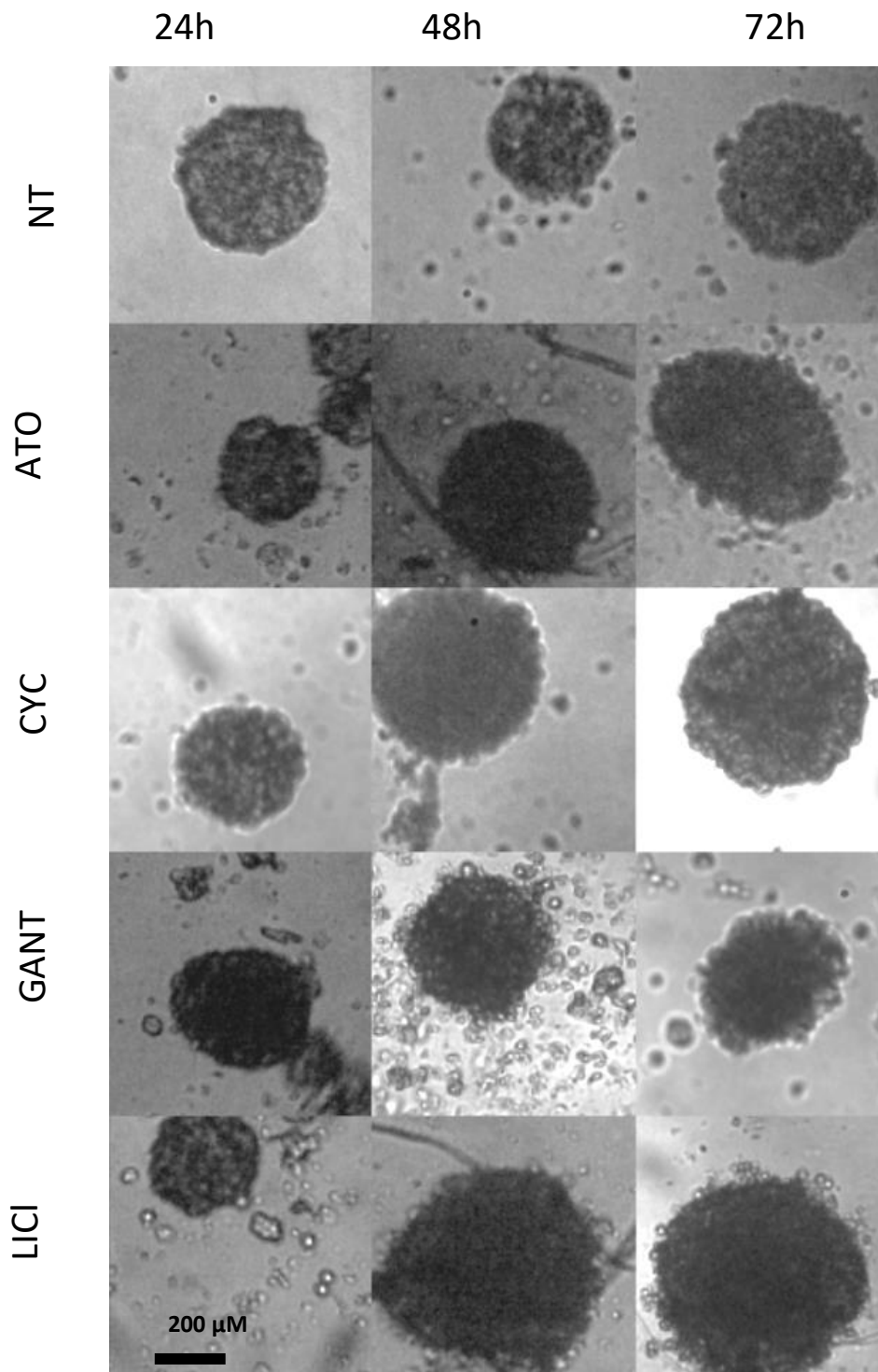


**Slika 30.** Statistička analiza okruglosti (cirkularnosti) naknadno tretiranih sferoida linije Detroit562 kroz 72 h. . Statistički test proveden je jednostrukom analizom varijance ANOVA. Sve P-vrijednosti testova s dvosmjernom vjerojatnošću manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu\text{M}$ , LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 0,5  $\mu\text{M}$ . Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).

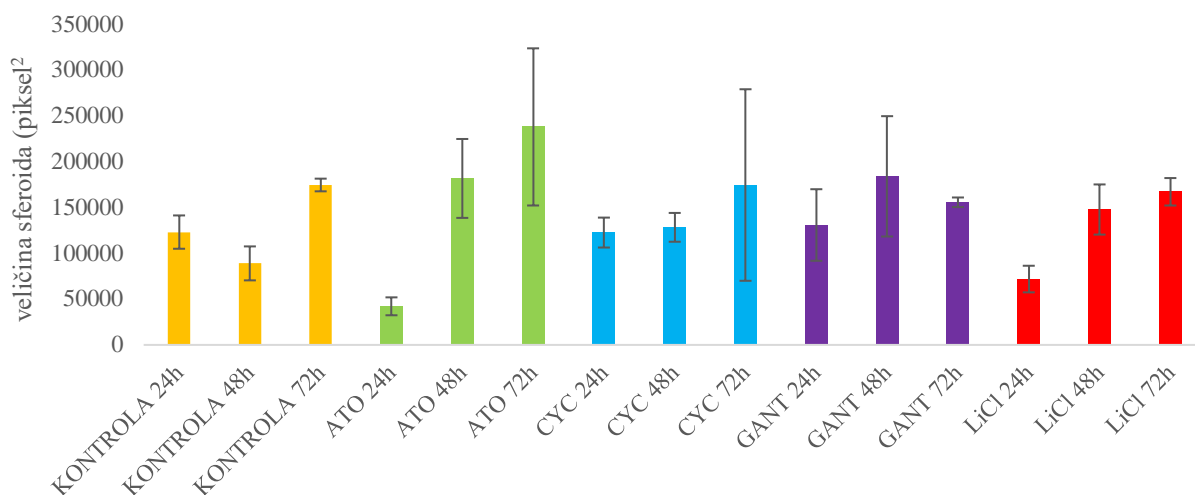
#### 4.4.2.1. Analiza sferoida stanične linije FaDu

Sferoidi linije FaDu također mijenjaju veličinu ovisno o tretmanu. 24 h nakon nasađivanja dolazi do smanjenja veličine sferoida tretiranih s ATO te LiCl, u usporedbi s kontrolom. Nakon 48 h, sferoidi tretirani s GANT-61, ATO te LiCl povećavaju veličinu, u odnosu na kontrolu. Veličina sferoida konstantna je 72 h nakon nasađivanja, u usporedbi s kontrolom, izuzev tretmana s ATO koji dovodi do povećanja veličine sferoida, a što je posljedica rasipanja stanica. Tretman CYC izražen učinak ima 72 h nakon nasađivanja, a dovodi do povećanja veličine sferoida. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 5  $\mu$ M.



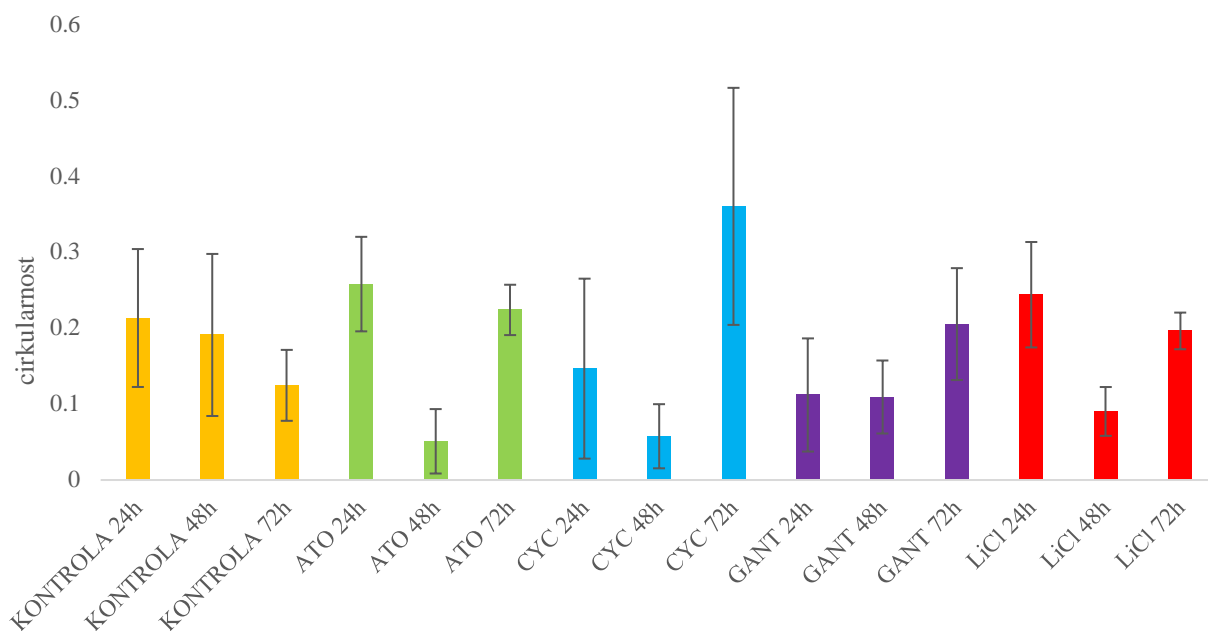


**Slika 31.** Morfološki prikaz promjene veličine naknadno tretiranih sferoida linije FaDu kroz 72 h. 24 h nakon nasađivanja, sferoidi tretirani s ATO te LiCl smanjuju veličinu, u usporedbi s kontrolom. Nakon 48 h, sferoidi tretirani s GANT-61, ATO te LiCl povećavaju veličinu, u odnosu na kontrolu. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).



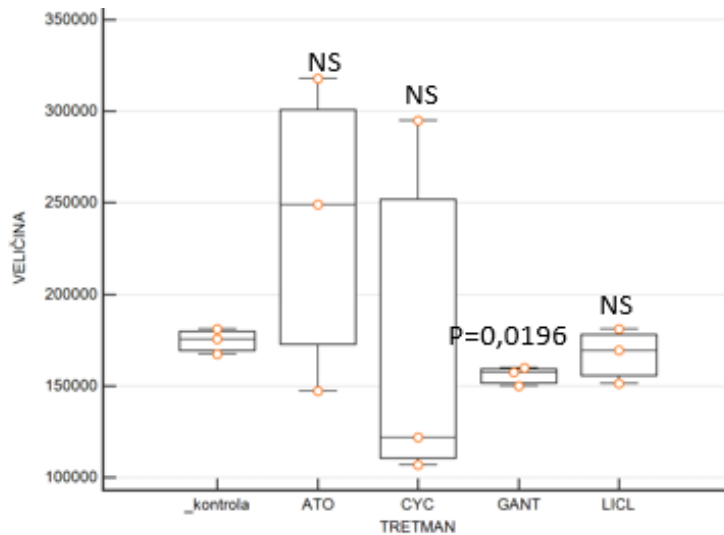
**Slika 32.** Grafički prikaz veličine naknadno tretiranih sferoida stanične linije FaDu kroz 72 h. Mjerenje je provedeno softverom FIJI, a obrada podataka programom Excel. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).

Naknadno tretirani sferoidi FaDu mijenjaju okruglost ovisno o tretmanu. Tretmani GANT-61 te CYC smanjuju okruglost sferoida 24 h i 48 h nakon tretiranja, a nakon 72 h povećavaju, u odnosu na kontrolu. Svi tretmani uzrokovali su redukciju okruglosti sferoida 48 h nakon tretiranja, a najjači učinak imao je ATO. Također, svi tretmani povećali su okruglost sferoida 72 h nakon tretiranja, u odnosu na kontrolu (Slika 33).



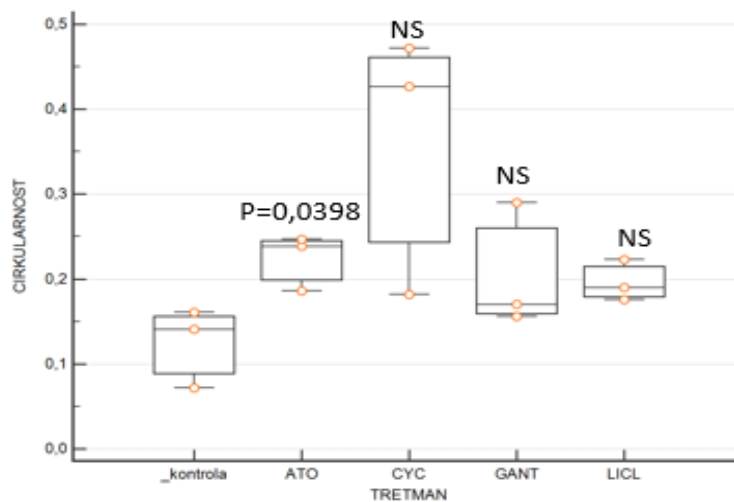
**Slika 33.** Grafički prikaz promjene okruglosti (cirkularnosti) naknadno tretiranih sferoida linije FaDu kroz 72 h. Mjerenje je provedeno softverom FIJI, a obrada podataka programom Excel. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).

Jednostrukom analizom varijance s Tukey-Kramerovim *post hoc* testom pokazalo se kako promijene u veličini sferoida FaDu koji su naknadno tretirani nisu statistički značajne. Izuzetak je tretman s GANT-61 koji je doveo do statistički značajnog smanjenja veličine sferoida u odnosu na kontrolu ( $P= 0,0196$ ) 72 h nakon tretiranja (Slika 34).



**Slika 34.** Statistička analiza veličine naknadno tretiranih sferoida linije FaDu kroz 72 h. Statistički test proveden je jednostrukom analizom varijance ANOVA. Sve P-vrijednosti testova s dvosmjernom vjerojatnošću manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).

Naknadno tretiranje sferoida FaDu nije dovelo do statistički značajnog smanjenja okruglosti sferoida, izuzev tretmana s ATO. Navedeni tretman statistički značajno je povećao okruglost sferoida, 72 h nakon tretiranja, u odnosu na kontrolu ( $P=0,0398$ ; Slika 35).



**Slika 35.** Statistička analiza okruglosti (cirkularnosti) naknadno tretiranih sferoida linije FaDu u ovisnosti o tretmanima kroz 72 h. Statistički test proveden je jednostrukom analizom varijance ANOVA. Sve P-vrijednosti testova s dvosmjernom vjerojatnošću manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Korištene su koncentracije tretmana GANT-61: 10  $\mu$ M, LiCl: 20 mM, CYC: 2 ng/mL te ATO: 5  $\mu$ M. Kratice: GANT-61 (GLI-antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin), ATO (arsenov(III)oksid).

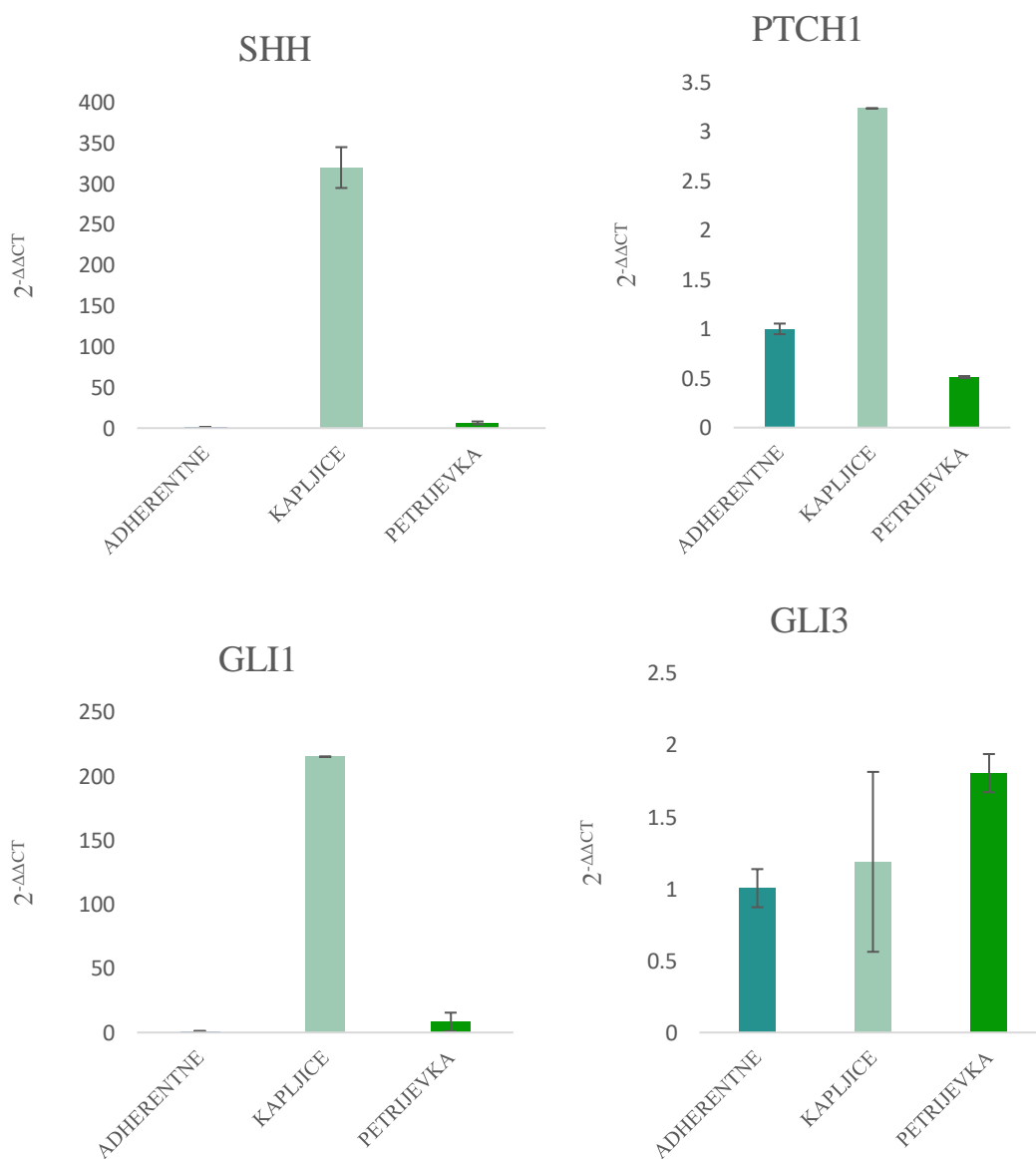
Zaključno, usporedbom parametara veličine i okruglosti sferoida, obje stanične obje stanične linije uzgajane kao sferoidi nakon tretmana inhibitorima mijenjaju svoju veličinu i okruglost, u odnosu na kontrolu. Sferoidi koji su se formirali direktno u mediju s inhibitorima povećavaju svoju veličinu, a smanjuju okruglost, kroz 72 h. Veličina i okruglost mijenjaju se ovisno o tretmanu, a učinak je najizraženiji 72 h nakon rasta u formiranju. Do povećanja veličine i smanjenja okruglosti dolazi zbog većeg broja individualnih stanica koje se nisu agregirale u sferoid već ostaju odvojene od sferoida. S druge strane, tretman sferoida nakon formiranja dovodi do smanjenja veličine sferoida, koja ovisi o tipu inhibitora i duljini tretmana. Pretpostavka je da do smanjenja veličine sferoida dolazi zbog odumiranja stanica u sferoidu.

#### **4.5. Analiza ekspresije gena *SHH*, *PTCH1*, *GLI1*, *GLI2*, *GLI3***

Nakon uzorkovanja sferoida obje stanične linije koji su formirani u mediju s inhibitorima te onih koji su bili naknadno tretirani, izolirala sam RNA te izmjerila dobivene koncentracije. Također, RNA sam izolirala i iz uzoraka adherentnih stanica obje stanične linije. Zatim sam provela reverznu transkripciju u svrhu dobivanja cDNA, a potom qPCR. Na temelju mjerenja parametara sferoida, čini se da su sferoidi Detroit562 osjetljiviji na inhibitore. S obzirom na to da RNA koju sam izolirala iz istih te adherentnih stanica nije bila dobre kvalitete niti qPCR nije uspješno proveden. RNA dobivena iz adherentnih stanica i sferoida linije FaDu bila je dobre kvalitete, stoga će rezultati qPCR biti prikazani samo za ovu staničnu liniju. Izuzetak je tretman s ATO koji je također izazvao veliko oštećenje RNA stoga nije bilo moguće provesti daljnje analize. Promjene genske ekspresije kao odgovor na inhibitore provjerene su statističkim t-testom u programu MedCalc. Vrijednosti  $p < 0,05$  smatrane su statistički značajnima.

Prvo sam usporedila razinu ekspresije gena *SHH*, *PTCH1*, *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* u netretiranim uvjetima u sva tri uvjeta uzgoja stanica. Prilikom uzgoja stanica u visećim kapljicama dolazi do pojačane aktivnosti signalnog puta HH-GLI u odnosu na adherentne stanice, što se očituje pojačanom ekspresijom liganda SHH te gena *PTCH1* i *GLI1*. Navedeni osim što sudjeluju u prijenosu signala, također su i transkripcijske mete samog signalnog puta te se koriste kao mjera aktivnosti signalnog puta. *GLI3* uglavnom djeluje kao inhibitor signalnog puta pa nije začuđujuće da nije došlo do promjene njegove ekspresije u odnosu na adherentne stanice.

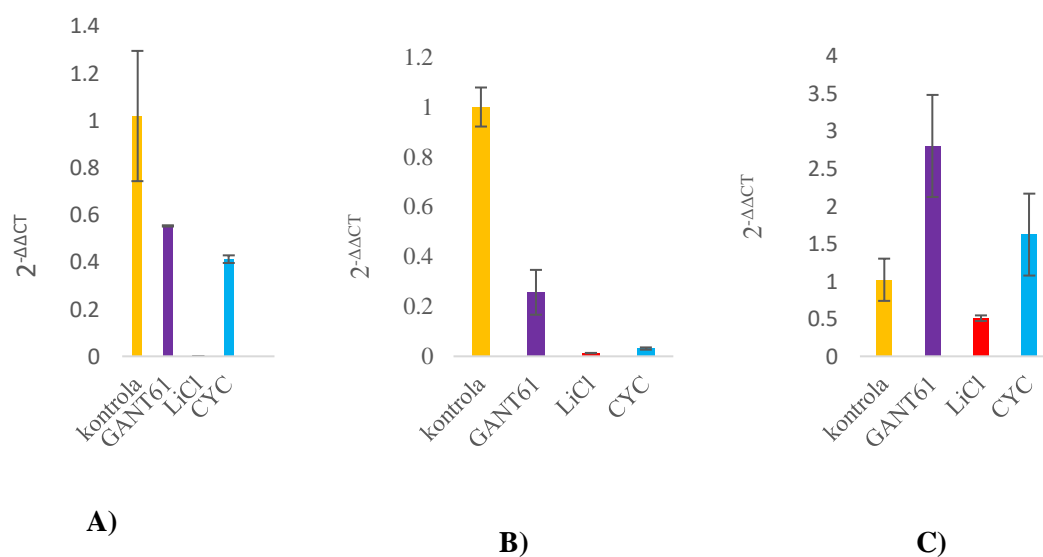
Međutim, formirane sfere koje se uzgajaju u petrijevkama smanjuju aktivnost signalnog puta HH-GLI, što se vidi iz smanjenja ekspresije *SHH*, *PTCH1* i *GLI1* te povećanja *GLI3* (Slika 34). Ekspresija *GLI2* nije detektirana niti u jednom uzorku stoga nije niti prikazana, a to je u skladu s objavljenim rezultatima na ovim staničnim linijama (Zubčić i sur. 2020).



**Slika 34.** Ekspresija gena *SHH*, *PTCH1*, *GLI1* i *GLI3* u adherentnim stanicama linije FaDu, sferoidima u visećim kapljicama te sferoidima uzgajanim u petrijevkama iste stanične linije. Analiza genske ekspresije provedena je pomoću qPCR, a kao referentni gen korišten je *RPLP0*.

#### 4.5.1. Ekspresija gena *SHH* u adherentnoj staničnoj liniji FaDu te sferoidima

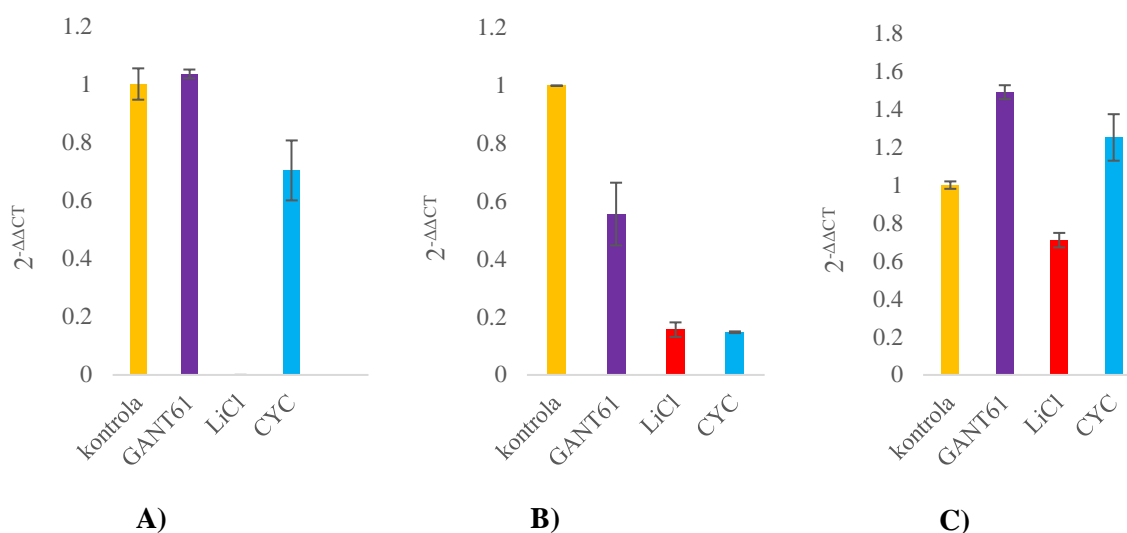
Ligand *SHH* najviše je eksprimiran u kontrolnoj skupini adherentnih stanica što znači da je signalni put HH-GLI aktivan. Do smanjenja ekspresije dolazi u tretmanima s GANT-61 ( $P=0,0145$ ) te CYC ( $P=0,0058$ ), dok ekspresija u potpunosti nestaje pri tretmanu s LiCl, u odnosu na kontrolu. Isti trend može se vidjeti i kod tretmana stanica tijekom formiranja sferoida, gdje je ekspresija *SHH* visoka u kontrolnim stanicama, a do smanjenja dolazi kod uzoraka tretiranih inhibitorima, s tim da je kao i kod adherentnih stanica najveće smanjenje kod tretmana LiCl ( $P<0,0001$ ). S druge strane, stanice koje su formirale sferoide, a tretirane su nakon toga, pokazuju drugačiji odgovor: nakon tretmana GANT-61 ( $P=0,0040$ ) dolazi do povećanja ekspresije *SHH* u odnosu na kontrolne stanice te smanjenja nakon tretmana LiCl ( $P=0,0115$ ).



**Slika 34.** Ekspresija gena *SHH* u adherentnim stanicama linije FaDu (A) nakon tretiranja inhibitorima signalnog puta HH-GLI, u sferoidima tretiranim tijekom formiranja sfera (B) te u sferoidima tretiranim nakon formiranja iste stanične linije (C). Kao referentni gen korišten je *RPLP0*. Kratice: GANT-61 (Gli antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin).

#### 4.5.2. Ekspresija gena *PTCH1* u adherentnoj staničnoj liniji FaDu te sferoidima

Koreceptor *PTCH1* eksprimiran je su svim istraživanim skupinama, a ekspresija se smanjuje/povećava ovisno o tretmanu. Inhibitor GANT-61 dovodi do pojačanja ekspresije *PTCH1* u naknadno tretiranim sferoidima ( $P < 0,0001$ ), dok mu se ekspresija smanjuje u sferoidima koji su formirani direktno u tretmanu ( $P = 0,0005$ ). LiCl dovodi do smanjenja ekspresije *PTCH1* u sferoidima koji su rasli u mediju s inhibitorom ( $P < 0,0001$ ) kao i u naknadno tretiranim sferoidima ( $P = 0,0001$ ) u odnosu na kontrolu, a potpuno nestaje u adherentnim stanicama. CYC adherentnim stanicama ( $P = 0,0033$ ) te sferoidima u formiranju ( $P < 0,0001$ ) smanjuje ekspresiju *PTCH1*, dok je u naknadno tretiranih sferoida ona pojačana, u usporedbi s kontrolom ( $P = 0,0077$ ).



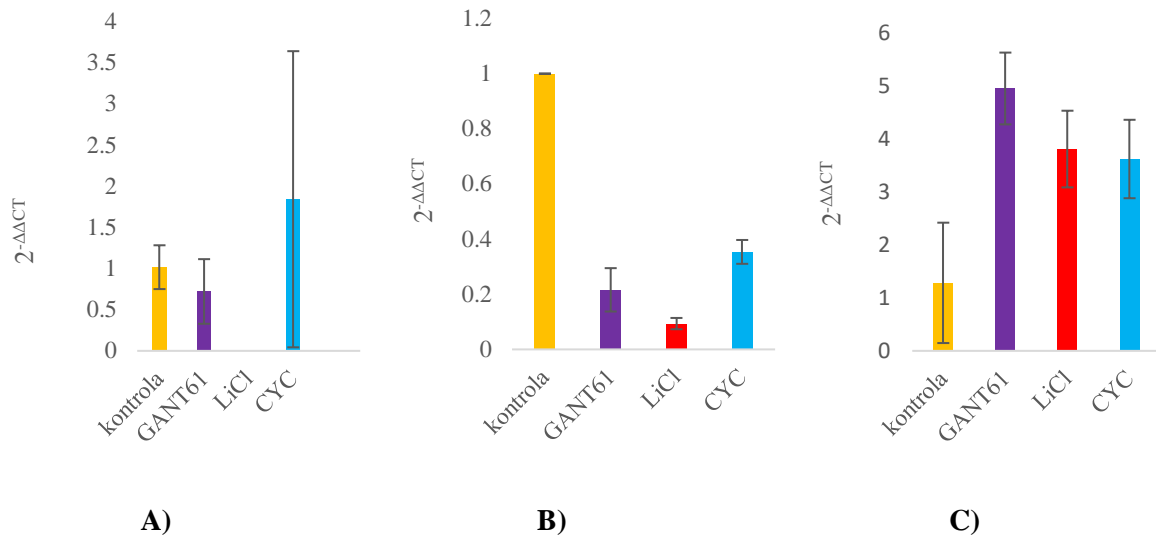
**Slika 35.** Ekspresija gena *PTCH1* u adherentnim stanicama linije FaDu (A) nakon tretiranja inhibitorima signalnog puta HH-GLI, u sferoidima tretiranim tijekom formiranja sfera (B) te u sferoidima tretiranim nakon formiranja iste stanične linije (C). Kao referentni gen korišten je *RPLP0*. Kratice: GANT-61 (Gli antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin).

#### 4.5.3. Ekspresija gena *GLII* u adherentnoj staničnoj liniji FaDu te sferoidima

Gen *GLII* najveću ekspresiju pokazao je u adherentnim stanicama tretiranih CYC ( $P = 0,3286$ ), ali ovaj rezultat nije se pokazao statistički značajnim. U sferoidima koji su rasli u mediju s inhibitorima ekspresija *GLII* pada, ovisno o tretmanu; sva tri inhibitora smanjuju ekspresiju *GLII*, s tim da GANT-61 ( $P < 0,0001$ ) i LiCl ( $P < 0,0001$ ) uzrokuju najzamjetnije smanjenje ekspresije, u odnosu na kontrolu.



U naknadno tretiranim sferoidima, ekspresija raste u svim tretmanima, u usporedbi s kontrolom, što znači da isti nisu djelovali na utišavanje signalnog puta HH-GLI. Na adherentne stanice LiCl djelovao je citotoksično te zbog toga nije bilo moguće izolirati dobru RNA i provjeriti ekspresiju GLI1 u istima.

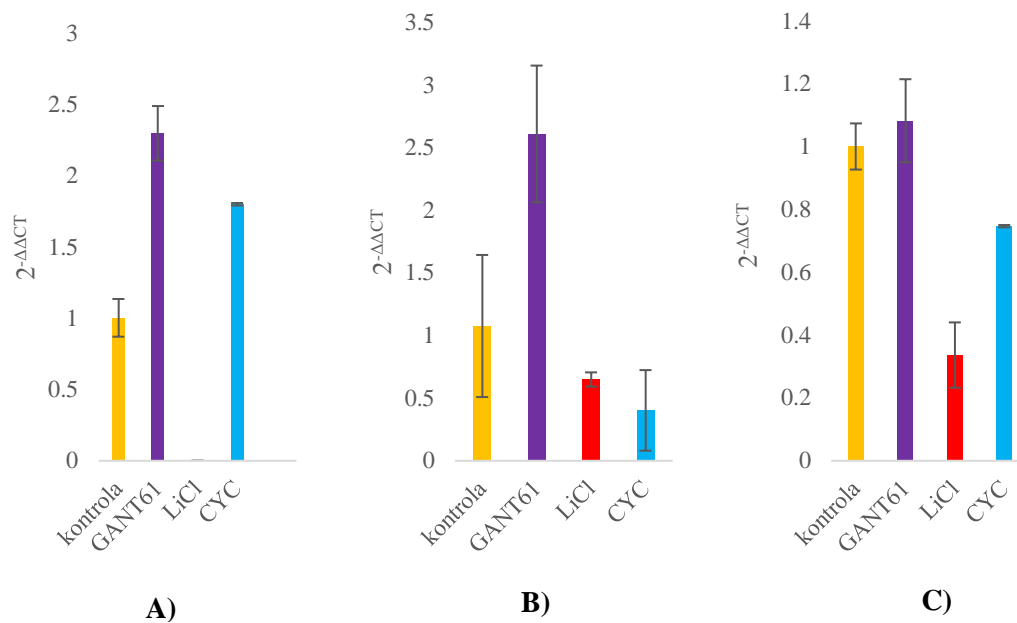


**Slika 36.** Ekspresija gena *GLI1* u adherentnim stanicama stanične linije FaDu (A) nakon tretiranja inhibitorima signalnog puta HH-GLI, u sferoidima tretiranim tijekom formiranja sfera (B) te u sferoidima tretiranim nakon formiranja iste stanične linije (C). Kao referentni gen korišten je *RPLP0*. Kratice: GANT-61 (Gli antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin).

#### 4.5.3. Ekspresija gena *GLI2* i *GLI3* u adherentnoj staničnoj liniji FaDu te sferoidima

Ekspresija gena *GLI2* nije ustanovljena, stoga se prikazuju rezultati ekspresije gena *GLI3*.

Gen *GLI3* u adherentnim stanicama pokazuje pojačanu ekspresiju pri tretmanima GANT-61 ( $P=0,0002$ ) te CYC ( $P=0,0001$ ), dok pri tretmanu LiCl nema ekspresije. Također, GANT-61 uzrokuje pojačanu ekspresiju *GLI3* ( $P=0,0088$ ), u usporedbi s kontrolom, kod sferoida koji su rasli u formiranju. U naknadno tretiranih sferoida, inhibitori LiCl ( $P=0,0002$ ) te CYC ( $P=0,0002$ ) smanjenju ekspresiju *GLI3*, u odnosu na kontrolu.



**Slika 37.** Ekspresija gena *GLI3* u adherentnim stanicama stanične linije FaDu (A) nakon tretiranja inhibitorima signalnog puta HH-GLI, u sferoidima tretiranim tijekom formiranja sfera (B) te u sferoidima tretiranim nakon formiranja iste stanične linije (C). Kao referentni gen korišten je *RPLP0*. Kratice: GANT-61 (Gli antagonist), LiCl (litijev klorid), CYC (ciklopamin).

## 5. RASPRAVA

Dvodimenzionalne stanične kulture (2D) čest su alat u istraživanjima malignih oboljenja jer su jednostavne za uspostavu, održavanje te interpretaciju rezultata. Ipak, stanice koje rastu u jednom sloju, zbog promijenjene ekspresije gena i proteina, metabolizma te gubitka polarnosti, ne imitiraju uvjete *in vivo*. Također, stanice koje rastu u jednom sloju imaju jednak i neograničen pristup kisiku i nutrijentima, što nije karakteristika tumorskih stanica *in vivo*. Mnogi potencijalni novi lijekovi koji se ispituju na adherentnim staničnim kulturama *in vitro* nisu uspješni kada se testiraju u živim sustavima. Uvođenje 3D staničnih modela kao međukoraka u testiranju lijekova prije primjene na živim organizmima postaje sve zanimljivije u pretkliničkim ispitivanjima. Uz navedeno, rastuća otpornost na postojeće terapije, kao i molekularni mehanizmi njenog nastanka, bili su neki od razloga uspostave trodimenzionalnih staničnih kultura (Białkowska i sur. 2020). Jedna od metoda uspostave 3D kulture je metoda viseće kapljice (eng. *hanging drop*) koja je korištena u izradi diplomskog rada. Ova metoda pripada skupini 3D kultura bez nosača, a temelji se na spontanoj agregaciji stanica u sferoid, tj. mikrotumor. Takve stanične nakupine zaštićene su od anoikisa te bogate CSC, što doprinosi procesu metastaziranja (Braunholz i sur. 2016).

Cilj je ovog diplomskog rada bio uspostaviti 3D staničnu kulturu dviju staničnih linija karcinoma glave i vrata (FaDu i Detroit562), morfološki ih analizirati, tretirati inhibitorima signalnog puta HH-GLI, provjeriti ekspresiju ciljnih gena kao odgovor na tretmane te usporediti rezultate s 2D kulturom. Prvi je korak bio optimizacija protokola za uspostavu 3D sferoidne kulture, nakon čega je uslijedila morfološka analiza formiranih sferoida. Tijekom optimizacije pratila sam koliki je optimalni broj stanica za nasađivanje, koliko brzo se sferoidi formiraju i koliko su stabilni kroz 72 h rasta u kulturi. Linija FaDu pokazala se povoljnijom za uspostavu 3D stanične kulture jer tvori jednolikije i veće, dok je linija Detroit562 tvorila rastresitije sferoide. U drugim istraživanjima, uspostavom sferoidne kulture, najčvršće sferoide tvorila je stanična linija FaDu, u odnosu na ostale korištene linije. Pritom je dokazana visoka bazalna ekspresija EGFR te autokrina aktivacija ovog puta (Braunholz i sur. 2016; Kadletz i sur. 2015). Nakon uspješne optimizacije protokola za uspostavu 3D kulture te njenog nasađivanja, uslijedilo je tretiranje formiranih sferoida inhibitorima signalnog puta HH-GLI. Pretpostavka ovog rada bila je da će postojati razlika ovisno o tome tretiraju li se stanice tijekom formiranja sferoida ili nakon što su sferoidi već formirani.

Naime, prodiranje spojeva u sferoide slabije je nego djelovanje na adherentne stanice ili stanice u suspenziji, tako da se očekivao različiti učinak spojeva u ova dva modela. Kao kontrolu koristila sam adherentne stanice, na kojima je utjecaj ovih spojeva na stanične kulture glave i vrata već poznat (Zubčić i sur. 2020). Spojevi koje sam koristila djeluju na različitim razinama signalne kaskade HH-GLI. Ciklopamin djeluje na protein SMO koji je na membranskom dijelu signalne kaskade, LiCl na kinazu GSK3 $\beta$  koja se nalazi u citoplazmi i regulira aktivnost proteina GLI, a ATO i GANT-61 na transkripcijske faktore GLI koji djeluju u jezgri. Prilikom formiranja sferoida u pristustvu različitih tretmana, kod obje stanične linije, vidljivo je povećanje veličine sferoida, u odnosu na kontrolu. Pri tome, GANT-61 i LiCl postižu najveće povećanje veličine sferoida u obje linije. Ipak, sferoidi Detroit562 osjetljiviji su na tretman GANT-61, dok su sferoidi FaDu osjetljiviji na tretman LiCl, što je zabilježeno i u adherentnim stanicama (Zubčić i sur. 2020). Ono što je također zajedničko sferoidima obje linije je to da je efekt tretmana najizraženiji 72 h nakon nasađivanja. Povećanje veličine sferoida posljedica je rasipanja stanica te je proporcionalno duljini trajanja tretmana jer stanice koje su tretirane inhibitorima kroz duži vremenski period pokazuju rastresitije sferoide. Sferoidi naknadno tretirani inhibitorima pokazuju obratan efekt na veličinu; svi tretmani doveli su do redukcije veličine, a GANT-61 je i ovdje pokazao najjači učinak. Ovaj uočeni efekt moguća je posljedica odumiranja stanica na površini sferoida, zbog čega dolazi do smanjenja veličine. GANT-61 pokazao se najučinkovitijim i u tretiranju sferoida stanica karcinoma prostate, u odnosu na druge inhibitore. Tretman je doveo do smanjenja populacije CSC te opadanja njihove sposobnosti samoobnavljanja, a najjači učinak zabilježen je 72 h nakon tretiranja (Tong i sur. 2018). Novi potencijalni inhibitor signalnog puta HH-GLI, ATO, kod sferoida FaDu pokazao je najjači efekt na povećanje veličine sferoida 72 h nakon tretiranja. Schleicher i sur. (2017) tretirali su sferoide rabdiosarkoma kombinacijom inhibitora LiCl i ATO što je dovelo do povećanja sferoida kao posljedice njihovog raspadanja (Schleicher i sur. 2017).

Drugi parametar koji sam pratila bila je okruglost sferoida; u obje stanične linije tretirane inhibitorima puta Hedgehog tijekom formiranja sferoida dolazi do smanjenja okruglosti sferoida kao posljedice tretmana. Navedeno je u korelaciji s povećanjem veličine kao posljedicom rasipanja stanica. Za sferoide Detroit562 najjači efekt imali su tretmani inhibitorima GANT-61 te LiCl, a u sferoidima FaDu inhibitorom ATO.

S obzirom na to da su inhibitori imali izražen utjecaj na sferoide Detroit562, iz njih nije bilo moguće izolirati kvalitetnu RNA. Zbog toga je aktivnost signalnog puta HH-GLI na razini ekspresije gena provjerena u sferoidima FaDu te adherentnim stanicama iste linije.

Usporedba netretiranih stanica FaDu u tri različita uvjeta rasta pokazala je različitu bazalnu aktivnost signalnog puta HH-GLI. Ekspresija *SHH*, *PTCH1*, *GLI1* i *GLI3* detektirana je u adherentnim stanicama, dok se ekspresija *GLI2* nije mogla detektirati. U odnosu na adherentne stanice, stanice u sferoidima u visećim kapljicama pokazuju aktivaciju signalnog puta HH-GLI, što se očituje povećanjem ekspresije *SHH*, *PTCH1* i *GLI1*. Upravo se ekspresije *PTCH1* i *GLI1* smatraju markerima aktivnosti ovog signalnog puta jer su ova dva gena direktne transkripcijske mete proteina GLI. Sfere koje su prebačene u neadherentne petrijevke i tamo uzgajane kao sferoidi gube to povećanje te se ekspresija ispitivanih gena smanjuje, s izuzetkom *GLI3*, koja se povećava. Kako *GLI3* djeluje uglavnom kao inhibitor signalnog puta za pretpostaviti je da dolazi do utišavanja puta uslijed djelovanja *GLI3*. Međutim, ovu tezu trebalo bi ispitati na proteinskoj razini, praćenjem ekspresije proteina *GLI3*, odnosno njegove aktivatorske i represorske forme.

Ekspresija gena *SHH* te *PTCH1* u kontrolama adherentnih stanica te sferoidima koji su rasli mediju s inhibitorima GANT-61 i CYC, smanjuje se, dok pri tretmanu s LiCl nema ekspresije *SHH* u adherentnim stanicama. Ovo opažanje u korelaciji je s morfološkim promjenama sferoida jer su ti isti tretmani najviše utjecali na povećanje veličine te smanjenje okruglosti sferoida. Također, tretman inhibitorom GANT-61 dovodi do najizraženijeg smanjenja ekspresije gena *SMO*, *PTCH1*, *PTCH2*, *GLI1* te *GLI2* u sferoidima karcinoma prostate, u usporedbi s drugim korištenim tretmanima. Zanimljivo, iz navedenih sferoida nije bilo moguće izolirati dobru RNA *SHH* te ekspresija liganda *SHH* nije bila detektirana. Uočeno upućuje na jaku inhibiciju autokrine aktivacije signalnog puta HH-GLI tretmanom GANT-61, što znači da navedeni inhibitor onemogućava izlučivanje liganda *SHH* od strane tumorske stanice te nj vezanje za istu. (Tong i sur. 2018). Također, svi tretmani smanjuju ekspresiju oba gena (*SHH*, *PTCH1*), a time i aktivnost puta, u sferoidima stanica karcinoma glave i vrata. Iako je učinak ciklopamina na morfološke parametre bio neznan, provjerom genske ekspresije vidi se kako i on utišava signalni put snižavajući ekspresiju *SHH* te *PTCH1* u spomenutim skupinama. Suprotno tomu, u adherentnim stanicama doveo je do pojačane ekspresije *GLI1*, u odnosu na kontrolu što znači da nije utišao aktivnost signalnog puta. U naknadno tretiranim sferoidima, jedino tretman LiCl blago snižava ekspresiju *SHH*, dok ostali tretmani čak blago povećavaju ekspresiju *SHH* i *PTCH1*.

Kako je aktivnost signalnog puta generalno snižena u ovim uvjetima rasta, nije iznenađujuće da je učinak inhibitora manji. S druge strane, LiCl je kod sferoida koji su tretirani tijekom formiranja uzorkovao najveće sniženje ekspresije *GLI1*. Djelovanje inhibitora LiCl na sniženje ekspresije *GLI1* zabilježeno je i u sferoidima rabdomiosarkoma gdje je pojačana fosforilacija kinaze  $GSK3\beta$  praćena ELISA testom (Schleicher i sur. 2017).

Promjene genske ekspresije *GLI3* u različitim uvjetima rasta bile su različite, u odnosu na kontrolu. Inhibitor GANT-61 uzrokovao je povećanje ekspresije *GLI3* u adherentnim stanicama te sferama koje su rasle u mediju s inhibitorima. S druge strane, LiCl i ciklopamin u većini slučajeva smanjuju njegovu ekspresiju. To bi značilo da je ekspresija *GLI3* regulirana kanonskim prijenosom signala kroz signalni put HH-GLI jer su to inhibitori koji djeluju uzvodno od GLI.

Generalno govoreći, može se zaključiti kako se ekspresija *SHH*, *PTCH1* i *GLI1*, uz manja odstupanja, mijenja i očekivano smanjuje kod adherentnih stanica i tijekom formiranja sferoida, nakon inhibicije specifičnih molekula puta. Inhibitori signalnog puta snižavaju aktivnost puta u adherentnim stanicama i kapljicama, ali se taj efekt gubi u formiranim sferama. Međutim, odgovor formiranih sferoida na spojeve je slabiji, a u nekim slučajevima i suprotan od očekivanja. Razlog tomu može biti reaktivacija *GLI3* koja koči signalni put u već formiranim sferoidima, ali i manja dostupnost inhibitora stanicama jer inhibitori ne prodiru u dubinu sferoida kad je on već formiran.

Zaključno, usporedbom djelovanja inhibitora signalnog puta HH-GLI na 2D te 3D staničnu kulturu, uviđa se veća osjetljivost adherentne kulture. Stanice koje rastu u jednom sloju pokazuju drukčiju fiziologiju, a nedostatne međustanične interakcije te interakcije stanica-izvanstanični matriks neki su od mogućih razloga manje otpornosti na inhibiciju puta (Kapałczyńska i sur. 2018). Također, pokazano je kako visoka ekspresija markera matičnosti (*SOX1*, *Nanog*) u sferoidima HNSCC, u odnosu na adherentnu kulturu, dovodi do otpornosti na tretman cisplatinom (Melissaridou i sur. 2019). Sferoidi koji su tretirani inhibitorima u fazi svog formiranja bili su osjetljiviji su na iste, u odnosu na naknadno tretirane sferoide. Medij s inhibitorima lako je dostupan stanicama koje formiraju sferoid, dok je difuzija i djelovanje inhibitora smanjeno u već formiranim.

Ovim istraživanjem uspješno je uspostavljena 3D stanična kultura stanica karcinoma glave i vrata te pokazan učinak inhibitora signalnog puta HH-GLI na 2D te 3D staničnu kulturu.

Pokazalo se kako su sferoidi otporniji na inhibitore u odnosu na adherentne stanice, a naročito sferoidi tretirani nakon formiranja, što je slučaj i u kliničkoj praksi. Ovi su podaci u skladu s rezultatima obrade tumora *in vivo*, u odnosu na stanične kulture (Hageman i sur. 2017).

Provedeno istraživanje ima i neka ograničenja. Prvo, ove pokuse bi bilo poželjno ponoviti na većem broju staničnih linija, tako da se u obzir uzmu i varijacije između staničnih linija. Drugo, kako su LD<sub>50</sub> doze previsoke jer izazivaju smrt 50 % stanica, bilo bi poželjno pokuse ponoviti s nižim, subletalnim dozama kako bi se mogle pratiti promjene genske ekspresije. Na kraju, bilo bi poželjno rezultate potvrditi i na razini proteina, primjerice Westernskom metodom otiska. Ovakva istraživanja značajna su u kontekstu boljeg razumijevanja molekularnih mehanizama nastanka bolesti, kao i otpornosti na dostupna liječenja. Potencijalni razvitak personaliziranog liječenja uspostavom 3D kulture stanica karcinoma pacijenata jedna je od mogućnosti, kako predviđanja tijeka bolesti, tako i samog njenog liječenja.

## 6. ZAKLJUČAK

Temeljem ovoga istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

1. Uspješno je uspostavljena 3D stanična kultura stanica karcinoma glave i vrata, staničnih linija FaDu i Detroit562.
2. Stanična linija FaDu pogodnija je za uspostavu 3D kulture, u odnosu na liniju Detroit562.
3. Signalni put HH-GLI aktivan je sferoidima i adherentnim stanicama obje stanične linije.
4. Primjernom inhibitora signalnog puta HH-GLI, aktivnost puta se utišava, pri čemu su sferoidi linije Detroit562 osjetljiviji na djelovanje istih.
5. Signalni put HH-GLI utišava se djelovanjem inhibitora u adherentnim stanicama te sferoidima koji su rasli u mediju s istima, što se očituje u sniženoj ekspresiji *SHH* i *PTCH*.
6. Sferoidi linije FaDu osjetljiviji su na djelovanje inhibitora LiCl, u usporedbi s djelovanjem GANT-61, kao i kod adherentnih stanica, što se vidi kroz povećanje veličine te smanjenje okruglosti sferoida.
7. Sferoidi FaDu otporniji su na tretmane, u odnosu na adherentne stanice (2D stanična kultura) iste linije.
8. Kod sferoida tretiranih inhibitorima u fazi formiranja učinci inhibitora bili su veći u odnosu na učinke na već formirane sferoide.



## 7. LITERATURA

- Aberger F., Kern D., Greil R., Hartmann T.N. (2012): Canonical and Noncanonical Hedgehog/GLI Signaling in Hematological Malignancies. *Vitamins and Hormones* **88**: 25–54.
- Aberger F., Ruiz i Altaba A. (2014): Context-dependent signal integration by the GLI code: The oncogenic load, pathways, modifiers and implications for cancer therapy. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **33**: 93–104.
- Amakye D., Jagani Z., Dorsch M. (2013): Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nature Medicine* **19**: 1410–1422.
- Andersen T., Auk-Emblem P., Dornish M. (2015): 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays* **4**: 133-161.
- An J., Moon J. Kim C. i sur. (2021): Integrin alpha 6 as a stemness driver is a novel promising target for HPV (+) head and neck squamous cell carcinoma. *Experimental Cell Research* **407**: 112815
- Ansari S.S., Sharma A.K., Zepp M., Ivanova E., Bergmann F., König R., Berger M.R. (2018): Upregulation of cell cycle genes in head and neck cancer patients may be antagonized by erufosine's down regulation of cell cycle processes in OSCC cells. *Oncotarget* **9**: 5797–5810.
- Araújo T.B.S. de, Rocha L. de O.S. da, Vidal M.T.A., Coelho P.L.C., Reis M.G. dos, Souza B.S. de F., Soares M.B.P., Pereira T.A., Coletta R. della, Bezerra D.P., Dias R.B., Rocha C.A.G. (2020): Gant61 reduces hedgehog molecule (Gli1) expression and promotes apoptosis in metastatic oral squamous cell carcinoma cells. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 1–19.
- Azharuddin M., Roberg K., Dhara A.K., Jain M.V., Darcy P., Hinkula J., Slater N.K.H., Patra H.K. (2019): Dissecting multi drug resistance in head and neck cancer cells using multicellular tumor spheroids. *Scientific Reports* **9**: 20066.
- Białkowska K., Komorowski P., Bryszewska M., Miłowska K. (2020): Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the most important application. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 1–17.
- Braunholz D., Saki M., Niehr F., Öztürk M., Puértolas B.B., Korschak R., Budach V., Tinhofer I. (2016): Spheroid culture of head and neck cancer cells reveals an important role of EGFR signalling in anchorage independent survival. *PLoS ONE* **11**: 9.
- Butler M. (2005): Animal cell cultures: Recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology* **68**: 283-291

- Byrne E.F., Luchetti G., Rohatgi R., Siebold C. (2018): Multiple ligand binding sites regulate the Hedgehog signal transducer Smoothed in vertebrates. *Current Opinion in Cell Biology* **51**: 81–88.
- Chai J.Y., Sugumar V., Alshawsh M.A., Wong W.F., Arya A., Chong P.P., Looi C.Y. (2021): The role of smoothed-dependent and-independent hedgehog signaling pathway in tumorigenesis. *Biomedicines* **9**: 1188.
- Chen D., Wang C.-Y. (2019): Targeting cancer stem cells in squamous cell carcinoma. *Precision Clinical Medicine* **2**: 152–165.
- Chen J.K., Taipale J., Cooper M.K., Beachy P.A. (2002): Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes and Development* **16**: 2743–2748.
- Corthell J.T. (2014): *Basic Molecular Protocols in Neuroscience: Tips, Tricks, and Pitfalls*. U: Corthell J.T. (ur.) *Reverse Transcription (RT) and Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Academic Press, Elsevier, str. 27-41
- Decarli M.C., Amaral R., Santos D.P. dos, Tofani L.B., Katayama E., Rezende R.A., Silva J.V.L. da, Swiech K., Suazo C.A.T., Mota C., Moroni L., Moraes Â.M. (2021): Cell spheroids as a versatile research platform: Formation mechanisms, high throughput production, characterization and applications. *Biofabrication* **13**: 032002.
- Dios-Figueroa G.T. de, Aguilera-Marquez J.D.R., Camacho-Villegas T.A., Lugo-Fabres P.H. (2021): 3d cell culture models in covid-19 times: A review of 3d technologies to understand and accelerate therapeutic drug discovery. *Biomedicines* **9**: 602.
- Duval K., Grover H., Han L.H., Mou Y., Pegoraro A.F., Fredberg J., Chen Z. (2017): Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology* **32**: 266–277.
- Fan Z., He L., Li M., Cao R., Deng M., Ping F., Liang X., He Y., Wu T., Tao X., Xu J., Cheng B., Xia J. (2020): Targeting methyltransferase PRMT5 retards the carcinogenesis and metastasis of HNSCC via epigenetically inhibiting Twist1 transcription. *Neoplasia* **22**: 617–629.
- Gaskell H., Sharma P., Colley H.E., Murdoch C., Williams D.P., Webb S.D. (2016): Characterization of a functional C3A liver spheroid model. *Toxicology Research* **5**: 1053–1065.
- Goričan L., Gole B., Potočnik U. (2020): Head and Neck Cancer Stem Cell-Enriched Spheroid Model for Anticancer Compound Screening. *Cells* **9**: 1707.
- Guimaraes V.S.N., Vidal M.T.A., Faro Valverde L. de, Oliveira M.G. de, Oliveira Siquara da Rocha L. de, Coelho P.L.C., Soares F.A., Freitas Souza B.S. de, Bezerra D.P., Coletta R.D., Pereira T.A., Santos J.N. dos, Gurgel Rocha C.A. (2020): Hedgehog pathway activation in oral squamous cell carcinoma: cancer-associated fibroblasts exhibit nuclear GLI-1 localization. *Journal of Molecular Histology* **51**: 675–684.

- Gutiérrez L., Stepien G., Gutiérrez L., Pérez-Hernández M., Pardo J., Pardo J., Grazú V., la Fuente J.M. de (2017): Nanotechnology in Drug Discovery and Development. *Comprehensive Medicinal Chemistry III* **1–8**: 264–295.
- Habib G.J., O’Shaughnessy A.J. (2016): The hedgehog pathway in triple-negative breast cancer. *Cancer Medicine* **5**: 2989–3006.
- Hagemann J., Jacobi C., Hahn M. (2017): Spheroid-based 3D cell cultures enable personalized therapy testing and drug discovery in head and neck cancer. *Anticancer research* **37**: 2201-2210.
- Johnson L.R. i sur (1996): Human Homolog of patched, a Candidate Gene for the Basal Cell Nevus Syndrome . *Science* (1979) **272**: 1668–1671.
- Kadletz L., Heiduschka G., Domayer J., Schmid R., Enzenhofer E., Thurnher D. (2015): Evaluation of spheroid head and neck squamous cell carcinoma cell models in comparison to monolayer cultures. *Oncology Letters* **10**: 1281–1286.
- Kapałczyńska M., Kolenda T., Przybyła W., Zajączkowska M., Teresiak A., Filas V., Ibbs M., Bliźniak R., Łuczewski Ł., Lamperska K. (2018): 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science* **14**: 910–919.
- Keysar S.B., Le P.N., Anderson R.T., Morton J.J., Bowles D.W., Paylor J.J., Vogler B.W., Thorburn J., Fernandez P., Glogowska M.J., Takimoto S.M., Sehrt D.B., Gan G.N., Eagles-Soukup J.R., Serracino H., Hirsch F.R., Lucia M.S., Thorburn A., Song J.I., Wang X.J., Jimeno A. (2013): Hedgehog signaling alters reliance on EGF receptor signaling and mediates anti-EGFR therapeutic resistance in head and neck cancer. *Cancer Research* **73**: 3381–3392.
- Khanna S., Chauhan A., Bhatt A.N., Dwarakanath B.S.R. (2020): *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*. U: Verma S.A., Singh A. (ur) Multicellular tumor spheroids as in vitro models for studying tumor responses to anticancer therapies. Academic Press, Elsevier, str. 251–268.
- Kinzler W.K. R.M.J., B.H.S., V.B. (1988): The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins. *Nature* **322**: 371–374.
- Lauth M., Bergströ Å., Shimokawa T., Toftgård R. (2007). ). Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**: 8455–8460.
- Lee Y., Kawagoe R., Sasai K., Li Y., Russell H.R., Curran T., McKinnon P.J. (2007): Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis. *Oncogene* **26**: 6442–6447.
- Levanat S., Sabol M., Musani V., Ozretić P., Trnski D. (2016): Hedgehog signaling pathway as genetic and epigenetic target in ovarian tumors. *Current Pharmaceutical Design* **23**: 73-94

- Li H., Wang W., Zhang W., Wu G. (2020): Structural insight into the recognition between Sufu and fused in the Hedgehog signal transduction pathway. *Journal of Structural Biology* **212**: 107614.
- Lu X., Wang Z., Huang H., Wang H. (2020): Hedgehog signaling promotes multidrug resistance by regulation of ABC transporters in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine* **49**: 897-906.
- Mahajan S.D., Law W.C., Aalinkeel R., Reynolds J., Nair B.B., Yong K.T., Roy I., Prasad P.N., Schwartz S.A. (2012): Nanoparticle-mediated targeted delivery of antiretrovirals to the brain. *Methods in Enzymology* **509**: 41–60.
- Melissaridou S., Wiechec E., Magan M., Jain M.V., Chung M.K., Farnebo L., Roberg K. (2019): The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer 11 *Medical and Health Sciences* 1112 *Oncology and Carcinogenesis. Cancer Cell International* **19**: 1 .
- Mille F., Thibert C., Fombonne J., Rama N., Guix C., Hayashi H., Corset V., Reed J.C., Mehlen P. (2009): The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. *Nature Cell Biology* **11**: 739–746.
- Modur V., Joshi P., Nie D. (2016): CD24 expression may play a role as a predictive indicator and a modulator of cisplatin treatment response in head and neck squamous cellular carcinoma. *PLoS ONE* **11**: e0156651.
- Nath S., Devi G.R. (2016): Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology and Therapeutics* **163**: 94–108.
- Nicolis A.S (2007): Cancer stem cells and "stemness" genes in neuro-oncology. *Neurobiology of Disease* **25**: 217-229.
- Niewiadomski P., Niedziółka S.M., Markiewicz Ł., Uśpieński T., Baran B., Chojnowska K. (2019): Gli Proteins: Regulation in Development and Cancer. *Cells* **8**: 147.
- Pak E., Segal R.A. (2016): Hedgehog Signal Transduction: Key Players, Oncogenic Drivers, and Cancer Therapy. *Developmental Cell* **38**: 333–344.
- Pan Y., Wang B. (2007): A novel protein-processing domain in Gli2 and Gli3 differentially blocks complete protein degradation by the proteasome. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 10846–10852.
- Picon H., Guddati A.K. (2020): Mechanisms of resistance in head and neck cancer. *Am J Cancer Res* **10**: 2742-2751.
- Pietrobono S., Gagliardi S., Stecca B. (2019): Non-canonical hedgehog signaling pathway in cancer: Activation of GLI transcription factors beyond smoothed. *Frontiers in Genetics* **10**: 556.
- Potkonjak A. (2019): Uloga proteina obitelji GLI u diferencijaciji stanica trofoblata. *Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb.*

- Prince M., Sivanandan R., Kaczorowski A. (2007): Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 973-978.
- Prgomet D. (2021): Head and neck carcinoma - Current possibilities and perspectives in treatment. *Lijecnicki Vjesnik* **143**: 284–293.
- Qi X, Li X. (2020): Mechanistic insights into the generation and transduction of hedgehog signaling. *Trends in biochemical sciences* **45**: 397-410.
- Riobo N.A., Haines G.M., Emerson C.P. (2006): Protein kinase C- $\delta$  and mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-1 control GLI activation in hedgehog signaling. *Cancer Research* **66**: 839–845.
- Rodrigues M.F.S.D., Miguita L., Andrade N.P. de, Heguedusch D., Rodini C.O., Moyses R.A., Toporcov T.N., Gama R.R., Tajara E.E., Nunes F.D. (2018b): GLI3 knockdown decreases stemness, cell proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology* **53**: 2458–2472.
- Rubin L.L., Sauvage F.J. de (2006): Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* **5**: 1026–1033.
- Sabol M., Trnski D., Musani V., Ozretić P., Levanat S. (2018): Role of GLI transcription factors in pathogenesis and their potential as new therapeutic targets. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 9.
- Scales S.J., Sauvage F.J. de (2009): Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends in Pharmacological Sciences* **30**: 303–312.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. (2012): Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**: 676–682.
- Schleicher S.B., Zaborski J.J., Riester R., Zenkner N., Handgretinger R., Kluba T., Traub F., Boehme K.A. (2017): Combined application of arsenic trioxide and lithium chloride augments viability reduction and apoptosis induction in human rhabdomyosarcoma cell lines. *PLoS ONE* **12**: 6.
- Sekerija M. (2021): Incidencija raka u Hrvatskoj. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak, Zagreb.
- Sigafoos A.N., Paradise B.D., Fernandez-Zapico M.E. (2021): Hedgehog/gli signaling pathway: Transduction, regulation, and implications for disease. *Cancers (Basel)* **13**(14): 3410.
- Singh R., Dhanyamraju P.K., Lauth M. (2017): DYRK1B blocks canonical and promotes non-canonical Hedgehog signaling through activation of the mTOR/AKT pathway. *Oncotarget* **8**: 833–845.

- Skoda A.M., Simovic D., Karin V., Kardum V., Vranic S., Serman L. (2018): The role of the hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* **18**: 8–20.
- Smyrek I., Mathew B., Fischer S.C., Lissek S.M., Becker S., Stelzer E.H.K. (2018): E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity. *Biology open* **8**: bio037051
- Stecca B., Mas C., Clement V., Zbinden M., Correa R., Piguet V., Beermann F., Ruiz Altaba A. (2007): Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **10**: 556
- Stecca B., Ruiz I Altaba A. (2009): A GLI1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers. *EMBO Journal* **28**: 663–676.
- Tong W., Qiu L., Qi M., Liu J., Hu K., Lin W., Huang Y., Fu J. (2018): GANT-61 and GDC-0449 induce apoptosis of prostate cancer stem cells through a GLI-dependent mechanism. *Journal of Cellular Biochemistry* **119**: 3641–3652.
- Wang T., Wang Y.X., Dong Y.Q., Yu Y.L., Ma K. (2020): Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 3 presents a cancer promotive function in head and neck squamous cell carcinoma via regulating epithelial-mesenchymal transition. *Archives of Oral Biology* **113**: 104711.
- Wang X., Fang Z., Wang A., Luo C., Cheng X., Lu M. (2017): Lithium suppresses Hedgehog signaling via promoting ITCH E3 ligase activity and Gli1-SUFU interaction in PDA cells. *Frontiers in Pharmacology* **8**: 820 .
- Weissman A.M., Yang Y., Kitagaki J., Sasiela C.A., Beutler J.A., O’Keefe B.R. (2008): Inhibiting Hdm2 and ubiquitin-activating enzyme: targeting the ubiquitin conjugating system in cancer. *Ernst Schering Foundation symposium proceedings* **1**: 171-190.
- Zubčić V., Rinčić N., Kurtović M., Trnski D., Musani V., Ozretić P., Levanat S., Leović D., Sabol M. (2020): Gant61 and lithium chloride inhibit the growth of head and neck cancer cell lines through the regulation of gli3 processing by gsk3 $\beta$ . *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 1–13.

## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 3. ožujka 1995. godine u Zagrebu. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje završila sam u Bjelovaru. Preddiplomski studij biologije upisujem 2017. u Osijeku na Odjelu za biologiju, a isti završavam 2020. godine radom *Nutritivna vrijednost pšenične trave obogaćene jodom*, koji je izrađen pod vodstvom dr.sc. Rosemary Vuković, doc. Obrazovanje nastavljam upisujući diplomski studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. U tijeku studija sudjelovala sam u znanstveno-popularnim radionicama u svrhu promocije znanosti i Fakulteta. Sudjelovala sam i u izvođenju praktičnog djela nastave iz kolegija Beskralježnjaci kao demonstrator. Također, tijekom diplomskog studija odradila sam 3 prakse; jednu na Medicinskom fakultetu u Zagrebu u Centru izvrsnosti za regenerativnu i reproduktivnu medicinu gdje sam savladala imunohistokemijsku metodu; drugu praksu radila sam u Laboratoriju za nasljedni rak pri Institutu „Ruđer Bošković“, a treću na Odjelu patologije i citologije OB Bjelovar gdje sam imala prilike upoznati se s realnim sektorom. Od 2020.-2021. bila sam članica Sekcije za edukaciju u studentskoj udruzi BIUS. Dobitnica sam gradske stipendije grada Bjelovara te STEM stipendije za izvrsnost. Govorim engleski te njemački jezik.