

Doprema askorbata i njegov učinak na matične stanice osteosarkoma

Zubaj, Lorena

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:217:292879>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-02**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lorena Zubaj

**Doprema askorbata i njegov učinak na
matične stanice osteosarkoma**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Lorena Zubaj

**Delivery and effect of ascorbate on
osteosarcoma stem cells**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u laboratoriju Zavoda za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Inge Urlić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

ZAHVALA

Za početak bih se htjela zahvaliti svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ingi Urlić na ukazanoj prilici i povjerenju. Hvala Vam na posvećenom vremenu, svim stručnim i dobronamjernim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala i Maji Ledinski na stručnom vodstvu, uloženom trudu i strpljenju prilikom pisanja i izrade ovoga rada. Od srca ti hvala za potrebne riječi ohrabrenja u trenutcima kada sam sumnjala u samu sebe. Hvala ti što si mi olakšala i uljepšala ovo iskustvo.

Zahvaljujem se i svim svojim prijateljima na svakom savjetu i riječima podrške koje ste mi pružali tijekom svih ovih godina. Hvala vam što ste mi uljepšali ovo poglavlje svoga života te se radujem otvaranju novih poglavlja punih predivnih uspomena koje ćemo stvarati zajedno.

Najviše se želim zahvaliti svojoj obitelji. Hvala mojoj mami na pruženoj ljubavi, potpori i ohrabrenju na svakom koraku ovoga puta. Hvala i mom anđelu na nebu, mom tati. Sigurna sam da od gore pratiš svaki moj korak i da paziš na mene. Srce ti je bilo puno svakim mojim uspjehom stoga se nadam da sam ti i sada srce ispunila ponosom i srećom. Hvala i mojoj sestri što si bila moj oslonac i vratila mi osmijeh na lice u teškim trenutcima. Također, veliko hvala didi i baki na pruženoj ljubavi i vjeri da mogu ostvariti sve ono što zamislim. Bez svih vas sada ne bih bila tu di jesam, hvala vam jer znam da dok imam vas nisam sama.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Doprema askorbata i njegov učinak na matične stanice osteosarkoma

Lorena Zubaj

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Matične stanice tumora su subpopulacija tumorskih stanica sa sposobnošću samoobnavljanja i velikim diferencijacijskim potencijalom te se smatra da pokreću inicijaciju i rast tumora. Rezistentnost matičnih stanica tumora na terapiju glavni je problem u liječenju stoga se intenzivno radi na razvoju novih terapija koje bi selektivno ciljale matične stanice raka u čemu askorbinska kiselina ima veliki potencijal. L-askorbinska kiselina jedini je aktivni oblik vitamina C, međutim niska stabilnost ograničava terapijsku primjenu. Radi povećanja kemijske stabilnosti, stabilniji lipofilni derivati, poput askorbil palmitata, mogu se pakirati u čvrste lipidne nanočestice te se tako dopremati u stanice. Učinak askorbata u slobodnom obliku te ugrađenog u čvrste lipidne nanočestice na tumorske i zdrave stanice ispitali smo testom vijabilnost te mjerenjem unutarstanične razine reaktivnih kisikovih vrsta. Utvrđeno je kako povećane koncentracije askorbata smanjuju vijabilnost stanica te doprinose porastu razine reaktivnih kisikovih vrsta što upućuje na prooksidativno djelovanje. Također smo ispitali učinak optimalnog izvora askorbata na razinu ekspresije proteina GAPDH, ali i na ekspresiju gena markera diferencijacije matičnih stanica osteosarkoma. Zaključujemo kako askorbat utječe na metabolizam stanica smanjujući razinu proteina GAPDH čime inhibira proces glikolize uzrokujući energetska krizu. Također, askorbat održava matične stanice osteosarkoma na nižem stupnju diferencijacije poticanjem pojačane ekspresije gena ranih markera diferencijacije dok ekspresija gena kasnog markera diferencijacije nije detektirana.

Ključne riječi: askorbat, matične stanice raka, SLN, GAPDH, ROS,
(53 stranica, 17 slika, 4 tablice, 81 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

Rad prihvaćen: 8.9.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Delivery and effect of ascorbate on osteosarcoma stem cells

Lorena Zubaj

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Cancer stem cells are a subpopulation of tumor cells with the ability of self-renewal and high differentiation potential and are thought to drive tumor initiation and growth. The resistance of cancer stem cells to therapy is the main problem in treatment, therefore intensive work is being done on the development of new therapies that would selectively target cancer stem cells, in which ascorbic acid has great potential. L-ascorbic acid is the only active form of vitamin C however, its low stability limits its therapeutic use. In order to increase chemical stability, its more stable lipophilic derivatives such as ascorbyl palmitate, can be packed into solid lipid nanoparticles and in that way delivered into cells. We examined the effect of ascorbate in free form and incorporated in solid lipid nanoparticles on tumor and healthy cells with a viability test and by measuring the intracellular level of reactive oxygen species. It was found that increased concentrations of ascorbate reduced cell viability and contribute to an increase in the level of reactive oxygen species, which indicates a pro-oxidative effect. We also examined the effect of the optimal source of ascorbate on the expression level of GAPDH protein and on the expression of osteosarcoma stem cell differentiation marker genes. We conclude that ascorbate affects cell metabolism by reducing the level of GAPDH protein, thus inhibiting the process of glycolysis, which causes energy crisis. Also, ascorbate maintains osteosarcoma stem cells at a lower level of differentiation by inducing increased expression of early differentiation markers genes while expression of late differentiation marker gene was not detected.

Keywords: ascorbate, cancer stem cells, SLN, GAPDH, ROS,
(53 pages, 17 figures, 4 tables, 81 references, original in: Croatian)

This thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Dr. Inga Urlić, Assoc. Prof.

Reviewers:

Dr. Inga Urlić, Assoc. Prof.

Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Dr. Petra Peharec Štefanić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 8.9.2022.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Osteosarkom	1
1.1.1. Terapija osteosarkoma	1
1.2. Matične stanice	2
1.2.1. Tumorske matične stanice	3
1.2.1.1. Metode identifikacije	4
1.2.2. Modeli tumorigeneze	5
1.2.3. Terapijski pristupi	6
1.3. Askorbat	8
1.3.1. Askorbat u kliničkim ispitivanjima	9
1.3.2. Askorbat i tumorske stanice	10
1.4. Doprema askorbata u stanice	14
1.4.1. Askorbil palmitat	14
1.4.2. Čvrste lipidne nanočestice	15
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Materijali	17
3.2. Metode	20
3.2.1. Sinteza čvrstih lipidnih nanočestica	20
3.2.2. Karakterizacija čvrstih lipidnih nanočestica	20
3.2.3. Uzgoj stanica	21
3.2.4. Ispitivanje vijabilnosti stanica MTT testom	22
3.2.4.1. Nasađivanje i tretiranje stanica	22
3.2.5. Mjerenje unutarstanične razine ROS-a	24
3.2.5.1. Nasađivanje i tretiranje stanica	24
3.2.6. Analiza razine proteina	25
3.2.6.1. Izolacija RNA	25
3.2.6.2. Izolacija proteina	26
3.2.6.3. Određivanje koncentracije proteina BCA testom	26
3.2.6.4. Elektroforeza	26
3.2.6.5. Inkubacija antitijelima i vizualizacija	28

3.2.7. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	28
3.2.8. Statistička obrada podataka	30
4. REZULTATI	31
4.1. Karakterizacija čvrstih lipidnih nanočestica	31
4.2. Analiza vijabilnosti stanica MTT testom	31
4.3. Učinak askorbata na unutarstaničnu razinu ROS-a	34
4.4. Učinak askorbata na metabolizam glukoze	37
4.5. Učinak askorbata na status diferencijacije	38
5. RASPRAVA	40
6. ZAKLJUČAK	45
7. LITERATURA	46
8. ŽIVOTOPIS	48

Popis kratica

AA – askorbinska kiselina (engl. *ascorbic acid*)

ABC – ATP-vezujući kazetni transporteri (engl. *ATP-binding cassette transporter*)

AKT-B – aktin B

ALDH – aldehid dehidrogenaza

ALK-P – alkalna fosfataza

AML - akutna mijeloična leukemija

AP – askorбил palmitat (engl. *ascorbyl palmitate*)

APS - amonijev persulfat

ATP - adenzin-5'-trifosfat

BCA - bicinkonična kiselina

bFGF- bazični faktor rasta fibroblasta (engl. *basic fibroblast growth factor*)

BRAF – homolog virusnog onkogenog v-raf mišjeg sarkoma (engl. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*)

BSA - albumin iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*)

BSP – koštani sijaloprotein (engl. *bone sialoprotein*)

COL1 – kolagen tipa 1

CSC – matične stanice raka (engl. *cancer stem cells*)

DCFH-DA - dikloro-dihidro-fluorescein diacetat

DDAB - dimetildioktadecil amonijev bromid

DHA – dehidroaskorbinska kiselina (engl. *dehydroascorbic acid*)

DMEM – modificirani Dulbecco Eagl medij za uzgoj (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*)

DMSO - dimetil sulfoksid (engl. *dimethyl sulfoxide*)

dNTP- deoksinukleozid-trifosfat

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

FAK - fokalna adhezijska kinaza

FBS – fetalni goveđi serum (engl. *fetabl bovine serum*)

GAPDH- gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza

GLUT – obitelj transportera glukoze

GMS- glicerol monostearat

GS•- tiolni radikal

GSH - glutation

GSSG - glutation disulfid

H₂O₂ – vodikov peroksid

Hh - Hedgehog signalni put

HIF-1 α – hipoksija-inducibilni faktor 1-alfa

HO•- hidroksil radikal

IP – indeks polidisperzije

iPC - inducirane pluripotentne matične stanice

KRAS- homolog virusnog onkogeno Kirstenovog sarkoma (engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene*)

LOO• - peroksilni radikal

Mili Q - ultra čista voda

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolium bromid

NAD⁺ - nikotinamid adenin-dinukleotid

NADH - reducirani nikotinamid adenin dinukleotid

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat

O₂•- superoksidni radikal

PARP - poli (ADP-riboza) polimeraza

PBS - fiziološka otopina puferirana fosfatima (engl. *phosphate-buffered saline*)

PTX – paklitaksel (engl. *paclitaxel*)

RT-qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom uz reverznu transkripciju (engl. *real-time quantitative reverse transcription PCR*)

RO•- alkoksilni radikal

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

SCVT – transporteri vitamina C ovisni o natriju (engl. *sodium-dependent vitamin C transporters*)

SDS - natrijev dodecil-sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

SLB – pufer za nanošenje uzoraka (engl. *sample loading buffer*)

SLN – čvrste lipidne nanočestice (engl. *solid lipid nanoparticles*)

TBST – mješavina TRIS puferirane otopine i polisorbata 2

TEMED - tetrametiletildiamin

TET – obitelj translokacijskih metilcitozin dioksigenaza (engl. *ten-eleven translocation*)

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

1. UVOD

1.1. Osteosarkom

Osteosarkom je najčešći primarni maligni tumor kosti mezenhimalnog podrijetla u kojemu tumorske stanice proizvode osteoid ili nezrelu kost. Osteosarkom pokazuje bimodalnu dobnu raspodjelu. Najčešće se javlja kod adolescenata između 10-14 godine života te je treći najučestaliji malignitet u adolescenciji (Melchionda i sur. 2013). Osim kod adolescenata, osteosarkom učestalo se javlja i nakon 50-te godine života, uglavnom kod pacijenata s već postojećim oboljenjima kostiju. Sama klasifikacija osteosarkoma obuhvaća brojne varijante čije su kliničke karakteristike, prognoza te sama terapija različiti (Lin i Patel 2013). Metafiza dugih kostiju najčešće je mjesto pojave osteosarkoma, a javlja se i u dijafizi dugih kostiju i aksijalnom kosturu (Bielack i sur. 2002). Kod čak 20% pacijenata dolazi do pojave metastaza, najčešće na plućima i kostima, nešto rjeđe javlja se u limfnim čvorovima dok su kod ostalih 80% oboljelih prisutne mikrometastaze (Taran i sur. 2017).

Genetske nenormalnosti koje prate osteosarkom ključne su za razumijevanje kako dolazi do njegovog razvoja. Međutim, do danas etiologija osteosarkoma velika je nepoznanica. Iako se u većini slučajeva osteosarkom javlja sporadično postoje neke nasljedene predispozicije za njegov razvoj. Osobe oboljele od nasljednog retinoblastoma, Li-Fraumeni, Rothmund–Thomson i Wernerovog sindroma imaju povećanu predispoziciju za pojavu osteosarkoma. To bi upućivalo da mutacije u genima zaslužnim za razvoj navedenih bolesti, poput *RB*, *RECQL4*, *TP53* i *WRN* imaju veliku ulogu u patogenezi osteosarkoma (Gorlick i Khanna 2010). Proučavanje osteosarkoma kod pacijenata oboljelih od spomenutih sindroma, poznatih genetskih podloga, može doprinjeti rasvjetljavanju etiologije osteosarkoma (Hameed i Mandelker 2018).

1.1.1. Terapija osteosarkoma

Trenutni tretman osteosarkoma uključuje neoadjuvantnu kemoterapiju, operaciju širokom resekcijom tumora te adjuvantnu terapiju s naglaskom na intenzitet doze i brzi početak nastavka kemoterapije nakon resekcije (Hong i sur. 2013). Kemoterapeutici koji se koriste u liječenju osteosarkoma su metotreksat, doksorubicin, cisplatina i ifosfamid te etopozid ukoliko su prisutne metastaze (Marec-Berard i sur. 2020). Metotreksat, antagonist folne kiseline, djeluje tako da inhibira dihidrofolat-reduktazu, enzim ključan za pretvorbu dihidrofolata u tetrahidrofolat čime posljedično onemogućava sintezu DNA, RNA, timidilata i proteina (Koźmiński i sur. 2020).

Doksorubicin pak interkalacijom u DNA dovodi do poremećaja u popravku oštećenja DNA posredovan topoizomerazom II te dovodi do stvaranja slobodnih radikala koji oštećuju stanične membrane, DNA i proteine (Taymaz-Nikerel i sur. 2018). Doksorubicin i cisplatina pokazuju najbolji učinak, stoga se učestalo koriste u neoadjuvantnoj terapiji, slijedi ih ifosamid te naposljetku metotreksat. Nakon četiri ciklusa neoadjuvantne terapije doksorubicinom i cisplatinom primarni tumor kirurški se odstranjuje. Ukoliko je postotak tumorske nekroze manji od 95%, pacijenti se podvrgavaju terapiji visokim dozama ifosfamida i metotreksata kako bi se poboljšala učinkovitost terapije (Lin i Patel 2013). Huayllani i suradnici (2019) naveli su kako je tim pristupom petogodišnja stopa preživljenja porasla na 67%.

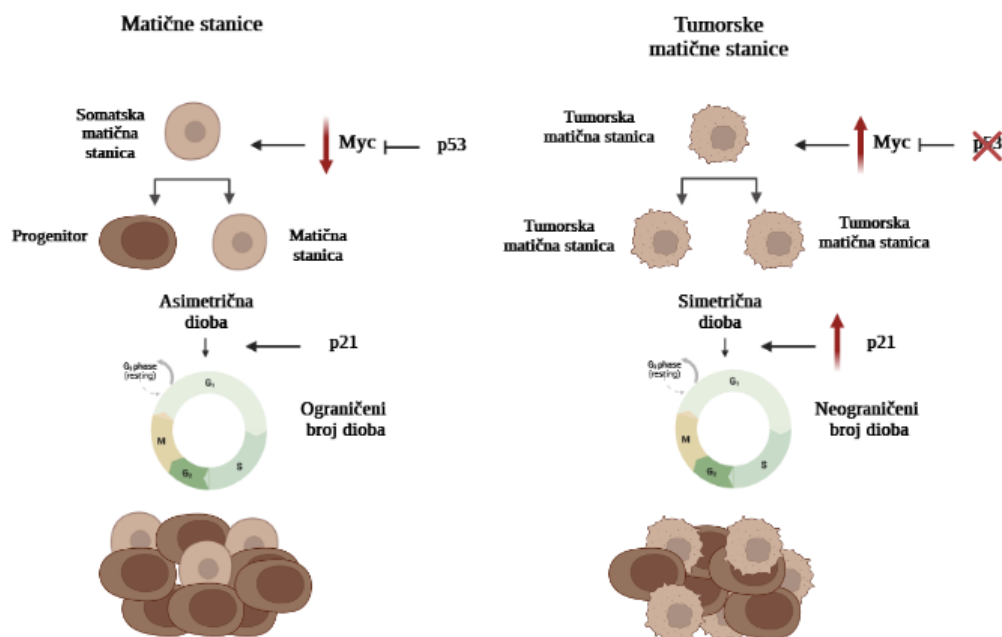
1.2. Matične stanice

Matične stanice definiraju se kao nespecijalizirane stanice organizma karakterizirane svojom sposobnošću samoobnavljanja te diferencijacije u najmanje jedan tip visoko diferenciranih stanica (Foster i sur. 2002). Upravo zbog sposobnosti diferencijacije u različite tipove stanica nazivamo ih matičnima. Njihov diferencijacijski potencijal smanjuje se u svakom koraku razvoja te one postaju sve specijaliziranije. Najčešće kada se spominju matične stanice misli se na embrionalne i somatske matične stanice. Embrionalne matične stanice potječu iz unutarnje mase stanica blastociste te se radi o pluripotentnim stanicama sposobnim diferencirati u bilo koji od tri zametna listića embrija odnosno mogu se razviti u sve stanice koje grade budući organizam. Somatske ili tkivno specifične matične stanice imaju nešto niži diferencijacijski potencijal te daju jedan ili nekoliko tipova stanica (Can 2008). Sposobnost samoobnavljanja proizlazi iz brojnih faktora poput aktivnosti telomeraze, ali i dva oblika staničnih dioba. Embrionalne matične stanice prolaze simetričnu diobu prilikom čega iz jedne stanice nastaju dvije identične stanice kćeri zadržavajući matična svojstva. Somatske stanice mogu ući u asimetričnu diobu prilikom čega iz jedne matične stanice nastaje jedna stanica kćeri s osobinama matičnosti te jedna diferencirana stanica. Time se zamjenjuju oštećene stanice što omogućava regeneraciju tkiva prilikom ozljeda. Stoga, asimetrična dioba omogućava samoobnavljanje, a da pritom ne dolazi do ekspanzije u brojnosti matičnih stanica (Majumdar i Liu 2020). Matične stanice održavaju ravnotežu između procesa samoobnavljanja i diferencijacije, dok narušavanje te ravnoteže može uzrokovati nekontroliranu proliferaciju stanica što je jedno od obilježja tumorskih stanica.

1.2.1. Tumorske matične stanice

Tumorsko tkivo karakterizira heterogenost fenotipskih karakteristika uključujući samu staničnu morfologiju, gensku ekspresiju, površinske markere, metabolizam, proliferaciju, metastatski potencijal i otpornost na terapiju (Dick 2008). Unutar tumora razlikujemo stanice s visokom stopom proliferacije osjetljive na kemoterapiju te mirujuće stanice karakterizirane usporenim metabolizmom, rezistentnošću na kemoterapiju s ulogom u nastanku metastaza. Također, povezane su s relapsom tumora nekoliko godina nakon njegovog prvobitnog povlačenja. Istraživanjem mogućih uzroka heterogenosti tumora otkrivena je prisutnost male subpopulacije stanica s velikim tumorigenim potencijalom. Prvi dokaz o postojanju takvih stanica dali su Lapidot i suradnici 1994. godine kada su uspješno identificirali fenotipski različitu populaciju stanica akutne mijeloidne leukemije (AML) $CD34^+CD38^-$ sposobnu inducirati nastanak tumora nakon transplantacije u imunodeficientnog miša te su nazvane matičnim stanicama raka (engl. *cancer stem cells*, CSC). Nekoliko godina kasnije prisutnost CSC populacije identificirana je i u solidnih tumora (Al-Hajj i sur. 2003). Smatra se da su CSC prisutne u svim tipovima tumora te su provedena brojna istraživanja u svrhu njihove identifikacije u što većem broju malignih oboljenja. Do danas CSC su identificirane u brojnim malignitetima kod ljudi, poput onih u plućima, gušterači, debelom crijevu, dojci, mozgu te kod melanoma i osteosarkoma (La Porta 2012).

CSC su subpopulacija tumorskih stanica koje imaju sposobnost samoobnavljanja i veliki diferencijacijski potencijal, diferencirajući u sve tipove stanica tumora. Smatra se da iniciraju nastanak i rast tumora, metastatsko širenje te uzrokuju terapijsku rezistenciju (Li i sur. 2021). Matične stanice i CSC karakterizira zajedničko svojstvo samoobnavljanja. Kao što je već opisano, somatske matične stanice samoobnavljaju se asimetričnim diobama kojima ne dolazi do ekspanzije u njihovoj brojnosti. Suprotno tome, simetrične diobe karakteristične su za CSC rezultirajući povećanjem njihovog broja te nastankom agresivnijih i manje diferenciranih klonova što upućuje na deregulaciju procesa samoobnavljanja (Lytle i sur. 2018). Tumor supresor p53 te onkogen c-Myc imaju ključnu ulogu u regulaciji samoobnavljanja matičnih stanica. Istraživanja su pokazala kako matične deficitentne p53 stanice češće ulaze u simetrične diobe, stoga se smatra kako je put p53 ključan pri usmjeravanju stanica prema simetričnim ili asimetričnim diobama. Deregulacija puta p53-Myc mogla bi objasniti zašto su CSC naklonjene ulasku u simetrične diobe (Falzacappa i sur. 2012).



Slika 1. Regulacija procesa samoobnavljanja zdravih i tumorskih matičnih stanica. Asimetrična dioba karakteristična je za zdrave matične stanice, te iz jedne matične stanice nastaju dvije stanice kćeri, jedna matična stanica te jedna stanica progenitor. Intrizični čimbenici utječu na potencijal samoobnavljanja matičnih stanica stoga je broj staničnih dioba ograničen. Samoobnavljanje zdravih matičnih stanica regulirano je pomoću p21 dok je put p53-Myc ključan za usmjeravanje stanica prema asimetričnoj diobi. Kod tumorskih matičnih stanica proces samoobnavljanja je dereguliran. Također, često su p53 deficijentne čiji nedostatak uzrokuje porast aktivnosti Myc onkogeni i usmjerava stanice prema simetričnim diobama. Pojačana ekspresija p21 doprinosi samoobnavljajućem potencijalu tumorskih matičnih stanica omogućavajući im ulazak u neograničeni broj staničnih dioba i ekspanziju njihove brojnosti. Ilustracija je izrađena u programu BioRender te prilagođena prema literaturnom izvoru Falzacappa i suradnici (2012).

1.2.1.1. Metode identifikacije CSC

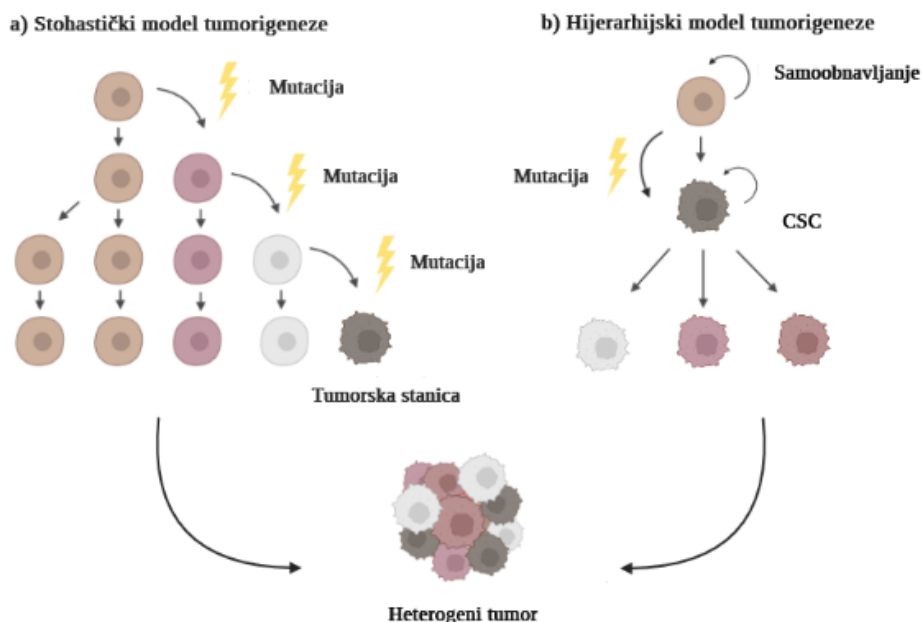
Ovisno o tkivu iz kojega potječu, CSC mogu ekspimirati čitav niz površinskih markera čija ekspresija može poslužiti u kreiranju terapija koje bi specifično ciljale CSC. Za identifikaciju i izolaciju CSC-a mogu se koristiti brojne metode. Jedna od njih bazire se na aktivnosti aldehid dehidrogenaze (ALDH), usko povezane s proliferacijom i diferencijacijom stanica, ali i s rezistentnošću na kemoterapiju zbog uloge u detoksikaciji toksičnih aldehida proizvedenih metaboličkim procesima ili citotoksičnim terapeutima. Visoka aktivnost ALDH zabilježena je kod CSC populacije brojnih malignih oboljenja te se smatra standardnim markerom u njihovoj identifikaciji (Leng i sur. 2017).

Interkalirajuća boja Hoechst također se može iskoristiti za identifikaciju subpopulacije CSC u tumorskoj masi stanica. Zbog pojačane aktivnosti transportera ABC, inače zaduženih za izbacivanje kemoterapeutika, CSC će efikasnije izbacivati boju Hoechst, na temelju čega se mogu izdvojiti od ostalih stanica tumora (Brown i sur. 2010). Također, CSC karakterizira rast u sferama što može poslužiti u njihovoj izolaciji od ostalih stanica koje čine tumorsku masu. Tumorske stanice nasade se u mediju bez seruma uz dodatak fibroblasnog faktora rasta (FGF) u ne-adherentnim uvjetima do pojave sfera. Upravo ta karakteristika rasta CSC-a omogućava njihovu izolaciju od ostalih stanica koje čine tumor (Sugihara i Saya 2013). Daljna istraživanja te identifikacija CSC-a u brojnim solidnim tumorima dovela je do razvoja hijerarhijskog ili CSC modela tumorigeneze.

1.2.2. Modeli tumorigeneze

Kao što je već opisano, tumor je heterogena masa stanica ne samo fenotipskih već i genotipskih karakteristika unatoč klonalnom nastanku. Tijekom vremena stanice akumuliraju mutacije koje doprinose heterogenosti tumora. Stohastički model tumorigeneze govori kako su sve stanice tumora biološki identične te su jednako sposobne inducirati tumorigenezu, ali se međusobno razlikuju po odgovoru na ekstrinzične i intrinzične faktore. Stoga, stohastički model heterogenost tumora objašnjava kao posljedicu prirodne selekcije. Stanice koje se uspiju najbolje prilagoditi uvjetima mikrookoliša nadvladat će ostale stanice u tumorskoj masi. Prema ovome modelu odrasla somatska stanica doživi najmanje pet genetskih promjena prije nego što poprimi sva obilježja tumorske stanice poput pojačane proliferacije, izbjegavanje apoptoze i diferencijacije. Potom dolazi do klonalne proliferacije što na kraju dovodi do nastanka hiperproliferativnog tumora. Opisani model uobičajeno se koristi za objašnjenje nastanka tumora.

Nove spoznaje dovele su do razvoja hijerarhijskog ili CSC modela tumorigeneze. Prema ovome modelu subpopulacija CSC nalazi se na vrhu hijerarhijskog lanca te je odgovorna za inicijaciju, razvoj i heterogenost tumora. Heterogenost tumora objašnjava se sposobnošću CSC-a da stvaraju različite podtipove stanica (Gasch i sur. 2017). Prema hijerarhijskom modelu CSC su glavni izvor recidiva tumora zbog razvoja mehanizama kojima suzbijaju učinak terapijskih spojeva i postižu terapijsku rezistentnost. Stoga, samo potpuna eradikacija CSC-a može spriječiti mogućnost relapsa. Iako navedeni modeli tumorigeneze pojavu, razvoj i heterogenost tumora objašnjavaju iz dvije različite perspektive, oni se međusobno ne isključuju te je njihova kombinacija ključna za objašnjavanje i razumijevanje stanične plastičnosti i tumorigeneze (Ciardiello i sur. 2018).



Slika 2. Stohastički model (a) govori da svaka stanica unutar tumorske mase ima potencijal postati tumorigena odnosno heterogenost tumora objašnjava se prirodnom selekcijom. One stanice koje se najbolje prilagode novonastalim uvjetima počinju dominirati u ukupnoj tumorskoj masi. Hijerarhijski model (b) govori kako samo mala populacija stanica može dovesti do nastanka novih tumorigenih stanica definiranih sposobnošću samoobnavljanja te diferencijacijskom plastičnosti. Ilustracija je izrađena pomoću programa BioRender te prilagođena prema literaturnom izvoru Carvalho i suradnici (2021).

1.2.3. Terapijski pristupi

Tradicionalne metode liječenja tumora uspješno ciljaju većinu stanica koje čine tumorsku masu ali često dolazi do relapsa nakon povlačenja bolesti. Smatra se da je upravo zaostala populacija CSC u tumorskoj masi zaslužna za relaps. Rezistentnost CSC-a na tradicionalne terapije, uključujući kemoterapeutike i zračenje, veliki je problem te je usko povezana s njihovim usporenim staničnim ciklusom, ekspresijom transportera za izbacivanje terapeutika putem porodice ABC transportera, putevima za izbjegavanje apoptoze te rezistencijom na lijekove posredovane nekodirajućom RNA (Li i sur. 2021). Kako bi se riješio navedeni problem intenzivno se radi na razvoju novih terapija koje bi selektivno ciljale populaciju CSC u borbi protiv malignih oboljenja. Selektivnost terapija može se poboljšati ciljanjem površinskih markera te se u tu svrhu razvijaju monoklonalna antitijela koja bi selektivno ciljala populaciju CSC tumora. Jedan od primjera je već prethodno spomenuti površinski marker CD33 ekspimiran kod većine stanica AML.

Gemtuzumab ozogamicin, konjugat monoklonskog antitijela anti-CD33 i citotoksičnog agensa N-acetil-gama-kalikeamicina, ima široku primjenu u liječenju AML-a (Chen i sur. 2013). Također Shi i suradnici (2010) u svome radu su opisali pozitivan učinak antitijela anti-ABCG2 na antigen ABCG2 u staničnoj liniji humanog raka jajnika, A2780. Stanice ABCG⁺, inače otporne na djelovanje kemoterapeutika vinkristina, postale su osjetljivije na njegovo djelovanje nakon inkubacije s antitijelom anti-ABCG2.

S obzirom da CSC pokazuju visoku rezistenciju na kemoterapiju zbog povećane ekspresije porodice ABC transportera razvijeno je nekoliko farmakoloških agensa koji inhibiraju navedene transportere te posljedično povećavaju osjetljivost CSC-a na terapeutike. Verapamil je prvi otkriveni inhibitor P-glikoproteina, člana porodice ABC transportera, te je simultana primjena verapamila i antitumorskih lijekova poput doksorubicina, paklitaksela i vinkristina pokazala obećavajuće rezultate u antitumorskim terapijama (Patel i Tannock 2009). Sinergistički učinak navedenih terapeutika snižava terapijsku rezistenciju tumora povećavajući akumulaciju lijeka, smanjujući proliferaciju i rast tumorske mase što rezultira povećanjem stope preživljenja (Khdair i sur. 2010).

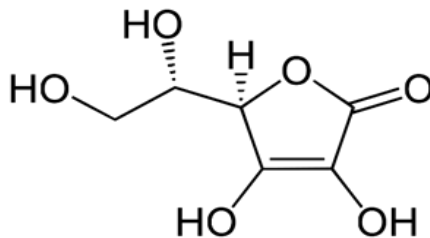
Ciljanje mikrookoliša CSC-a također je potencijalna terapijska strategija. Kako navode Junttila i De Sauvage (2013), upravo bi mikrookoliš u kojemu se CSC nalaze mogao biti razlog različite osjetljivosti CSC-a na primjenjene tretmane u uvjetima *in vivo* i *in vitro*. Fokalna adhezijska kinaza (FAK) jedna je od najviše istraženih meta u razvoju novih potencijalnih terapija zahvaljujući svojoj ulozi u staničnoj adheziji, pokretljivosti, invaziji, nastanku metastaza, preživljavanju, angiogenezi i endotelno-mezenhimske tranziciji. Pomella i suradnici (2022) nude pregled potencijalnih selektivnih FAK inhibitora, poput VS-6063/VS-4718 koji dovode do smanjenja fosforilacije FAK Y397 u tumorskim stanicama do koje te posljedično inhibicije rasta tumora te indukciju apoptoze. Također, VEGF je ključan faktor angiogeneze, procesa nastanka novih krvnih žila što doprinosi rastu i terapijskoj rezistenciji CSC-a. Bevacizumab, monoklonsko antitijelo koje cilja VEGF, pokazalo je pozitivan terapijski učinak putem normalizacije tumorske vaskulature i narušavanja mikrookoliša tumorskih stanica (Calabrese i sur. 2007).

Signalni putevi Notch, Hedgehog (Hh) te Wnt/ β -katenin imaju ključnu ulogu u samoobnavljanju tumorskih stanica, a time i u samoj tumorigenezi. Deregulacija navedenih puteva može uzrokovati nekontroliranu proliferaciju stanica te utjecati na proces diferencijacije. Također, mutacijama signalnih puteva stanice koje bi trebale otići u apoptozu izbjegavaju je, što doprinosi nastanku tumora, stoga su navedeni signalni putevi bitne terapijske mete.

Kako navode Yang i suradnici (2019) nekoliko terapeutika koji ciljaju navedene signalne puteve već se nalaze u različitim fazama kliničkih ispitivanja. AL-101 mali inhibitor γ - sekretaze, ključnog enzima u signalnom putu Notch, nalazi se u kliničkoj fazi ispitivanja za liječenje adenoidnog cističnog karcinoma (Ferrarotto i sur. 2022). Neki od inhibitora signalnog puta Hh uključuju vismodegib, za liječenje bolesnika s uznapredovalim rakom bazalnih stanica kože te patidegib i taladegib koji su također u kliničkim fazama ispitivanja (Bhateja i sur. 2019). Inhibitori β -katenina, tegavivint (BC-2059) te E-7386 u prvoj su fazi kliničkog ispitivanja za liječenje solidnih tumora (Savvidou i sur. 2017).

1.3. Askorbat

L-askorbinska kiselina (engl. *Ascorbyl acid*, AA) poznata i kao askorbat ili vitamin C mikronutrijent je topiv u vodi prirodno prisutan u hrani, poznat po svom antioksidacijskom djelovanju. Esencijalna je za niz staničnih procesa poput biosinteze karnitina, kolagena i neurotransmitera, staničnu oksidaciju te reakcije hidroksilacije kao nužan kofaktor brojnih enzima (Macan i sur. 2019). Za razliku od biljaka i životinja, ljudi ne mogu sintetizirati AA zbog nedostatka enzima L-gulonolakton oksidaze, ključnog u zadnjem koraku biosinteze, stoga je moraju unositi prehranom iz vanjskih izvora kao što su voće i povrće (Satheesh i sur. 2020).



Slika 3. Struktura molekule askorbinske kiseline

Nedostatak AA u organizmu može dovesti do poremećaja u strukturi i funkciji vezivnog tkiva što rezultira razvojem brojnih bolesti poput skorbuta. Unutarstanična koncentracija AA kreće se u milimolarnim vrijednostima dok su mikromolarne koncentracije prisutne u izvanstaničnoj tekućini i plazmi (Chen i sur. 2005). Transport askorbata *in vivo* odvija se pomoću dva tipa membranskih transportera ovisno o svom obliku. Reducirani oblik, AA unosi se pomoću porodice transportera SCVT (engl. *Sodium dependent vitamin C transporter*) ovisnih o natriju, aktivnim transportom. Postoje dvije izoforme navedenih transportera, SCVT-1/SCVT-2 koje su kodirane s dva različita gena.

Navedeni transporteri razlikuju se po distribuciji u tkivu. SCVT-1 se eksprimira uglavnom u apsorpcijskim tkivima, dok je SCVT-2 eksprimiran u većini ostalih tjelesnih tkiva, uključujući neuralna, neuroendokrina, egzokrina i endotelna tkiva te osteoblaste (Satheesh i sur.2020). Također pokazuju i različite fiziološke uloge; SCVT-1 je uključen u održavanje homeostaze askorbata u organizmu, dok SCVT-2 štiti metabolički aktivne stanice od posljedica oksidacijskog stresa (Savini i sur. 2008). Aktivni transport putem transportera SCVT smatra se glavnim načinom ulaska askorbata u stanice (Du i sur. 2012).

Uz reducirani oblik, još jedan biološki vrlo važan oblik askorbata je njegov oksidirani oblik, dehidroaskorbinska kiselina (engl. *Dehydroascorbic acid*, DHA). Za razliku od reduciranog oblika, DHA se unosi pasivnim transportom pomoću tri izoformi porodice GLUT transportera, inače glavnim transporterima za unos glukoze, a to su GLUT1, GLUT3 i GLUT4. Po ulasku u stanice DHA se reducira u askorbat te u tom obliku ostaje u stanicama (Corpe i sur. 2013).

1.3.1. Askorbat u kliničkim ispitivanjima

Istraživanje antitumorskog potencijala askorbata započelo je prije nekoliko desetljeća kada su razvijene dvije hipoteze o njegovoj terapijskoj primjeni. Prvu hipotezu postavio je William McCormick 1954. godine pretpostavljajući da askorbat postiže antitumorski učinak djelovanjem na oslabljenu strukturu kolagena (Roa i sur. 2020). Drugu hipotezu zagovarali su Cameron i Rotman predlažući da se antitumorski učinak askorbata postiže inhibicijom hijaluronidaze. Na temelju tih hipoteza Cameron i Pauling (1978) su započeli kod pacijenata s malignim oboljenjima, klinička istraživanja terapijom visokim dozama askorbata, prilikom čega su zabilježili poboljšane ishode liječenja te veću dugogodišnju stopu preživljenja. Daljnje kliničke studije, provedene na Mayo klinici, nisu pokazale značajne razlike u stopi preživljenja između skupine tretirane askorbatom i kontrolne skupine što je dovelo u pitanje vjerodostojnost rezultata prethodno provedenih istraživanja.

Suprotstavljeni rezultati ovih istraživanja mogu biti posljedica razlike u načinu primjene askorbata što je kasnije i potvrđeno istraživanjem njegove farmakokinetike. Naime, Cameron i Pauling askorbat su primjenjivali oralno i intravenozno, dok je askorbat u drugom navedenom istraživanju primjenjen samo oralnim putem. Kako navode Bae i suradnici (2019) oralnom primjenom postižu se znatno niže koncentracije askorbata u plazmi u odnosu na intravenoznu primjenu.

1.3.2. Askorbat i tumorske stanice

Askorbat je poznat po svom antioksidacijskom učinku te se koncentracija askorbata u plazmi zdravih ljudi kreće u rasponu 40-80 μM (Du i sur. 2012). Pri navedenom rasponu koncentracija askorbat djeluje kao antioksidans donirajući elektron potencijalno opasnim radikalima kao što su hidroksilni radikal (HO^{\bullet}), alkoksilni radikal (RO^{\bullet}), peroksilni radikal (LOO^{\bullet}), tiolni radikal (GS^{\bullet}) te brojni drugi (Clemente i sur. 2020). Donirajući elektron askorbat se oksidira do askorbatnog radikala koji uglavnom nije reaktivan te se uz pomoć nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) i NADPH ovisne reduktaze ponovno reducira u askorbat (Linster i Van Schaftingen 2007).

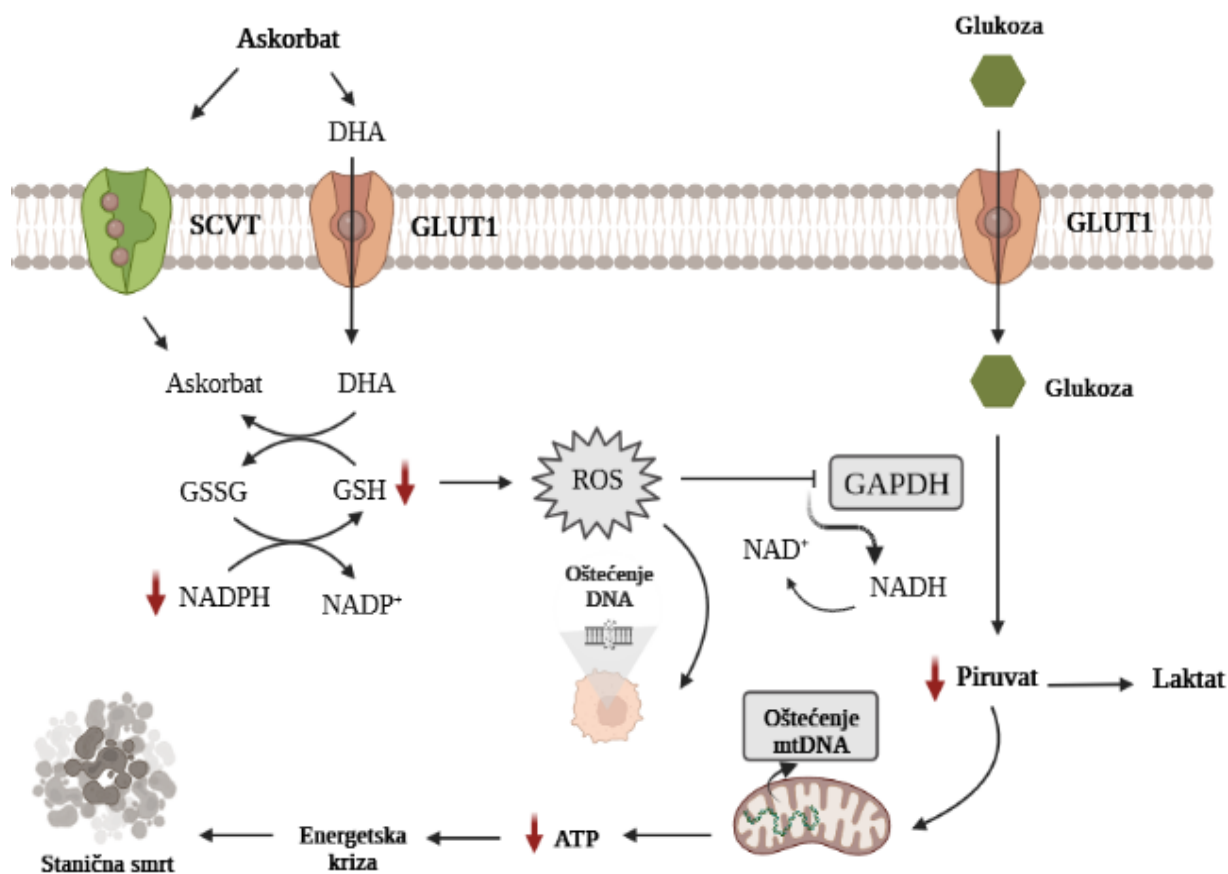
Iako je najpoznatiji kao antioksidans, askorbat ima dvojno djelovanje. Naime provedena istraživanja pokazala su kako pri niskim koncentracijama djeluje kao antioksidans štiteći stanice od posljedica oksidacijskog stresa dok pri većim koncentracijama djeluje kao pro-oksidans povećavajući unutarstaničnu razinu reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (Pawłowska i sur. 2019). Ukoliko prooksidansi nadvladaju antioksidacijske mehanizme zaštite javlja se oksidacijski stres. Smatra se da bi upravo pro-oksidativno svojstvo askorbata mogao biti jedan od mehanizama selektivnog antitumorskog djelovanja. Chen i suradnici (2005) potvrdili su da pri koncentracijama većim od 1 mM, askorbat uzrokuje nakupljanje vodikovog peroksida (H_2O_2). Unosom povećane koncentracije askorbata u stanice dolazi do njegove autooksidacije što rezultira porastom ekstracelularnog H_2O_2 te time pritišće intracelularni peroksid-uklanjajući sustav i tako inducira oksidativnu kaskadu iskazujući svoje prooksidativno svojstvo. Porast H_2O_2 ima selektivni toksični učinak na neke tumorske stanice dok zdrave stanice nisu pogođene (Du i sur. 2012). Zbog djelovanja antioksidacijskih enzima poput katalaze i glutation peroksidaze, zdrave stanice izbjegavaju oštećenje uzrokovano ROS-om. S druge strane, kod tumorskih stanica ROS može inducirati staničnu smrt zbog smanjene razine antioksidativnih enzima u usporedbi s zdravim stanicama. Tumorske stanice stalno su izložene oksidacijskom stresu te su osjetljive na svako dodatno povećanje unutarstanične razine ROS-a što na njih može imati toksičan učinak (Potters i sur. 2002). Za pro-oksidativni učinak askorbata zaslužna je njegova visoka reducirajuća sposobnost koja reducira katalitičke metale poput iona željeza (Fe^{3+}) i bakra (Cu^{2+}) te tako doprinosi stvaranju ROS-a. Tako reducirani metali reagiraju s kisikom (O_2) reducirajući ga na superoksidni radikal (O_2^{\bullet}) te doprinose nastanku OH^{\bullet} . Glutation (GSH), NADPH i enzimi koji povezuju navedene metabolite ključni su u obrani stanica od oksidacijskog stresa uklanjanjem nastalog H_2O_2 .

Postoji nekoliko mehanizama kojima askorbat može dovesti do smrti tumorskih stanica. Prvo, nastali H_2O_2 može direktno djelovati na sintezu adenozin-5'-trifosfata (ATP) oštećujući ATP-sintetazu čime se razina ATP-a smanjuje (Ahmad i sur. 2005). Drugo, indirektno djelovanje ostvaruje se oštećenjem DNA, povećanjem razine ROS-a čime se aktivira poli (ADP-riboza) polimeraza (engl. *Poly (ADP-ribose) polymerase*, PARP). Katabolizirajući NAD^+ , PARP smanjuje njegovu količinu što posljedično smanjuje i razinu NADH i sintezu ATP-a (Ozben 2007). Treći mehanizam uključuje kataboliziranje H_2O_2 oksidacijom GSH do glutation disulfida (GSSG) gdje je za redukciju GSSG u GSH potreban NADPH nastao pentoza fosfatnim putem iz glukoze. Glukoza iskorištena za redukciju $NADP^+$ u NADPH ne može se dalje koristiti u ciklusu glikolize ili nastanak NADH što rezultira smanjenom sintezom ATP-a te energetsom krizom (Lazarev i sur. 2020).

Većina energije u stanici nastaje procesom oksidacijske fosforilacije koji se odvija u mitohondriju u prisutnosti kisika. Radi se o najučinkovitijem metaboličkom putu za proizvodnju ATP-a gdje oksidacijom iz jedne molekule glukoze nastaje 30 molekula ATP-a. U uvjetima kada stanica nema dovoljnu količinu kisika ATP se proizvodi manje efikasnim procesom glikolize kojim nastaju samo dvije molekule ATP-a. Otto Warburg otkrio je da tumorske stanice metaboliziraju glukozu putem glikolize stvarajući laktat čak i u prisutnosti dovoljne količine kisika (Liberti i Locasale 2016). Navedena metabolička strategija poznata je pod nazivom aerobna glikoliza ili Warburgov efekt. Tumorske stanice koriste manje efikasan ali brži proces aerobne glikolize kako bi brzo proizvele ATP što im omogućava brzu proliferaciju (Lopez-Lazaro 2008). Također, smatra se da je ova metabolička strategija jedna vrsta prilagodbe tumorskih stanica kako bi se zaštitile od povećane razine ROS-a (Andrisic i sur. 2018). Promjene redoks statusa uzrokovanog djelovanjem askorbata uzrokuje brojne promjene uključujući oksidaciju sumpora koji je gradi aminokiselinu cistein što rezultira promjenama u terciarnoj strukturi proteina (Park 2013). Upravo takvim promjenama podložan je bitan glikolitički enzim gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH). Kao što je opisano, askorbat pri višim koncentracijama djeluje kao prooksidans čime utječe na metabolizam stanica. Povećana razina ROS-a povezana je sa smanjenjem aktivnosti GAPDH-a putem glutationilacije cisteina (Hwang i sur. 2009). Radi se o posttranslacijskoj modifikaciji proteinskog cisteinskog ostatka dodavanjem GSH što utječe na samu funkciju proteina. Inhibicijom GAPDH-a onemogućava se napredovanje glikolize što rezultira smanjenjem razine ATP-a i piruvata što posljedično dovodi do energetske krize stanice koja inducira staničnu smrt (Uetaki i sur. 2015).

Ispitivanje provedeno na stanicama mutiranih proteina KRAS (engl. *kirsten rat sarcoma viral oncogene*) i BRAF (engl. *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*) mutantnih stanica kolorektalnog karcinoma pokazalo je kako askorbat antitumorski učinak postiže induciranjem oksidacijskog stresa te inhibicijom glikolize. Kao što je spomenuto u prethodnom poglavlju, stanice unose oksidirani oblik askorbata, DHA putem transportera GLUT koji se ulaskom u stanicu ponovno reducira u AA uz pomoć GSH i NADPH. Povećani unos DHA u stanice dovodi do njegove brze pretvorbe u AA, što dovodi do iscrpljivanja GSH-a i NADPH-a te povećanja ROS-a i oštećenja DNA. Razina metabolita povezana s uzvodnim koracima glikolize, ciklusom limunske kiseline te pentoza fosfatnim putem rastu primjenom veće koncentracije askorbata dok se razina metabolita nizvodno od glikolize smanjuje (Uetaki i sur. 2015). Navedeno može biti posljedica upravo inhibicije GAPDH-a zbog djelovanja askorbata koji inducira oksidativni stres te inhibira aktivnost GAPDH-a odnosno dolazi do inhibicije glikolize u CSC (Bonuccelli i sur. 2017). Sve navedeno pruža uvid u jedan od potencijalnih mehanizama djelovanja askorbata kao prooksidativnog terapijskog sredstva u liječenju raka te je sam mehanizam prikazan na **Slici 4**.

Neki od ostalih mehanizama antitumorskog učinka askorbata uključuju snižavanje proteinske razine transkripcijskog faktora HIF-1 α (engl. *hypoxia-inducible factor*) aktiviranog hipoksijom unutar tumora. Kako navode Kuiper i Vissers (2014) askorbat je kofaktor HIF-hidroksilacijskih enzima, bitan za održavanje željeza (Fe) u njegovom aktivnom obliku (Fe²⁺) o kojemu ovise spomenuti enzimi. Također askorbat djeluje na gensku aktivnost epigenetičkim modifikacijama poput demetilacije DNA kao kofaktor enzima TET (engl. *ten-eleven translocation*) metilcitozin dioksigenaze (Linster i Van Schaftingen 2007). Uz to, askorbat ima ulogu u diferencijaciji stanica. Jedan primjer je diferencijacija induciranih pluripotentnih stanica (iPC) te promoviranje diferencijacije embrionalnih stanica u iPC (Cao i sur. 2012). Također askorbat se često dodaje i u medij za uzgoj stanica te se pokazao učinkovitim u diferencijaciji mezenhimalnih matičnih stanica u koštano tkivo (Fujisawa i sur. 2018).

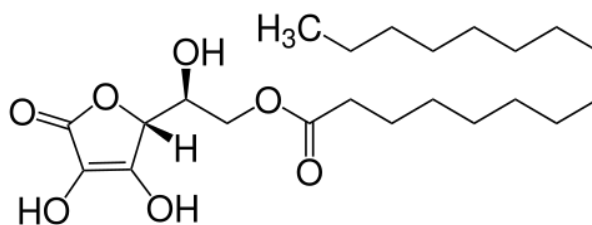


Slika 4. Mehanizam toksičnog učinka askorbata. Askorbat se oksidira u izvanstaničnom prostoru u dehidroaskorbinsku kiselinu (DHA) koja pomoću GLUT 1 transportera glukoze ulazi u stanice. Unutar stanice DHA se reducira u vitamin C na račun glutaciona (GSH) koji se oksidira u glutation disulfid (GSSG) i pretvara se natrag u GSH redukcijom NADPH-a. Iscrpljivanje GSH-a i NADPH-a rezultira prekomjernom proizvodnjom ROS-a koja može oštetiti biomolekule te je toksična za stanice raka. ROS također može inhibirati gliceraldehid 3 - fosfat dehidrogenazu (GAPDH) što rezultira smanjenom proizvodnjom piruvata i ATP-a u mitohondrijama što rezultira energetsom krizom i posljedično staničnom smrću. Ilustracija je izrađena u programu BioRender te prilagođena prema literaturnom izvoru (Macan i sur. 2019).

1.4. Doprema askorbata u stanice

1.4.1. Askorbil palmitat

Za antitumorski učinak askorbata potrebne su njegove visoke koncentracije u plazmi koje se mogu postići samo intravenoznom primjenom. Međutim, zbog osjetljivosti na zrak, svjetlost, toplinu, visoki pH te laku degradaciju *in vivo* primjena askorbata je ograničena (Naidu 2003). Kako bi se riješili navedeni problemi napravljeno je nekoliko modifikacija askorbata u svrhu sinteze njegovih stabilnijih derivata. Jedna od mogućnosti je dodavanje fosfatne skupine cikličkom prstenu askorbata prilikom čega nastaju hidrofilni kompleksi poput askorbil-2 fosfata. Dodatak fosfatne skupine doprinosi antioksidacijskom djelovanju međutim ono se ostvaruje tek nakon pretvorbe *in vivo* u L-askorbinsku kiselinu, stoga se antioksidacijska aktivnost ne može direktno postići (Kristl i sur. 2003). Također kako navodi Stamford (2012), permeabilnost membrane za navedene hidrofilne spojeve manja je u odnosu na askorbat što predstavlja problem u njegovoj primjeni. Druga mogućnost poboljšavanja stabilnosti askorbata uključuje lipofilne derivate askorbata, poput askorbil-6 palmitata (engl. *Ascorbyl palmitate*, AP). Kemijski se radi o esteru askorbinske i palmitinske kiseline široke primjene u kozmetičkoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji pri čemu se zadržava antioksidacijski učinak askorbata dok zbog svoje lipofilne prirode lako prolazi kroz staničnu membranu (Silva i Campos 2000).



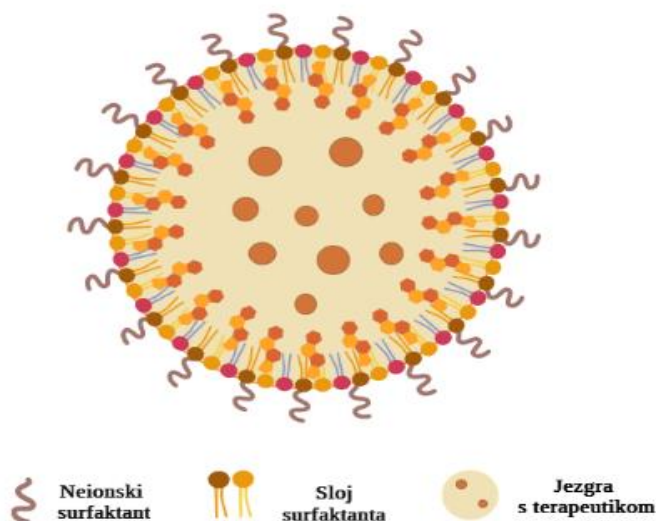
Slika 5. Strukturna formula askorbil palmitata

Istraživanja su pokazala kako AP također pokazuje antitumorski učinak inhibirajući staničnu proliferaciju i sintezu DNA brojnih tumorskih stanica (Naidu 2003). Zabilježen je i snažan sinergistički učinak AP-a i kemoterapeutika. Međutim, slaba topivost u vodi i niska bioraspoloživost ograničavaju terapijsku primjenu, stoga je potrebno pronaći odgovarajući način njegove primjene u hidrofilnim uvjetima. Kako bi riješili taj problem te povećali učinkovitost terapija znanstvenici su AP zajedno sa kemoterapeuticima ugradili u razne koloidne nosače te ih na taj način dopremali stanicama. Tako su Gopinath i suradnici (2004) AP primjerice ugrađivali u aspasome. Jukanti i sur. (2011) ispitali su sinergistički učinak AP-a i doksorubicina ugrađenih u liposome dok su Zhou i sur. (2017) ispitali sinergistički učinak AP-a i paklitaksela ugrađenih u čvrste lipidne nanočestice.

1.4.2. Čvrste lipidne nanočestice

Čvrste lipidne nanočestice (engl. *Solid lipid nanoparticles*, SLN) razvijene su kao alternativni sistemi nosača za tradicionalne koloidne sustave poput nanoemulzija, liposoma, polimernih mikro i nanočestica. SLN predstavljaju dobar sustav za dostavu lijekova zbog izvrsne biokompatibilnosti, kontroliranog oslobađanja lijeka, dobre fizikalno-kemijske stabilnosti te sposobnosti poboljšanja bioraspoloživosti lijekova (Duan i sur. 2020). Zbog svoje male veličine (50-1000 nm) mogu prolaziti kroz brojne fiziološke barijere što je velika prednost.

Što se tiče same građe SLN-a, sastoje se od čvrste hidrofobne jezgre obavijene slojem lipida. Lipidni sloj mogu činiti fosfolipidi, kolesterol, trigliceridi te slobodne masne kiseline (Mukherjee i sur. 2009). Potrebno je pažljivo odabrati komponente za sitezu SLN jer njezin kemijski sastav te svojstva samih lipida koji obavijaju jezgru znatno utječu na stabilnost SLN-a.



Slika 6. Struktura čvrstih lipidnih nanočestica. Nanočestice sadrže jezgru građenu od lipida unutar koje se ugrađuje aktivna tvar od interesa. Jezgra je obavijena slojem surfaktanta koji smanjuju površinsku napetost ključnu za topivost u hidrofilnim otopinama. Također na površini se nalaze ne-ionski surfaktanti koji stabiliziraju nanočestice te onemogućavaju njihovu agregaciju. Ilustracija izrađena u programu BioRender.

2. CILJ

Kao što je opisano u ovome radu, askorbat ima veliki antitumorski potencijal. Međutim, primjena askorbata *in vivo* ograničena je niskom stabilnošću samog askorbata ali i zbog visokih koncentracija u krvi potrebnih za postizanje antitumorskog djelovanja. Općenito, pacijenti nemaju dobru toleranciju na visoke koncentracije terapeutika, stoga bi isporuka stabilnijih derivata askorbata nanočesticama imala veliki potencijal u smanjenju potrebne visoke doze askorbata te u poboljšanju njegove farmakokinetike. Također, točan mehanizam antitumorskog djelovanja askorbata nije u potpunosti razjašnjen te će se neki od potencijalnih mehanizama ispitati u ovome radu.

Specifični ciljevi ovog diplomskog rada:

- a) Sintetizirati i karakterizirati čvrste lipidne nanočestice s ugrađenim askorbil pamitatom
- b) Ispitati učinak čvrstih lipidnih nanočestica s ugrađenim askorbil palmitatom i askorbinske kiseline u slobodnom obliku na vijabilnost matičnih stanica osteosarkoma
- c) Odrediti optimalan izvor askorbata za ispitivanje njegovog učinka na matične stanice osteosarkoma
- d) Ispitati utjecaj optimalnog izvora askorbata na promjene u ekspresiji gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaze kao mogući mehanizam citotoksičnog djelovanja
- e) Ispitati promjene u ekspresiji gena markera diferencijacije matičnih stanica osteosarkoma nakon tretmana optimalnim izvorom askorbata

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Stanice

- Stanična linija embrionalnih stanica bubrega čovjeka HEK293
- Stanična linija osteosarkoma čovjeka U2OS
- Matične stanice osteosarkoma OS-CSC

Kemikalije

Sinteza nanočestica

- Glicerol monostearat (GMS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- Dimetildioktadecil amonijev bromid (DDAB) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- Askorbil palmitat (AP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- Pluronic F-68 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)

Uzgoj i tretiranje stanica:

- Modificirani Dulbeco Eagl medij za uzgoj, DMEM (engl. Dulbecco's modified Eagle's medium), visoko glukozni (4.5g/l), L-glutamin, natrijev piruvat (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- Modificirani Coons F-12 tekući medij sa L-glutaminom, 0.863 mg/L cinkov sulfat, bez NaHCO₃ (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- Antibiotici penicilin-streptomycin (1%) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- Fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- Fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- 0,25% tripsin – EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- Trypan Blue boja (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- Askorbinska kiselina (100mM)- (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- Faktor rasta fibroblasta – bFGF (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)

Analiza vijabilnosti stanica

- Reagens MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolium bromid) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)

Analiza oksidacijskog stresa

- Dimetil sulfoksid, DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- Dikloro-dihidro-fluorescein diacetat, DCFH-DA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)

Analiza razine proteina (Western Blot)

- Komplet BCA Protein Assay (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Teksas, SAD)
- Pufer za gel za razdvajanje- 1M TRIS-HCl; pH 8,8
- Pufer za gel za sabijanje- 0.375M TRIS-HCl; pH 6,8
- Gel za razdvajanje (10%) / Gel za sabijanje (4%)
 - 1M TRIS-HCl; pH 8,8 / 0,375M TRIS-HCl; pH 6,8
 - 10% SDS ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$) - natrijev dodecil-sulfat
 - MiliQ voda
 - 30% akrilamid/bisakrilamid
 - TEMED ($\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ - tetrametiletilendiamin
 - APS ($\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ - amonijev persulfid
- Pufer za elektroforezu (3.03 g TRIS pH=8.3, 14.4 g glicin, 10% SDS, deH₂O)
- Pufer za prijenos (3.03 g TRIS, 14.4 g, 200 mL metanol, deH₂O)
- Proteinski marker Blue Prestained Broad Range (11-190 kDa) (BioLabs, Massachusetts, SAD)
- Pufer TBST (engl. *tris-buffered saline*) (1M TRIS pH=8.0, 4M NaCl, Tween 20, deH₂O)
- Primarno antitijelo anti-GAPDH (1:5000) (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Sekundarno antitijelo anti-Rabbit IgG, vezano za HRP (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Boja Ponceaus S (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)
- Clarity Western ECL Substrate (BioRad, Hercules, Kalifornija, SAD)
- Razvijatelj i fiksir GBX (Kodak, Rochester, New York, SAD)

Izolacija RNA i proteina

- Komplet Quick DNA/RNA Miniprem plus (Zymo Research Irvine, Kalifornija, SAD)

Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

- Komplet High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD)
- Smjesa Power Syber Green PCR (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD)
- Etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)

Uređaji i laboratorijski pribor

Za provođenje ovog eksperimenta koristili su se slijedeći uređaji i laboratorijski pribor :

- Laminar (Heraeus, Hanau, Njemačka)
- Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical, Malvern, Worcestershire, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Invertni mikroskop Axiovert 40 CFL (Zeiss, Oberkochen, Njemačka)
- Inkubator (Panasonic, Ōsaka, Japan)
- Čitač mikrotitarskih pločica GloMax (Promega, Madison, Wisconsin, SAD)
- Vodena kupelj Precistern (JP Selecta, Barcelona, Španjolska)
- Centrifuga UNIVERSAL 320R (Hettich, Tuttlingen, Njemačka)
- Termoblok (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- NanoVue Plus™ (Biochrom, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- CFX Opus 96 Real-Time PCR (BioRad, Hercules, Kalifornija, SAD)
- Mini-PROTEAN Tetra System nosač za elektroforezu (BioRad, Hercules, Kalifornija, SAD)
- Trans-Blot® Cell nosač za transfer proteina (BioRad, Hercules, Kalifornija, SAD)
- Bürker-Türk-ova komorica (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Njemačka)
- Petrijevke (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka)
- Epruvete (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka)
- Kapilarna kiveta (Malvern Panalytical, Malvern, Worcestershire, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Prozirna mikrotitarska pločica sa 96 jažica (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka)
- Mikrotitarska pločica sa crnim dnom sa 96 jažica (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka)
- Pločica sa 6 jažica (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka)

3.2. Metode

3.2.1. *Sinteza čvrstih lipidnih nanočestica*

Za potrebe ovoga eksperimenta sintetizirala sam SLN koje sadrže AP te prazne nanočestice (SLN-0) koje će služiti kao kontrola, metodom mikroemulzije u vodi. Za prvi korak u sintezi pripremila sam Pluronic F-68. Radi se o neionskom surfaktantu koji predstavlja vodenu fazu u sintezi nanočestica. Potom se pripremila lipidnu fazu koja se sastoji od GMS-a unutar kojega se ugrađuje AP te DDAB koji nanočesticama daje pozitivan naboj kako se međusobno ne bi povezivale i stvarale agregate.

Sintezu SLN-AP provela sam tako da sam prvo pripremila 10 % otopinu Pluronic F-68 u 80 mL MiliQ vode. Potom sam odvagala 50 mg GMS, 5 mg DDAB, 10 mg AP te sve odvagane komponente stavila u epruvetu koju sam zagrijala na 85°C u vodenoj kupelji. Istovremeno sam u vodenoj kupelji zagrijala 5 mL Pluronic F-68 u zasebnoj epruveti. Nakon što su se sve komponente zagrijale dodala sam Pluronic F-68 u epruvetu koja sadrži GMS, DDAB i AP. Sada kada su se vodena i lipidna faza nanočestice pomiješale, dobivenu emulziju sam sonicirala 25 minuta pri 85°C u vodenoj kupelji. Hlađenjem u ledu dolazi do formiranja nanočestica koje su čuvane na +4°C do upotrebe. Isti postupak sam ponovila i za SLN-0 samo bez dodatka AP-a.

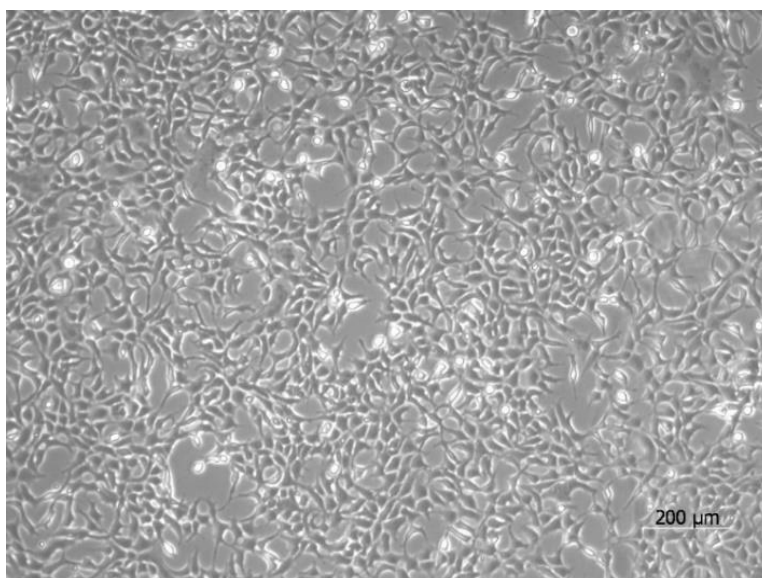
3.2.2. *Karakterizacija čvrstih lipidnih nanočestica*

Nanočestice sam karakterizirala mjerenjem veličine, polidisperziteta te zeta potencijala metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*; DLS) na uređaju Zetasizer Ultra na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju Zavoda za kemiju materijala. Kako bih karakterizirala nanočestice na temelju veličine i polidisperziteta stavila sam 1 mL uzorka nanočestica u kivetu za mjerenje. Mjerenje sam ponovila tri puta iz tri različita kuta te su rezultati izraženi kao srednja vrijednost tih mjerenja. Potom sam mjerila zeta potencijal koji daje informaciju o jačini elektrostatskog odbijanja i privlačenja između čestica u vodenoj fazi nanočestica. Prvo sam špricom prebacila 700 µL uzorka nanočestica u kapilarnu kivetu pazeći da ne dođe do nastanka mjehurića te da se uzorak ravnomjerno rasporedi kroz kapilaru. Kivetu sam prethodno isprala MiliQ vodom. Potom sam kapilarnu kivetu, pazeći na položaj elektroda, stavila u uređaj Zetasizer Ultra kako bih izmjerila zeta potencijal. Mjerenje sam ponovila tri puta te sam dobivene rezultate iskazala kao srednju vrijednost tri mjerenja.

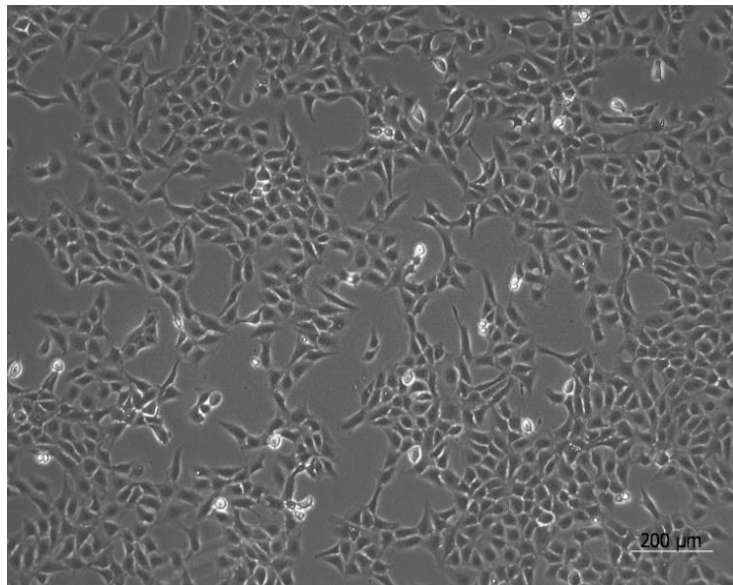
3.2.3. Uzgoj stanica

Istraživanje sam provodila na staničnim linijama embrionalnih stanica bubrega čovjeka HEK293, stanicama osteosarkoma čovjeka U2OS te matičnim stanicama osteosarkoma OS-CSC. OS-CSC dobivene su iz uzoraka biopsije tumora sa Klinike za dječje bolesti Zagreb uz odobrenje Etičkog povjerenstva te dobrovoljni pristanak pacijenata i skrbnika.

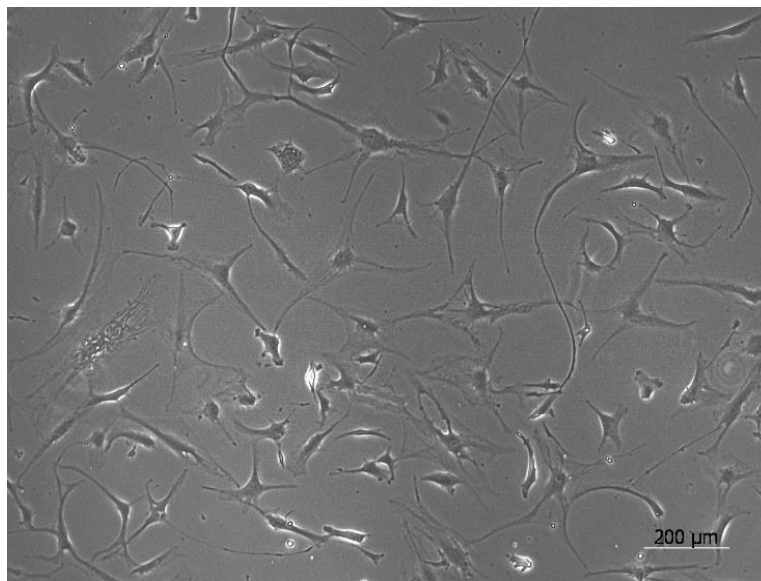
Rad sa staničnim kulturama odvijao se u laminaru pri sterilnim uvjetima. Stanične linije HEK293 i U2OS uzgajala sam u mediju DMEM s visokim udjelom glukoze uz dodatak 10% FBS-a. Stanice OS-CSC uzgajala sam u Coon's F-12 modificiranom tekućem mediju s L-glutaminom uz dodatak 10% FBS-a. Stanice su rasle na 37°C pri 5% CO₂ u inkubatoru. Stanice sam održavala u kulturi rasađivanjem koje sam provodila tako da sam stanicama prvo vakumom iz petrijevke odsisala medij u kojemu su uzgajane te ih ispirala s 2 mL PBS-a. PBS bih potom odsisala te u petrijevku dodala 2 mL tripsina s kojim sam inkubirala stanice 4 minute na 37°C i 5% CO₂ u inkubatoru kako bi stanice odvojila od podloge. Djelovanje tripsina inaktivirala sam dodatkom 4 mL odgovarajućeg medija za uzgoj. Kada je za provođenje eksperimenta bio potreban određeni broj stanica, dio volumena stanične suspenzije razrijedila sam 2x s tripanskim modrilom te sam potom žive stanice brojala na Bürker-Türk-ovoj komorici pod mikroskopom Zeiss Axiovert 40 CFL. Nakon što sam izbrojala stanice, razrijedila sam određeni volumen stanične suspenzije, sada poznate koncentracije, s odgovarajućim medijem za uzgoj kako bih imala potreban broj stanica koje ću nasaditi za eksperiment.



Slika 7. Stanična linija stanica HEK293 embrionalnih stanica bubrega čovjeka slikana na mikroskopu Zeiss Axiovert 40 CFL na povećanju 40x.



Slika 8. Stanična linija stanica U2OS osteosarkoma čovjeka slikana na mikroskopu Zeiss Axiovert 40 CFL na povećanju 40x.



Slika 9. Matične stanice osteosarkoma OS-CSC slikane na mikroskopu Zeiss Axiovert 40 CFL na povećanju 40x.

3.2.4. Ispitivanje vijabilnosti stanica testom MTT

Test MTT koristi se za mjerenje stanične vijabilnosti i proliferacije kroz metaboličku aktivnost stanica. Radi se o kolorimetrijskom testu baziranom na redukciji žute tetrazolijeve soli (MTT) u ljubičaste kristale formazana zbog djelovanja staničnih dehidrogenaza aktivnih samo u vijabilnim stanicama. Nastali kristali formazana nisu topivi u vodi te se otapaju dodatkom DMSO-a. Intenzitet obojenja proporcionalan je broju vijabilnih stanica na temelju čega se može kvantificirati. Osim za procjenu vijabilnosti i proliferacije stanica MTT test se također koristi za ispitivanje citotoksičnog učinka pojedinih spojeva.

3.2.4.1. Nasađivanje i tretiranje stanica

Za potrebe testa MTT nasadila sam stanice u gustoći od 1×10^4 st/mL u 100 μ L odgovarajućeg medija na prozirnu mikrotitarsku pločicu s 96 jažica te inkubirala 24 sata pri 37°C i 5% CO₂ u inkubatoru kako bi se stanice prihvatile za podlogu. Testom MTT ispitan je mogući selektivni citotoksičan učinak navedenih izvora askorbata na tumorske stanice U2OS i OS-CSC u usporedbi sa stanicama HEK293.

Stanice sam tretirala s tri tretmana: SLN-AP, SLN-0 i slobodnim oblikom AA pripremljenim u različitim razrjeđenjima u odgovarajućem mediju. Prije dodavanja tretmana, stanicama sam odsisala medij u kojemu su bile nasađene. Potom sam stanice tretirala sa 1, 5, 10, 25, 50 i 100 μ M SLN-AP i SLN-0 dok sam tretman slobodnim oblikom AA dodala u rasponu koncentracija od 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 5 i 10 mM. Pri tretmanu slobodnim oblikom AA koristila sam milimolarni raspon koncentracija, jer kako navodi literatura, askorbat u slobodnom obliku antitumorski učinak postiže pri većim koncentracijama. Sve tretmane normalizirala sam na sastav askorbata kako bih nadomjestila razliku u molekularnim masama AP-a i askorbata. Tretman SLN-0 služi kao kontrola učinka same formulacije nanočestica te sam navedeni tretman dodala u istom volumenu kao i SLN-AP. Sve navedene tretmane primijenila sam u volumenu od 200 μ L. Kao kontrola na pločici nalazile su se i netretirane stanice. Tretirane i kontrolne stanice na pločicu sam nasadila u triplikatima. Zatim sam tretirane stanice inkubirala 72 sata na 37°C i 5% CO₂. Nakon 72 sata, stanicama sam odsisala medij te ih isprala sa PBS-om. Potom sam u jažice dodala 40 μ L pripremljenog MTT-a koncentracije 0.5 mg/mL te stanice inkubirala 4 sata. Potom sam u sve jažice dodala 170 μ L DMSO-a koji otapa kristale formazana te zatim stanice inkubirala 30 minuta na 37°C. Završetkom inkubacije mjerila sam apsorbanciju na čitaču mikrotitarskih pločica GloMax na 560 nm te očitala rezultate.

3.2.5. Mjerenje unutarstanične razine ROS-a

Test DCFH-DA služi kako bi se izmjerila unutarstanična razina ROS-a. Navedeni test se zasniva na oksidaciji nefluorescentnog DCFH-DA u njegov fluorescentni oblik koji se može detektirati. DCFH-DA prolazi kroz staničnu membranu te unutar stanice, uz pomoć staničnih esteraza, nastaje DCFH. Također se radi o nefluorescentnoj probi, ali bez mogućnosti prolaska kroz staničnu membranu. Unutarstanične molekule ROS-a reagiraju s DCFH što dovodi do nastanka spoja DCF i emisije fluorescencije. Stoga je količina unutarstaničnog ROS-a proporcionalna oksidaciji DCFH-DA što omogućava kvantifikaciju.

3.2.5.1. Nasađivanje i tretiranje stanica

Za potrebe testa DCFH-DA stanice sam nasadila u gustoći od 2×10^4 st/mL u 200 μ L odgovarajućeg medija na crnu mikrotitarsku pločicu s 96 jažica. Pločicu sa stanicama inkubirala sam 48 sati pri 37°C i 5% CO₂ u inkubatoru kako bi se stanice prihvatile za podlogu.

Unutarstaničnu razinu ROS-a mjerila sam u stanicama U2OS i OS-CSC nasađenim na zasebnim pločicama. Mjerenje sam provela nakon 1 sata i 6 sati izloženosti stanica tretmanima. Stanice sam tretirala s SLN-AP i SLN-0 u rastućim koncentracijama od 2.5, 5, 25, 50 i 100 μ M te slobodnim oblikom AA u koncentracijama od 0.5, 1, 2.5 te 5 mM. U svaku jažicu dodala sam tretman u volumenu od 200 μ L. Na pločici se kao kontrola nalaze i jažice s netretiranim stanicama. Sve stanice na pločicu sam nasadila u triplikatima. Nakon dodatka svih tretmana pločice sam inkubirala 1 sat, odnosno 6 sati na 37°C pri 5% CO₂. Potom sam stanice isprala s 200 μ L PBS-a te taj postupak ponovila tri puta kako bi se svi tretmani dobro isprali iz jažica.

Kako bih izmjerila unutarstaničnu razinu ROS-a, pripremila sam 20 μ M DCFH-DA u PBS-u. U sve jažice dodala sam 200 μ L DCFH-DA te pločicu inkubirala 30 minuta na 37 °C i 5% CO₂ u mraku. Fluorescenciju sam mjerila pomoću čitača mikrotitarskih pločica GloMax pri ekscitaciji 485 nm i emisiji 535 nm, a potom sam očitala rezultate mjerenja.

3.2.6. Analiza razine proteina

Za potrebe eksperimenta stanice sam nasadila na pločicu sa 6 jažica u gustoći od $4,8 \times 10^4$ st/mL u 1000 μ L medija za uzgoj te stanice inkubirala preko noći pri 37 °C i 5% CO₂ u inkubatoru kako bi se prihvatile za podlogu. Idući dan stanicama sam dodala odgovarajući svježi medij uz dodatak 1 mM askorbinske kiseline.

Stanice sam tretirala s 1mM AA u slobodnom obliku uz dodatak FGF-a te 1mM AA bez dodatka FGF-a. Svaki tretman je imao odgovarajuću kontrolu, stanice nasadene u diferencijacijskom mediju s FGF-om, odnosno diferencijacijski medij bez FGF-a. Svaki tretman na pločicu sam nanijela u duplikatima. Po završetku tretiranja pločicu sa stanicama inkubirala sam na 37 °C i 5% CO₂ pet dana sa izmjenom medija svaka dva dana.

3.2.6.1. Izolacija RNA

Tjedan dana nakon tretmana stanicama sam odsisala medij te ih isprala s 2 mL PBS-a. Kako bi odvojila stanice od podloge dodala sam 3 mL tripsina te potom pločicu inkubirala 4 minute na 37°C. Djelovanje tripsina neutralizirala sam dodatkom 4 mL odgovarajućeg medija. Potom sam sadržaj svake jažice prebacila u nove epruvete.

Za izolaciju ukupne RNA iz stanica koristila sam komplet Quick DNA/RNA Miniprem Plus prema uputama proizvođača. Uzorke sam kratko centrifugirala, supernatant odsisala, a talog resuspendirala u 300 µl otopine za zaštitu od degradacije. Potom sam dodala 300 µl pufera za liziranje te uzorak prebacila u epruvetu te ga ponovno kratko centrifugirala. U dobiveni filtrirani eluat (engl. *flow-through*) dodala sam 600 µl etanola i zatim vorteksirala. Pola volumena uzorka prebacila sam u novu epruvetu i centrifugirala te sam postupak ponovila s preostalim volumenom uzorka. Potom se odvija nekoliko uzastopnih koraka u kojima sam dodala pufer za pripremu te pufer za ispiranje prema protokolu. Po završetku ispiranja dodala 50 µl vode bez Dnaze i RNaze u matriks kolonice te centrifugirala uzorak. Isto sam ponovila za svaki od uzoraka te ih potom, do upotrebe, pohranila na -20 °C u hladnjaku.

3.2.6.2. Izolacija proteina

Nakon vezanja RNA za kolonicu, proteini se mogu pročistiti iz profiltriranog eluata. U eluat, dobiven prilikom izolacije DNA, dodala sam hladni aceton (-20 °C) u omjeru 4:1. Uzorke sam inkubirala na ledu 30 minuta, a potom ih centrifugirala pri maksimalnoj brzini. Na proteinski talog dodala sam 400 µl etanola, uzorke sam ponovno centrifugirala te odsisala supernatant. Potom sam uzorcima proteina dodala 0,5 µL inhibitora proteaza a potom sam izmjerila njihovu koncentraciju.

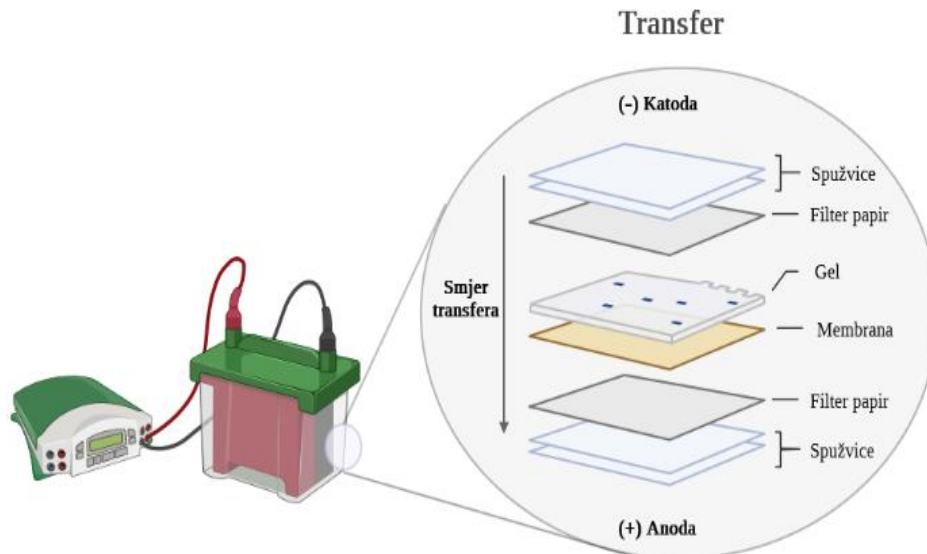
3.2.6.3. *Određivanje koncentracije proteina testom bicinkoninične kiseline (BCA)*

Koncentraciju izoliranih proteina određivala sam pomoću kompleta BCA Protein Assay prema uputstvima proizvođača. Standardi su pripremljeni razrjeđivanjem BSA (engl. *bovine serum albumin*) iz kompleta koncentracije 2 mg/mL u određenom volumenu PBS-a kako bi dobila raspon standarda BSA koncentracije od 125 do 2000 µg/mL. Na temelju broja standarda i broju uzoraka izračunala sam potreban volumen radne otopine BCA. Radnu otopinu BCA pripremila sam miješanjem otopine A i otopine B u omjeru 50:1. Uzorke i standarde razrijedila sam 2x u MiliQ vodi. U svaku od 96 jažica mikrotitarske pločice ispipetirala sam po 10 µL svakog uzorka te po 10 µL standarda različitih razrjeđenja. Standarde i uzorke na pločicu sam dodala u duplikatima. Zatim sam dodala 200 µL radne otopine BCA u svaku od jažica te pločicu inkubirala 30 minuta pri 37 °C. Završetkom inkubacije mjerila sam apsorbanciju na čitaču mikropločica GloMax na 560 nm nakon čega sam izračunala prisutnu koncentraciju proteina.

3.2.6.4. *Elektroforeza*

Volumen potreban da bih imala 3 µg proteina odredila sam metodom BCA. Prvo sam sve uzorke pomiješala s puferom za nanošenje (engl. *sample loading buffer*, SLB) u omjeru 1:1. Uzorke sam zatim inkubirala 5 minuta pri 95 °C, a potom ih centrifugirala te ostavila da se hlade na ledu do nanošenja na gel. Gelove koji će se koristiti pripremila sam u laboratoriju. Potrebno je napraviti dva gela, svaki se sastoji od 4 %-tnog gela za sabijanje i 15 %-tnog gela za razdvajanje. Nakon pripreme gelova, pripremila sam pufer za elektroforezu (engl. *running buffer*). Pripremljene gelove stavila sam u stalak sa staklima za izlivanje gelova. Potom sam uklonila kalup za jažice, dodala pufer za elektroforezu u sustav tako da su jažice potopljene u puferu. U jažice sam pipetom nanijela uzorke i proteinski marker Blue Protein Standard Broad Range (11-190 kDa). Elektroforeza se odvijala 1 sat pri 180 V na sobnoj temperaturi u nosaču Mini-PROTEAN Tetra System. Za vrijeme trajanja elektroforeze složila sam sustav za prijenos na membranu. Koristila sam nitroceluloznu membranu koja se aktivira namakanjem u puferu za prijenos nekoliko minuta. Završetkom elektroforeze, gelu sam odrezala donji rub i gel za sabijanje. Dvije spužvice i filter papir namočila sam u puferu za prijenos tako da se filter papir nalazi na spužvicama te sam na njega pažljivo prebacila gel. Zatim sam na gel stavila nitroceluloznu membranu, također prethodno namočenu u puferu za prijenos. Sve potencijalno nastale mjehuriće zraka istisnula sam laganim kotrljanjem epruvete. Potom sam na nitroceluloznu membranu dodala redom još jedan filter papir i dvije spužvice. Ovaj način slaganja sustava za transfer naziva se „sendvič“ te je detaljnije prikazan na **Slici 10**.

Tako složenu kazetu prenijela sam u sustav za prijenos proteina Trans-Blot® Cell. Potom sam u sustav dodala pufer za prijenos dok sam van nosača ulila destiliranu vodu. Sustav sam prebacila u stiropor s ledom i zatvorila poklopcem te se transfer odvijao u hladnjaku na +4°C, pri 10 V preko noći.



Slika 10. Shema slaganja takozvanog „sendviča“ za transfer proteina na membranu te detaljno prikazuje raspored slaganja spužvica, filter papira, gela i membrane. Ilustracija je izrađena u programu BioRender.

3.2.6.5. Inkubacija antitijelima i vizualizacija

Nakon završetka prijenosa proteina, membranu sam izvadila i odrezala joj rub koji predstavlja prvu jažicu te je inkubirala s Ponceau S bojom 5 minuta kako bih vizualizirala proteine. Membranu sam potom isprala 3 puta u PBS-u u trajanju od 3 minute. Nakon ispiranja membranu sam blokirala 1 sat u 5 mL 5% nemasnog mlijeka otopljenog u puferu TBST. Potom sam membranu isprala u puferu TBST nekoliko minuta. Prema proteinskom markeru odrezala sam membranu (GAPDH= 37 kDa). Primarno antitijelo anti-GAPDH razrijedila sam u 0,5%-tnom nemasnom mlijeku u puferu TBST u omjeru 1:5000. Inkubacija se odvijala na mješalici pri sobnoj temperaturi 1 sat. Membranu sam potom isprala u puferu TBST nekoliko puta. Sekundarno anti-zečje IgG, antitijelo vezano za HRP razrijedila sam u 0,5%-tnom nemasnom mlijeku u omjeru 1:2000. Membrana se sa sekundarnim antitijelom inkubirala na mješalici pri sobnoj temperaturi 1 sat. Po završetku inkubacije membranu sam ispirala u puferu TBST. Proteine sam vizualizirala otopinom za detekciju kemiluminiscencijom Clarity Western ECL Substrate. Otopine vodikovog peroksida i luminola pomiješala sam u jednakim volumenima (150 µL) u mraku pri sobnoj temperaturi.

U kazetu sam stavila prozirnu foliju na koju dolazi membrana tako da strana s proteinima ide prema gore. Pripremljenu otopinu vodikovog peroksida i luminola nanijela sam preko membrane i prekrila folijom te potom inkubirala 3 minute. Zatim sam uklonila višak otopine za vizualizaciju, a membranu prebacila u čistu foliju pazeći da se istisnu svi zaostali mjehurići zraka. Iduće korake provela sam u tamnoj komori pod crvenim svjetlom. Na membranu sam stavila film za autoradiografiju u trajanju od nekoliko minuta. Potom sam film prenijela u kadnicu s razvijačem, isprala ga u destiliranoj vodi te fiksirala u GBX fiksiru.

3.2.7. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

Koncentraciju i čistoću prethodno izolirane RNA izmjerila sam spektrofotometrijski na uređaju NanoVue Plus™ na temelju omjera apsorbancija A260/280 i A260/230. Omjer A260/280 trebao bi iznositi 2.0 za čistu RNA dok vrijednosti ispod 1.8 ukazuju na prisutnost DNA ili proteina u uzorku. Kao dodatnu kontrolu čistoće izmjerila sam i omjer A260/230 koji bi trebao biti u rasponu 2.0-2.2, dok niže vrijednosti upućuju na kontaminaciju tvarima koje apsorbiraju pri 230 nm. Potom sam provela kvantitativnu reverznu transkripciju s lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*; RT-qPCR) u dva koraka.

Uzorcima RNA sam prvo dodala pufer Dnaze MgCl₂ te 1 μL Dnaze I. Zatim sam uzorke inkubirala prvo na 37 °C kako bi Dnaza počela djelovati, a potom na 65 °C 10 minuta kako bi se inaktiviralo njezino djelovanje. Ukupnu izoliranu RNA prevela sam u cDNA koristeći komplet High-Capacity cDNA Reverse Transcription. Svaki od uzoraka pomiješala sam s MiliQ vodom kako bi dobila volumen koji sadrži 50 ng RNA. Potom sam pripremila smjesu koja sadrži 10x koncentrirani pufer RT (engl. *reverse transcription buffer*), mješavinu 25x dNTP (100 mM), 10x RT nasumičnih primera (engl. *RT random primers*), inhibitora RNaza i deionizirane vode te ga ispipetirala na pločicu. Prije provođenja reverzne transkripcije u uzorke sam dodala 1 μL EDTA. Korak reverzne transkripcije provela sam na uređaju CFX Opus 96 Real-Time PCR prema protokolu prikazanom u **Tablici 1**.

Tablica 1. Protokol reverzne transkripcije

	Korak 1	Korak 2	Korak 3	Korak 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Vrijeme/minute	10	120	5	∞

Po završetku reverzne transkripcije provela sam drugi korak RT-qPCR-a u kojemu je prethodno sintetizirana cDNA služila kao kalup za umnažanje DNA gena od interesa.

Navedeni korak provela sam pomoću kompleta PowerSYBR® Green PCR Master Mix. Kako bih imala dovoljnu količinu cDNA, nakon umnažanja cDNA sam razrijedila 2x autoklaviranom MiliQ vodom. Prvo sam pripremila otopinu koja se sastoji od 10 µL boje Syber Green (2x koncentrirane), 4 µL smjese koja sadrži uzvodne (engl. *forward*) i nizvodne (engl. *reverse*) početnice za umnažanje gena od interesa te autoklaviranu MiliQ vodu. Sekvence korištenih početnica prikazane su **Tablici 2**.

Tablica 2. Sekvence korištenih početnica za umnažanje gena markera diferencijacije lančanom reakcijom polimeraze. Također, u tablici je navedena i sekvenca početnica za umnažanje beta-aktina (*AKT-B*) koji je služio kao endogena kontrola.

Gen od interesa		Sekvenca 5´-3´
Alkalna fosfataza (<i>ALK-P</i>)	F	CTGTTTACATTTGGATAC
	R	ATGGAGACATTCTCGTTC
Kolagen tipa I (<i>COL1</i>)	F	GCTATGATGAGAAATCAACCG
	R	TCATCTCCATTTCCAGG
Koštani sialoprotein (<i>BSP</i>)	F	GGAGACTTCAAATGAAGGAG
	R	CAGAAAGTGTGGTATTCTCAG
Beta-aktin (<i>AKT-B</i>)	F	GACGACATGGAGAAAATCTG
	R	ATGATCTGGGTCATCTTCTC

Na pločicu sam prvo ispipetirala 18 µL pripremljene otopine, a potom sam u svaki red na pločici ispipetirala 2 µL odgovarajućeg cDNA kalupa. Korak umnažanja cDNA također sam provela na uređaju CFX Opus 96 Real-Time PCR po protokolu prikazanom u **Tablici 3**.

Tablica 3. Protokol za PCR u stvarnom vremenu (RT-qPCR)

Korak	Aktivacija AmpliTaq Gold™ polimeraze	PCR		Razdvajanje lanaca
		Ciklus (x40)		
		Denaturacija	Prijanjanje/sinteza (**)	
Temperatura (°C)	95	95	52	95
Vrijeme trajanja	10 minuta	15 sekundi	1 minuta	5 sekundi

Na pločicu sam nanijela i red uzoraka koji su mi služili kao kontrola bez kalupa (engl. *no-template control*) gdje sam umjesto kalupa dodala MiliQ vodu te kontrolu bez enzima za reverznu transkripciju (engl. *no reverse transcriptase control*) kako bih provjerila je li došlo do kontaminacije reagensa korištenih u PCR-u te je li prisutna zaostala genomska DNA koja bi mogla utjecati na PCR reakciju. Kao pozitivnu kontrolu koristila sam uzorak zdrave kosti kako bi ispitala je li se PCR reakcija pravilno provela. Također sam kao endogenu kontrolu koristila beta-aktin (*AKT-B*) čija se ekspresija ne mijenja pod utjecajem tretmana.

3.2.8. Statistička obrada podataka

Svi dobiveni rezultati prikazani su i statistički obrađeni pomoću programa GraphPad Prism te su izraženi kao srednja vrijednost triplikata sa standardnom devijacijom u odnosu na kontrolu. Podaci su statistički obrađeni pomoću statističkih testova analize varijance ANOVA i student T-testa, odnosno testovima normalnosti podataka kako bi se ispitalo ima li statistički značajne razlike između tretmana i/ili kontrole, uzimajući $P < 0,05$ kao značajnu razliku.

4. REZULTATI

4.1. Karakterizacija nanočestica

Nanočestice s ugrađenim askorbil-palmitatom (SLN-AP) i prazne nanočestice (SLN-0) karakterizirala sam na temelju njihove veličine, zeta potencijala te polidisperziteta na uređaju Zetasizer Ultra što prikazuje **Tablica 4**. Ukratko, SLN-AP nešto su manje veličine u odnosu na SLN-0 dok je indeks polidisperzije (PI) nešto veći u SLN-AP nego kod SLN-0. Pozitivan zeta potencijal izmjeren je za SLN-0 dok je za SLN-AP zeta potencijal blago negativan.

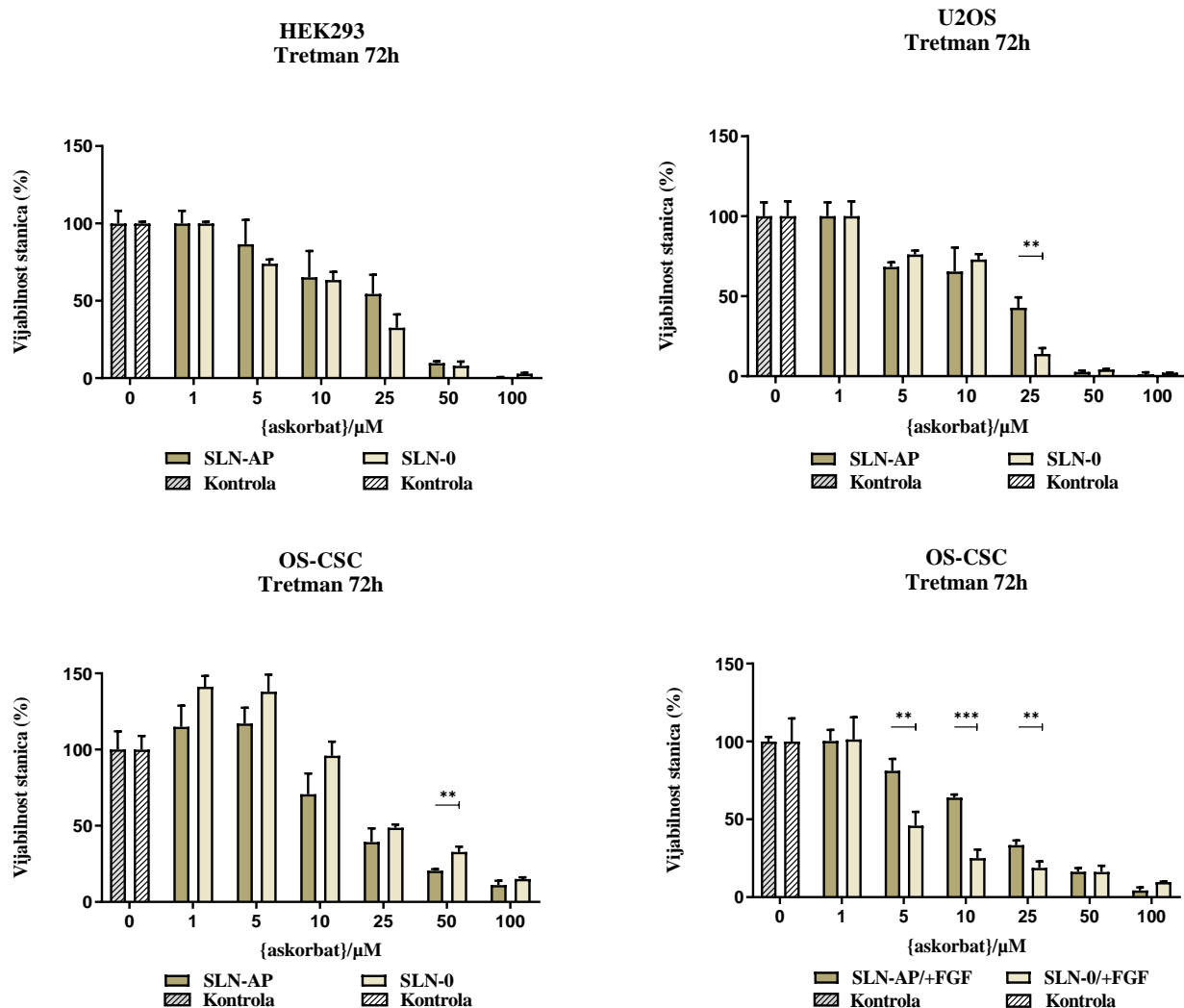
Tablica 4. Karakterizacija nanočestica (SLN-AP i SLN-0) na temelju veličine, polidisperziteta te zeta potencijala. Svi uzorci razrijeđeni su 10x deioniziranom vodom a potom su provedena mjerenja pomoću uređaja Zetasizer Malvern Panalytical te su rezultati izraženi kao srednja vrijednost tri mjerenja \pm SD.

Karakterizacija	SLN-AP	SLN-0
Veličina/nm	340 ± 15.7	374 ± 4.68
Polidisperzitet	0.198 ± 0.0451	0.182 ± 0.0219
Zeta potencijal/mV	-4.18 ± 0.251	$+21.5 \pm 0.308$

4.2. Analiza vijabilnosti stanica testom MTT

Testom MTT ispitala sam mogući selektivni citotoksičan učinak nanočestica SLN-AP i SLN-0 te slobodnog oblika AA na tumorske stanice U2OS i tumorske matične stanice OS-CSC u usporedbi sa stanicama HEK293. Tretman nanočesticama (SLN-AP/SLN-0) primjenila sam u šest različitih koncentracija u rasponu od 1 do 100 μ M tijekom 72 sata. Nakon 72 sata izmjerila sam vijabilnost stanica testom MTT.

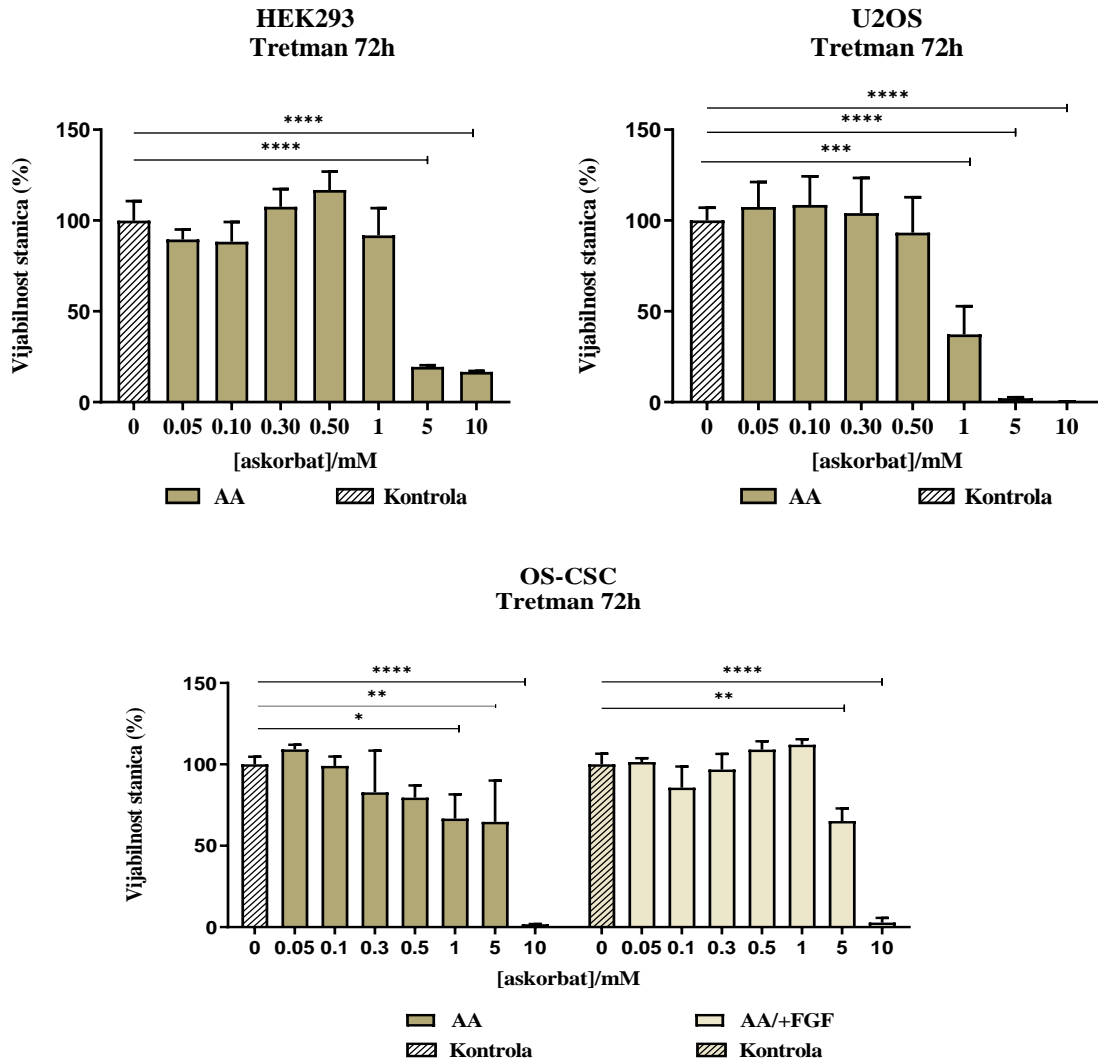
Rezultati pokazuju kako primjenom rastućih koncentracija SLN-AP i SLN-0 dolazi do smanjenja vijabilnosti sva tri tipa stanica 72 sata od primjene tretmana. Analizom dobivenih rezultata tumorske stanice pokazale su nešto veću osjetljivost na navedene tretmane u odnosu na zdrave stanice HEK293. Stanice OS-CSC koje rastu uz prisutstvo FGF-a i bez FGF-a također su tretirane rastućim koncentracijama SLN-AP i SLN-0. Kod obje varijante tretmana vijabilnost stanica se u pravilu smanjuje porastom koncentracije nanočestica. Primjena niže koncentracije od 1 μ M askorbata ne utječe na vijabilnost stanica dok je primjenom većih koncentracija nanočestica vidljiva smanjena vijabilnost stanica. Uspoređujući tretmane, SLN-0 pokazao se toksičniji od SLN-AP kod svih stanica osim kod OS-CSC gdje SLN-AP/+FGF pokazuje veću citotoksičnost od SLN-0/-FGF. Svi navedeni rezultati prikazani su na **Slici 11**.



Slika 11. Vijabilnost HEK293 i tumorskih U2OS i OS-CSC stanica nakon tretmana nanočesticama SLN-AP/SLN-0 u koncentracijama od 1-100 μM u trajanju od 72 sata. Svi su rezultati izraženi kao srednja vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na kontrolu, ± SD vrijednost. Podatci su statistički obrađeni višestrukim t-testom uz Holm-Šidák korekciju; $p > 0.05$, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$.

Što se tiče tretmana slobodnim oblikom AA, stanice sam tretirala u rasponu koncentracija od 0.05-10 mM. Također se testom MTT ispitalo pokazuju li tumorske stanice U2OS i OS-CSC veću osjetljivost na AA u odnosu na stanice HEK293 te koji se izvor askorbata pokazao toksičnijim, SLN-AP ili slobodna AA. Primjena AA u koncentracijama od 0.03 i 0.5 mM potaknula je proliferaciju stanica HEK293 te vijabilnost stanica raste u odnosu na kontrolu. Međutim pri 1mM AA dolazi do inhibicije rasta i pada stanične vijabilnosti ispod 100%, dok primjenom 5 i 10 mM koncentracije AA vijabilnost stanica pada ispod 50%. Rezultati su prikazani na **Slici 12**.

Stanice U2OS pokazale su se nešto osjetljivijima na tretman slobodnim oblikom AA u odnosu na stanice HEK293. Vijabilnost stanica počinje padati nakon primjene 0.3 mM AA te se rast stanica gotovo u potpunosti inhibira primjenom 5 mM koncentracije tretmana. Primjenom rastućih koncentracija AA vijabilnost stanica OS-CSC pada ali u nešto manjem postotku u odnosu na stanice U2OS. Dodatkom FGF-a rezistentnost je dodatno porasla te je tek 5 mM koncentracija tretmana inhibirala rast stanica (Slika 12).

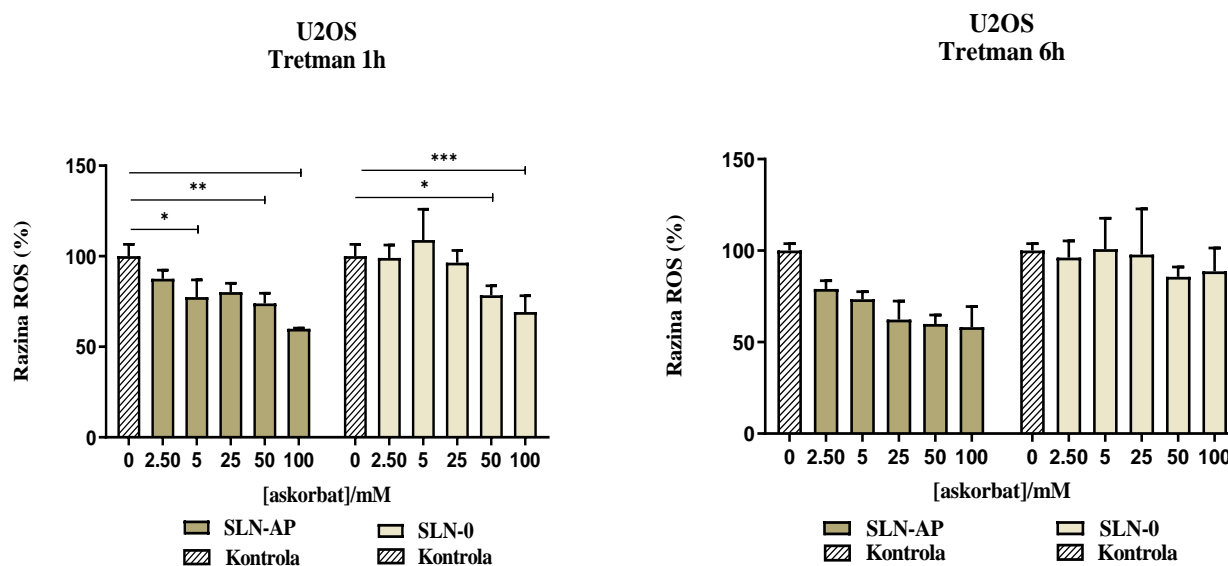


Slika 12. Vijabilnost HEK293 i tumorskih stanica U2OS i OS-CSC nakon tretmana sa slobodnim oblikom AA (+/-FGF) u koncentracijama od 0.05-10 mM u trajanju od 72 sata. Svi su rezultati izraženi kao srednja vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na kontrolu, \pm SD vrijednost. Podatci su statistički obrađeni testom analize varijance ANOVA uz Dunnet korekciju; $p > 0.05$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$.

4.3. Učinak askorbata na unutarstaničnu razinu ROS-a

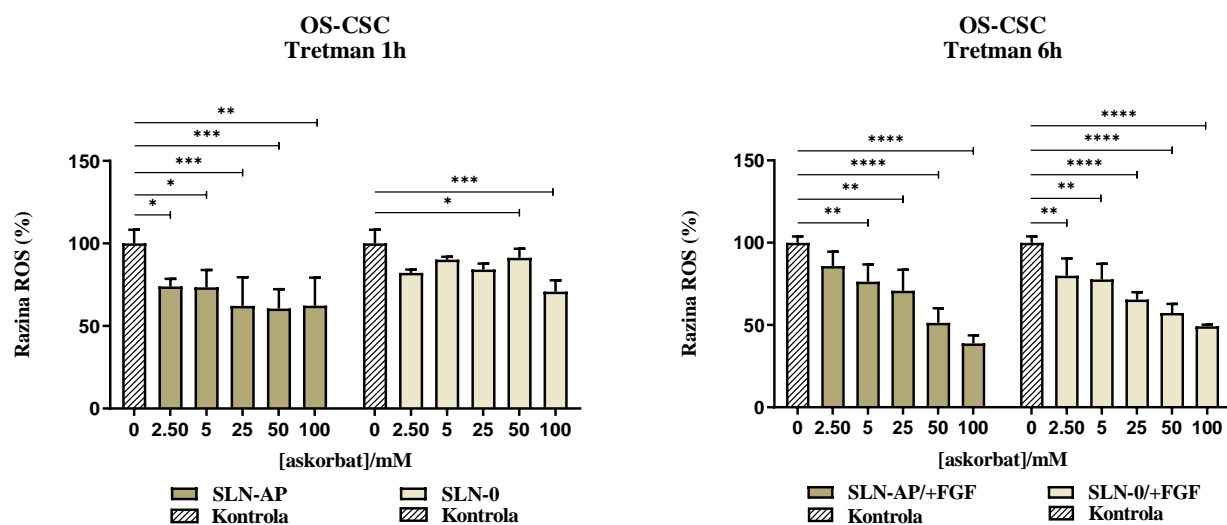
Uz ispitivanje učinka različitih oblika askorbata na vijabilnost tumorskih i matičnih stanica ispitala sam i njegov učinak na unutarstaničnu razinu ROS-a kao jedan od potencijalnih mehanizama antitumorskog djelovanja. Tumorske stanice U2OS i matične tumorske stanice OS-CSC tretirala sam nanočesticama SLN-AP i SLN-0 te slobodnim oblikom AA. Nanočestice sam primjenila u rasponu koncentracija od 2.5 do 100 mM dok sam AA primjenila u koncentracijama od 0.5 do 5 mM. Učinak askorbata na unutarstaničnu razinu ROS-a izmjerila sam testom DCFH-DA, a mjerenja sam provela 1 sat te 6 sati nakon tretiranja.

Rezultati su pokazali kako je tretman nanočesticama SLN-AP uzrokovao snižavanje unutarstanične razine ROS-a kod tumorskih stanica U2OS što se može pripisati antioksidacijskom svojstvu AP-a ugrađenog u nanočesticu. Tretman SLN-0 nije uzrokovao značajnu promjenu unutarstanične razine ROS-a te nema značajne razlike u učinku rastućih koncentracija te duljine trajanja tretmana (1h i 6h) što je vidljivo iz grafa prikazanog na **Slici 13**.



Slika 13. Unutarstanična razina ROS-a unutar tumorskih stanica U2OS nakon tretmana sa SLN-AP i SLN-0 u koncentracijama od 2.5-100 mM nakon 1 i 6 sati. Svi su rezultati izraženi kao srednja vrijednost postotka unutarstanične razine ROS-a u odnosu na kontrolu, \pm SD vrijednost. Podatci su statistički obrađeni testom analize varijance ANOVA uz Dunnet korekciju; $p > 0.05$, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$.

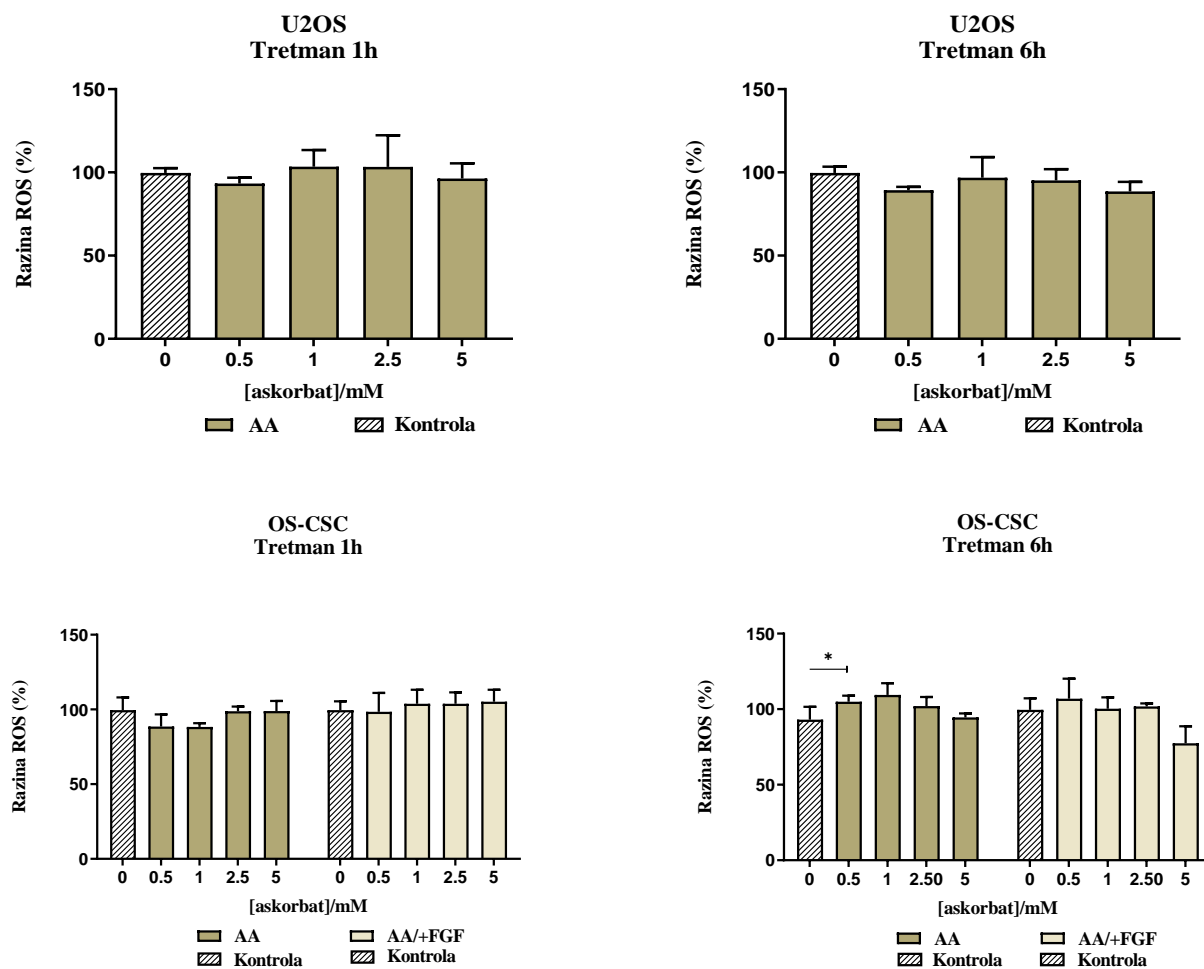
Nešto jači antioksidacijski učinak zabilježen je kod stanica OS-CSC nakon primjene rastućih koncentracija navedenih tretmana (**Slika 14**). Izmjerena je niža unutarstanična razina ROS-a u odnosu na stanice U2OS te antioksidacijski učinak postaje izraženiji dužom izloženosti stanica tretmanima.



Slika 14. Unutarstanična razina ROS-a unutar tumorskih matičnih stanica OS-CSC nakon primjene nanočestica SLN-AP i SLN-0 u koncentracijama od 2.5-100 mM nakon 1 i 6 sati. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka unutarstanične razine ROS-a u odnosu na kontrolu, \pm SD vrijednost. Podatci su statistički obrađeni testom analize varijance ANOVA uz Dunnet korekciju; $p > 0.05$, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$, $****p \leq 0.0001$.

Ukratko svi tretmani nanočesticama (SLN-AP i SLN-0) pokazali su antioksidacijski učinak te su rastuće koncentracije tretmana dovele do smanjenja unutarstanične razine ROS-a kod tumorskih stanica U2OS i matičnih stanica OS-CSC 1 sat od tretiranja te se antioksidacijski učinak povećava dužinom trajanja tretmana što je vidljivo iz izmjerene unutarstanične razine ROS-a 1 sat od tretiranja odnosno 6 sati od tretiranja (**Slika 14**).

Tretman slobodnim oblikom AA nije znatno utjecao na unutarstaničnu razinu ROS-a kod stanica U2OS 1 sat od tretiranja. Primjenom 1 mM i 2.5 mM slobodnog oblika AA dolazi do blagog porasta razine ROS-a u odnosu na 0.5 mM koncentraciju AA. Dužim izlaganjem stanica tretmanima također nisu zabilježene značajne promjene u unutarstaničnoj razini ROS-a. Primjenom rastućih koncentracija navedenog tretmana uočava se blago antioksidacijsko djelovanje AA na tumorske stanice U2OS (**Slika 15**). Što se tiče učinka slobodnog askorbata (AA i AA/+FGF) na matične stanice osteosarkoma OS-CSC nije zabilježen značajan učinak na unutarstaničnu razinu ROS-a 1 sat od tretiranja. Rezultati drugog vremenskog očitavanja ukazuju na porast unutarstanične razine ROS-a. Primjenom 0.5 mM i 1 mM koncentracije tretmana slobodnim oblikom AA odnosno primjenom 0.5 mM koncentracije tretmana AA/+FGF. Daljnom primjenom rastućih koncentracija tretmana dolazi do smanjenja razine unutarstaničnog ROS-a.



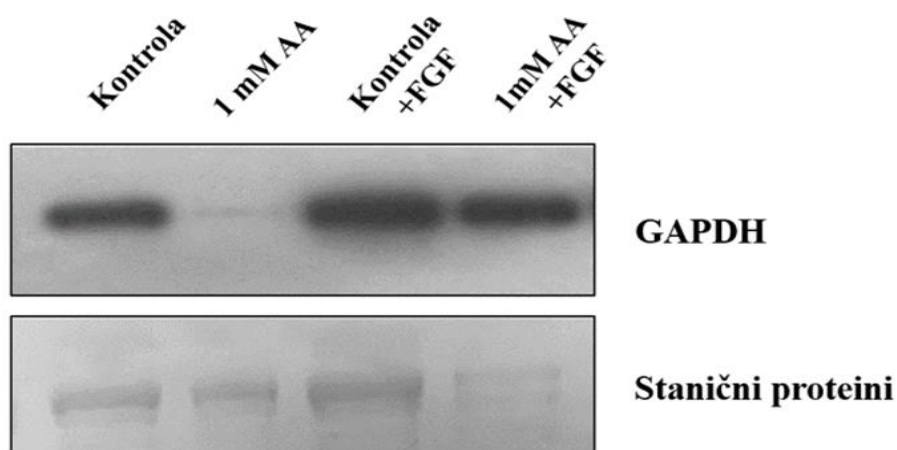
Slika 15. Unutarstanična razina ROS-a unutar tumorskih stanica U2OS i OS-CSC nakon tretmana sa slobodnim oblikom AA (+/-FGF) u koncentracijama od 0.05-5 mM nakon 1 i 6 sati. Svi su rezultati izraženi kao srednja vrijednost postotka unutarstanične razine ROS-a u odnosu na kontrolu, \pm SD vrijednost. Podatci su statistički obrađeni testom analize varijance ANOVA uz Dunnet korekciju; $p > 0.05$, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$, $****p \leq 0.0001$.

Dobiveni rezultati upućuju na dvojno djelovanje askorbata što je uočljivo kod matičnih stanica osteosarkoma OS-CSC. Porast unutarstanične razine ROS-a uzrokovan je prooksidativnim djelovanjem slobodnog oblika AA. Prooksidativno djelovanje uočava se primjenom 0.5, 1 i 2.5 mM AA 6 sati od izloženosti u odnosu na kontrolu dok se primjenom 5 mM koncentracije AA smanjuje razina ROS-a. Također i primjenom tretmana slobodnog oblika AA/+FGF zabilježen je antioksidacijski učinak AA gdje primjena rastućih koncentracija slobodnog oblika AA uzrokuje smanjenje razine ROS-a.

4.4. Učinak askorbata na metabolizam glukoze

Također, jedan od mehanizama kojima askorbat postiže svoj antitumorski učinak je inhibicija ciklusa glikolize što rezultira energetsom krizom i staničnom smrti. GAPDH katalizira šesti korak glikolize, stoga je bitan u procesu razgradnje glukoze u svrhu nastanka ATP-a. Rezultati MTT-a i mjerenje razine ROS-a pomoću testa DCFH-DA ukazuju da je slobodan oblik AA optimalan izbor askorbata za provođenje daljnjih eksperimenata. Metodom Western blot ispitala sam učinak slobodnog oblika askorbata na metabolizam stanica OS-CSC prateći njegov učinak na protein GAPDH.

Stanice OS-CSC sam tretirala s 1mM AA uz dodatak FGF-a te istom koncentracijom AA bez dodatka FGF-a. Tretirane stanice inkubirala sam pet dana uz izmjenu medija svaka dva dana. Nakon tjedan dana stanicama OS-CSC sam izolirala proteine. Dobiveni rezultati pokazuju normalnu razinu GAPDH-a u kontrolnim stanicama. Kao kontrola korišteni su ukupni stanični proteini obojani bojom Ponceau S. Navedena kontrola ukazuje na to da su proteini ravnomjerno nanešeni na gel te da je sam prijenos proteina na membranu bio uspješan. Stanice OS-CSC tretirane s 1 mM AA pokazuju značajno smanjenu razinu GAPDH proteina tjedan dana od tretiranja. Primjena 1 mM AA uz dodatak FGF-a nije utjecala na razinu GAPDH-a u stanicama OS-CSC (**Slika 16**).

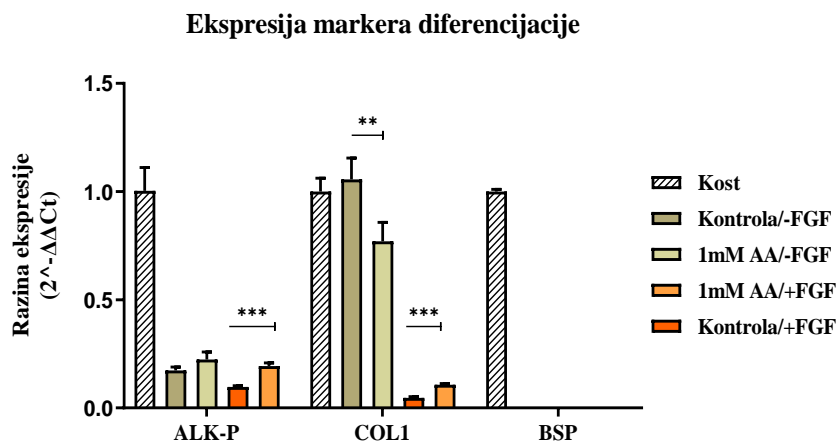


Slika 16. Ekspresija proteina GAPDH tjedan dana od tretmana stanica OS-CSC slobodnim oblikom AA kao optimalnim izvorom askorbata. Stanice OS-CSC tretirane su 1mM koncentracijom AA u kombinaciji sa/bez FGF-a. Kao kontrola korišteni su ukupni stanični proteini obojani bojom Ponceau S nakon prijenosa na membranu.

4.5. Učinak askorbata na status diferencijacije

Osim utjecaja askorbata na unutarstaničnu razinu ROS-a i metabolizam, antitumorsko djelovanje može biti i posljedica njegovog učinka na diferencijaciju stanica. Kako bih ispitala utjecaj askorbata na diferencijacijski status stanica OS-CSC izmjerila sam razinu ekspresije gena ranih markera diferencijacije, alkalne fosfataze (engl. *alkaline phosphatase*, *ALK-P*) i kolagena tipa I (engl. *type I collagen*, *COL1*) te kasnog markera diferencijacije, koštanog sialoproteina (engl. *bone sialoprotein*, *BSP*). Stanice OS-CSC tretirala sam 1 mM AA uz dodatak FGF-a te istom koncentracijom AA bez dodatka FGF-a uz odgovarajuće kontrole. Tretirane stanice inkubirala sam tjedan dana, uz izmjenu medija svaka dva dana, a potom sam stanicama izolirala RNA.

Dobiveni rezultati pokazali su znatno manju ekspresiju gena *ALK-P* i *BSP* u kontrolnim stanicama u odnosu na zdravu kost. Ovakvi rezultati su očekivani s obzirom da se radi o nediferenciranim matičnim stanicama OS-CSC. Primjena 1mM AA (+/-FGF) u slobodnom obliku uzrokovala je porast ekspresije gena *ALK-P*, ranog markera diferencijacije u odnosu na kontrolu. Ekspresija drugog ranog marker diferencijacije *COL1* smanjila se nakon tretmana 1mM AA u odnosu na kontrolu. Međutim primjenom 1 mM AA uz dodatak FGF-a njegova ekspresija je porasla u odnosu na kontrolu. Tjedan dana od tretmana ekspresija *BSP*-a, kasnog markera diferencijacije osteoblasta, nije detektirana (**Slika 17**).



Slika 17. Razina ekspresije markera diferencijacije: alkalne fosfataze (*ALK-P*), kolagena (*COL1*) i koštanog sialo proteina (*BSP*). Stanice OS-CSC tretirane su slobodnim oblikom AA (1 mM) bez FGF-a te istim tretmanom uz dodatak FGF-a. Tretirane stanice su inkubirane tjedan dana uz izmjenu medija svaka dva dana. Ekspresija gena je normalizirana uz pomoć endogene kontrole beta aktina. Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija gena u odnosu na kontrolnu grupu (zdrava kost), \pm SD vrijednost. Podatci su statistički obrađeni višestrukim t-testom uz Holm-Šidák korekciju; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Tablica 4. Sažeti prikaz promjene genske ekspresije markera diferencijacije u stanicama OS-CSC. Svi rezultati izraženi su kao srednja vrijednost triplicate. Stanice su tretirane 1 mM koncentracijom slobodnim oblikom AA tjedan dana u diferencijacijskom mediju sa i bez FGF-a. Svaki tretman imao je odgovarajuću kontrolu. Povećana ekspresija označena je sa ↑ a snižena ekspresija označena je sa ↓ u odnosu na odgovarajuće kontrole.

Tretman/Gen	ΔCt			$\Delta\Delta Ct$			$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	<i>ALK-P</i>	<i>COL1</i>	<i>BSP</i>	<i>ALK-P</i>	<i>COL1</i>	<i>BSP</i>	<i>ALK-P</i>	<i>COL1</i>	<i>BSP</i>
Kontrola/-FGF	5,78	9,23	16,11	2,54	-0,35	15,47	0,17	1,18	0,00
1mM AA/-FGF	5,62	9,97	14,88	2,39	0,38	14,24	0,22 ↑	0,77 ↓	0,00
Kontrola/+FGF	6,56	14,03	12,76	3,33	4,45	12,12	0,10	0,05	0,00
1mM AA/+FGF	5,62	12,79	14,58	2,39	3,21	13,94	0,19 ↑	0,11 ↑	0,00
Kost	3,23	9,58	0,64	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00

5. RASPRAVA

Istraživanje za ovaj rad provedeno je na nemalignim embrionalnim stanicama bubrega HEK293 te na tumorskim stanicama U2OS i matičnim stanicama osteosarkoma OS-CSC. Stanice HEK293 služile su kao kontrola učinka provedenih tretmana u odnosu na dva tipa tumorskih stanica. Detaljni mehanizam citotoksičnog učinka askorbata te njegova selektivnost prema tumorskim stanicama nije u potpunosti razjašnjen te je u ovome radu ispitano nekoliko potencijalnih mehanizama antitumorskog djelovanja askorbata.

Prvi korak u izradi ovog diplomskog rada bila je sinteza SLN-a metodom mikroemulzije u vodi kao mogući način dopreme askorbata stanicama. Sintetizirane nanočestice karakterizirane su na temelju njihove veličine, polidisperziteteta te zeta potencijala. IP je mjera uniformnosti odnosno heterogenosti nanočestica u uzorku na temelju veličine. Kako navodi literatura, IP vrijednosti manje od 0.5 upućuju na monodisperziju uzorka odnosno govori kako su sintetizirane nanočestice uniformne u veličini dok IP vrijednost veća od 0.7 upućuje na polidisperziju uzorka odnosno heterogenost u veličini nanočestica (Mudalige i sur. 2019). Sintetizirane SLN-AP i SLN-0 pokazuju IP vrijednost manju od 0.5 što upućuje na uniformnost nanočestica te nam govori kako nije došlo do nastanka agregata te su nanočestice pogodne za provođenje daljnjih eksperimenata. Također Shah i suradnici (2014) navode kako vrijednosti zeta potencijala u rasponu od -30 mV do +30 mV upućuju na dobru stabilnost formiranih nanočestica. Također vrijednosti zeta potencijala nanočestica sintetiziranih za potrebe ovog diplomskog rada nalaze se u navedenom rasponu što je dodatna potvrda dobre stabilnosti sintetiziranih nanočestica.

Nakon karakterizacije nanočestica bilo je potrebno ispitati citotoksičnost tretmana SLN-AP, SLN-0 i slobodnog oblika AA stoga se u tu svrhu pratio njihov učinak na vijabilnost stanica testom MTT. Osim citotoksičnosti, testom MTT ispitalo se i koji je način dopreme askorbata optimalan (slobodan oblik ili ugrađen u nanočestice) te ima li askorbat selektivni učinak na tumorske stanice u odnosu na stanice HEK293. Primjena rastućih koncentracija tretmana SLN-AP negativno je utjecala na vijabilnost stanica što nam je ujedno i jedna vrsta potvrde uspješne dopreme nanočestica u stanice. Primjenom rastućih koncentracija tretmana nanočesticama uočava se smanjenje vijabilnosti stanica. Međutim porast vijabilnosti stanica zabilježen je nakon primjene 1 i 5 μM koncentracije oba tretmana (SLN-AP/SLN-0) što se može objasniti mogućom povećanom proliferacijom stanica ili povećanim metaboliziranjem MTT-a u odnosu na kontrolne stanice.

Značajan pad u vijabilnosti stanica primjenom praznih nanočestica (SLN-0) koje su ujedno služile kao kontrola tretmana SLN-AP upućuje kako je citotoksičan efekt SLN-AP najvjerojatnije posljedica upravo formulacije samih nanočestica a ne AP-a. Osim na tumorske stanice toksičan efekt zabilježen je i kod stanica HEK293, iako većina literaturnih izvora navodi SLN kao dobre nosače raznih terapeutika niske citotoksičnosti. Primjerice Zhou i suradnici (2017) ispitivali su sinergistički učinak AP i paklitaksela (PTX) ugrađenih u SLN (AP/PTX-SLN) na tumorske stanice u odnosu na nanočestice koje sadrže samo AP odnosno PTX. Također su koristili AP kao stabilniji oblik askorbata u svrhu poboljšanja antitumorskog učinka te smanjenja štetnih nuspojave PTX-a. Primjenom nanočestica zabilježili su povećanu staničnu permeabilnost te poboljšani unos navedenih terapeutika u melanoma B16F10 stanice. Također su na temelju rezultata testa citotoksičnosti *in vitro* SLN karakterizirali kao dobre nosač terapeutika u liječenju raka niske toksičnosti za zdrave stanice. Potencijalni razlog toksičnosti sintetiziranih SLN u ovome radu na stanice može biti sam način sinteze te odabir gradivnih komponenti nanočestica. Također citotoksičnost može biti i posljedica previsoke koncentracije nanočestica.

Sve navedene stanice tretirane su i slobodnim oblikom AA u rasponu koncentracija 0.05-10 mM. Padayatty i Levine (2000) navode kako su mikromolarne koncentracije (100-200 μ M) AA toksične za neke stanične linije, međutim isti efekt se kod tumorskih stanica postiže tek primjenom milimolarnih koncentracija. Značajno smanjenje vijabilnosti tumorskih stanica U2OS i matičnih stanica osteosarkoma OS-CSC zabilježeno je primjenom AA u koncentracijama \geq 1mM prilikom čega vijabilnosti stanica pada ispod 50%. Primjena 10 mM koncentracije AA ubija gotovo sve stanice u uzorku. Stanice U2OS pokazale su se osjetljivijima na tretman AA dok su stanice OS-CSC nešto rezistentnije na njegovo djelovanje u odnosu na stanice HEK293. Rezistentnost je dodatno povećana dodatkom FGF-a, inače ključnog za normalan razvoj stanica. Citotoksičan učinak askorbata ispitan je i dokazan u brojnim istraživanjima na različitim vrstama tumorskim stanicama. Primjerice Chen i suradnici (2005) potvrdili su da farmakološke koncentracije askorbata raspona od 0.3 do 20 mM koncentracije pokazuju selektivan toksičan učinak na nekoliko tumorskih staničnih linija dok isti učinak na zdrave stanice nije zabilježen. Također primjenom visokih koncentracija askorbata (0.3-5mM) Deubzer i sur. (2010) uspješno su dokazali njegov citotoksičan učinak na stanice neuroblastoma, dok su Du i sur. (2010) isto pokazali tretanjem humanih stanica adenokarcinoma gušterače s 5 mM i 10 mM askorbatom.

Daljnja istraživanja potencijalnih mehanizama citotoksičnosti provedena su na stanicama U2OS i OS-CSC. Kako bi se ispitalo utječe li askorbat na redoks stanje unutar stanica mjerene su promjene u unutarstaničnoj razini ROS-a pomoću fluorescentne DCFH-DA probe. Poznato je da su tumorske stanice stalno izložene oksidacijskom stresu te su zbog nedostatka antioksidacijskih enzima vrlo osjetljive na dodatan porast razine ROS-a što posljedično može uzrokovati smrt tumorskih stanica. Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako razina ROS-a opada primjenom rastućih koncentracija nanočestica (SLN-AP i SLN-0) što se može objasniti antioksidacijskim djelovanjem AP-a koji je u njima ugrađen. Dužim izlaganjem stanica tretmanu antioksidacijski učinak postaje izraženiji. S obzirom da nanočestice pokazuju antioksidacijsko djelovanje zaključujemo da oksidacijski stres nije uzrok smanjene vijabilnosti stanica nakon primjene SLN-AP i SLN-0.

Tretman slobodnim oblikom AA nije imao značajan učinak na unutarstaničnu razinu ROS-a kod stanica U2OS te se uglavnom uočava antioksidacijsko djelovanje askorbata. Isti rezultati zabilježeni su i kod stanica OS-CSC nakon kratkotrajne izloženosti tretmanu (1 sat). Međutim dužim izlaganjem stanica OS-CSC 0.5 i 1 mM koncentracijama AA dolazi do porasta unutarstanične razine ROS-a. Do danas provedena istraživanja pokazuju različite rezultate ovisno o primjenjenoj koncentraciji askorbata. Park i suradnici (2004) promatrali su učinak 0.25-2 mM askorbata na stanice AML. Zaključili su kako porast razine ROS-a može biti posljedica oksidacije GSH do dimerizirane oksidirane forme (GSSG) odnosno iscrpljivanja GSH što rezultira nakupljanjem H_2O_2 i posljedično apoptozom. Uočeno je kako povećani unos askorbata također iscrpljuje i razinu NADPH/NADP⁺. S obzirom da su GSH i NADPH potrebni za redukciju askorbatnog radikala nazad do askorbata, njihovo iscrpljivanje dovodi do nakupljanja ROS-a u stanicama (Yun i sur. 2015). Međutim na temelju dobivenih rezultata ovog diplomskog rada učinak askorbata na porast unutarstanične razine ROS-a potrebno je dodatno ispitati.

S obzirom na rezultate testa MTT i mjerenje unutarstanične razine ROS-a tretman s 1 mM AA pokazao se optimalnim izvorom askorbata za daljne analize. Kako bi se istražio učinak askorbata na metabolizam stanica ispitalo se dolazi li do promjena u razini proteina GAPDH u stanicama OS-CSC Western blot analizom nakon tretiranja stanica askorbatom. GAPDH izabran je jer katalizira šesti korak glikolize stoga je bitan u procesu razgradnje glukoze u svrhu nastanka ATP-a te njegova inhibicija onemogućava potpuno odvijanje ciklusa glikolize. Inhibicija glikolitičkog ciklusa uzrokuje energetske krize te posljedično staničnu smrt.

Dobiveni rezultati provedenog eksperimenta pokazali su znatno smanjenje razinu proteina GAPDH u stanicama OS-CSC tretiranih 1 mM AA u odnosu na kontrolne stanice. Yun i sur. (2015) također su ispitivali učinak visokih koncentracija askorbata na protein GAPDH u stanicama kolorektalnog karcinoma s mutacijama KRAS i BRAF čiji je rast i razvoj usko ovisan o glikolitičkom ciklusu. Stanice su tretirali s 1 mM i 2 mM AA 1 sat što je dovelo do značajne promjene metaboličkog profila navedenih stanica. Zabilježeno je nakupljanje metabolita povezanih sa uzvodnim koracima glikolitičkog ciklusa poput glukoza 6-fosfata, fruktoza 6-fosfata te fruktoza-1,6-bisfosfata koji se nalaze uzvodno od GAPDH-a. Također je zabilježena smanjenja razina intermedijera glikolize nizvodno od GAPDH poput 1,3-bisfosfoglicerata, 3-fosfoglicerata, glicerol 3-fosfata te fosfoenolpiruvata bitnih za kasnije korake glikolize. Osim toga zabilježen je i porast u razini metabolita ciklusa limunske kiseline te smanjena količina metabolita pentoza fosfatnog puta nakon primjene visoke doze askorbata. Stoga se može zaključiti kako visoke koncentracije askorbata interferiraju sa energetske tokom glikolitičkog ciklusa, ali i ciklusa limunske kiseline što rezultira smanjenom proizvodnjom ATP-a (Uetaki i sur. 2015). Također, inhibicija GAPDH-a može biti posljedica povećane razine ROS-a što dovodi do promjena u samoj strukturi proteina, ali i iscrpljivanja NAD^+ (Yun i sur. 2015). S obzirom da su stanice OS-CSC tretirane 1mM AA za koju je zabilježen porast razine ROS-a u prethodnim analizama ovog rada možemo zaključiti kako je povećanje ROS-a uzrokovalo inhibiciju GAPDH-a i u ovome radu.

Diferencijacijski status osteoblasta može se pratiti ekspresijom markera osteoblastne diferencijacije poput alkalne fosfataze i kolagena tipa I u ranim fazama te pomoću koštanog sialoproteina u kasnijim fazama diferencijacije. Eksperimenti *in vitro* ukazuju da je alkalna fosfataza bitna u inicijaciji mineralizacije koštanog matriksa dok je kolagen tipa I zadužen za formaciju kolagenskih vlakana koji grade matriks, ali i za sam integritet kosti (Cao i sur. 2012; Viguet-Carrin i sur. 2006). Daljnom diferencijacijom pre-osteoblasta u potpuno diferencirane osteoblaste raste ekspresija koštanog sialoproteina, kasnog markera diferencijacije. Koštani sialoprotein ključan je ne kolageni protein koštanog ekstracelularnog matriksa s ulogom u mineralizaciji kosti te djeluje kao jezgra za stvaranje kristala hidroksiapatita, ključne građivne komponente kosti (Ogata 2008). Za potrebe analize diferencijacijskog statusa matične stanice OS-CSC tretirane su slobodnim oblikom AA 1mM koncentracije tjedan dana. Askorbat je čest dodatak mediju za usmjeravanje diferencijacije mezenhimskih matičnih stanica prema osteoblastima, stanicama koštanog tkiva (Choi i sur. 2008). Istraživanja su pokazala kako askorbat pri niskim koncentracijama potiče diferencijaciju stanica, međutim pri većim koncentracijama postaje citotoksičan (Valenti i sur. 2014).

Mehanizam citotoksičnosti zasniva se na inhibiciji ekspresije gena potrebnih za napredovanje staničnog ciklusa kao što su kinaze ovisne o ciklinu. Dobiveni rezultati pokazali su povećanu ekspresiju ranih markera diferencijacije alkalne fosfataz nakon tretmana 1mM AA te kolagena tipa I primjenom 1 mM tretmana AA (+FGF) u odnosu na odgovarajuće kontrole. Smanjena ekspresija kolagena primjenom 1 mM tretmana AA neočekivana je jer kako navode Vater i suradnici (2011) askorbat inducira sintezu kolagena djelujući kao kofaktor enzimima koji hidroksiliraju prolin i lizin u pro-kolagen. Tome u prilog ide i istraživanje koje su proveli Altaf i suradnici (2006) u kojemu navode kako se dodatkom askorbata kulturi pre-osteoblasta, sinteza kolagena povećava nekoliko dana prije nego što je vidljiva bilo kakva indukcija mRNA markera osteoblasta. Smatra se kako askorbat nema direktan učinak na markere diferencijacije već da osteogenoj diferencijaciji doprinosi upravo sekrecijom kolagena u ekstracelularni matriks (Langenbach i Handschel 2013). Ekspresija koštanog sialoproteina, kasnog markera diferencijacije, nije zabilježena u stanicama OS-CSC. Odsutnost njegove ekspresije može se objasniti prekratkim trajanjem tretmana te se stanice OS-CSC nakon tjedan dana tretiranja i dalje nalaze u ranoj fazi diferencijacije. Stoga bi se učinak askorbata na diferencijacijski status stanica OS-CSC trebao provesti tijekom duljeg vremenskog perioda kako bi se sa sigurnošću moglo zaključiti ima li askorbat učinak na ekspresiju koštanog sialoproteina kao kasnog markera diferencijacije.

6. ZAKLJUČAK

Ispitivanje i razumijevanje učinka askorbata dovelo je do napretka od njegove primjene u liječenju skorbuta do njegove potencijalne primjene u liječenju malignih oboljenja. Inhibicijski učinak farmakoloških koncentracija askorbata na tumorske stanice zabilježen je u brojnim istraživanjima. Kako bi se ostvario puni terapijski potencijal askorbata potrebno je u potpunosti razumijeti mehanizme kojima postiže svoj antitumorski učinak. Askorbat je netoksičan, lako dostupan i izrazito pristupačan, stoga ima veliki potencijal u ulozi terapeutika. Rezultati ovog diplomskog rada nude pregled nekoliko potencijalnih mehanizama antitumorskog djelovanja askorbata te mogu poslužiti u daljnim istraživanjima potencijalnih antitumorskih terapija.

Prema rezultatima ovog istraživanja možemo zaključiti sljedeće:

- Sintetizirane su čvrste lipidne nanočestice s ugrađenim askorбил palmitatom (SLN-AP) metodom mikroemulzije u vodi te su karakterizirane na temelju veličine, polidisperziteta i zeta potencijala
- Rastuće koncentracije tretmana SLN-AP i AA u slobodnom obliku uzrokovale su smanjenje stanične vijabilnosti. Citotoksičan učinak SLN-AP proizlazi iz same formulacije nanočestice stoga se SLN nisu pokazale kao dobar sustav dopreme askorbata u stanice
- Tumorske stanice U2OS pokazale su se osjetljivijima na tretman askorbatom u odnosu na stanice HEK293, dok su se matične stanice osteosarkoma OS-CSC pokazale nešto rezistentnije na navedeni tretman
- Slobodan oblik AA optimalan je izvor askorbata te se navedeni tretman koristio u daljnim analizama u svrhu ispitivanja mogućeg mehanizma kojim askorbat postiže svoj antitumorski učinak
- Askorbat utječe na metabolizam stanica smanjujući razinu proteina GAPDH ključnog u procesu glikolize
- Askorbat održava matične stanice osteosarkoma na nižem stupnju diferencijacije te doprinosi pojačanoj ekspresiji ranih markera diferencijacije dok se ekspresija kasnog markera diferencijacije nije mogla detektirati, moguće zbog prekratkog trajanja tretmana

7. LITERATURA

1. Ahmad I.M., Aykin-Burns N., Sim J.E., Walsh S.A., Higashikubo R., Buettner G.R., Venkataraman S., Mackey M.A., Flanagan S.W., Oberley L.W., Spitz D.R. (2005): Mitochondrial O₂ and H₂O₂ mediate glucose deprivation induced cytotoxicity and oxidative stress in human cancer cells. *J Biol Chem.* 280: 4254–4263.
2. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F. (2003): Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 3983–3988.
3. Altaf F.M., Hering T.M., Kazmi N.H., Yoo J.U., Johnstone B. (2006): Ascorbate-enhanced chondrogenesis of ATDC5 cells. *Eur Cell Mater.* 12: 64-70.
4. Andrisic L., Dudzik D., Barbas C., Milkovic L., Grune T., Zarkovic N. (2018): Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer. *Redox Biol.* 14: 47–58.
5. Bae D. H., Gholam Azad M., Kalinowski D. S., Lane D., Jansson P. J., Richardson D. R. (2020): Ascorbate and Tumor Cell Iron Metabolism: The evolving story and its link to pathology. *Antioxid Redox Signal.* 33(12):816-838.
6. Bhateja P., Cherian M., Majumder S., Ramaswamy B. (2019): The Hedgehog Signaling Pathway : A Viable Target in Breast Cancer? *Cancers*, 11(8): 1126.
7. Bielack S.S., Kempf-Bielack B., Delling G., Exner G.U., Flege S., Helmke K., Kotz R., Salzer-Kuntschik M., Werner M., Winkelmann W., Zoubek A., Jürgens H., Winkler K. (2002): Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol.* 20: 776–790.
8. Bonuccelli G., Francesco E.M. De, Boer R. de, Tanowitz H.B., Lisanti M.P. (2017): NADH autofluorescence, a new metabolic biomarker for cancer stem cells: Identification of Vitamin C and CAPE as natural products targeting “stemness.” *Oncotarget* 8: 20667–20678.
9. Brown M.D., Grey B., Oates J., Clarke N.W. (2010): Identification of a cancer stem cell enriched side population using Hoechst 33342 based isolation. *Cancer Stem Cells* 44.
10. Calabrese C., Poppleton H., Kocak M., Hogg T.L., Fuller C., Hamner B., Oh E.Y., Gaber M.W., Finklestein D., Allen M., Frank A., Bayazitov I.T., Zakharenko S.S., Gajjar A., Davidoff A., Gilbertson R.J. (2007): A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Cell* 11: 69–82.

11. Can A. (2008): A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turkish J. Hematol.* 25: 57–59.
12. Cao N., Liu Z., Chen Z., Wang J., Chen T., Zhao X., Ma Y., Qin L., Kang J., Wei B., Wang L., Jin Y., Yang H.T. (2012): Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. *Cell Res.* 22: 219–236.
13. Carvalho L.S., Gonçalves N., Fonseca N.A., Moreira J.N. (2021): Cancer stem cells and nucleolin as drivers of carcinogenesis. *Pharmaceuticals* 14: 1–21.
14. Chen K., Huang Y.H., Chen J.L. (2013): Understanding and targeting cancer stem cells: Therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin.* 34: 732–740.
15. Chen Q., Espey M.G., Krishna M.C., Mitchell J.B., Corpe C.P., Buettner G.R., Shacter E., Levine M. (2005): Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci.* 102: 13604–13609.
16. Choi, K. M., Seo, Y. K., Yoon, H. H., Song, K. Y., Kwon, S. Y., Lee, H. S., & Park, J. K. (2008). Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng.* 105 (6): 586-594
17. Ciardiello C., Leone A., Budillon A. (2018): The Crosstalk between Cancer Stem Cells and Microenvironment Is Critical for Solid Tumor Progression: The Significant Contribution of Extracellular Vesicles. *Stem Cells Int.* 2018, 6392198.
18. Clemente S.M., Martínez-Costa O.H., Monsalve M., Samhan-Arias A.K. (2020): Targeting Lipid Peroxidation for Cancer Treatment. *Molecules (Basel, Switzerland).* 25 (21): 5144.
19. Corpe C.P., Eck P., Wang J., Al-Hasani H., Levine M. (2013): Intestinal dehydroascorbic acid (DHA) transport mediated by the facilitative sugar transporters, GLUT2 and GLUT8. *J Biol Chem.* 288: 9092–9101.
20. Deubzer B., Mayer F., Kuçi Z., Niewisch M., Merkel G., Handgretinger R., Bruchelt G. (2010): H₂O₂ -mediated cytotoxicity of pharmacologic ascorbate concentrations to neuroblastoma cells: Potential role of lactate and ferritin. *Cell Physiol Biochem.* 25: 767–774.
21. Dick J.E. (2008): Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112: 4793–4807.
22. Du J., Cullen J.J., Buettner G.R. (2012): Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1826: 443–457.

23. Du J., Martin S.M., Levine M., Wagner B.A., Buettner G.R., Wang S.H., Taghiyev A.F., Du C., Knudson C.M., Cullen J.J. (2010): Mechanisms of ascorbate-induced cytotoxicity in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 16: 509–520.
24. Duan Y., Dhar A., Patel C., Khimani M., Neogi S., Sharma P., Siva Kumar N., Vekariya R.L. (2020): A brief review on solid lipid nanoparticles: Part and parcel of contemporary drug delivery systems. *RSC Adv.* 10: 26777–26791.
25. Falzacappa M.V.V., Ronchini C., Reavie L.B., Pelicci P.G. (2012): Regulation of self-renewal in normal and cancer stem cells. *FEBS J.* 279: 3559–3572.
26. Ferrarotto R., Mishra V., Herz E., Yaacov A., Solomon O., Rauch R., Mondshine A., Motin M., Leibovich-Rivkin T., Davis M., Kaye J., Weber C.R., Shen L., Pearson A.T., Rosenberg A.J., Chen X., Singh A., Aster J.C., Agrawal N., Izumchenko E. (2022): AL101, a gamma-secretase inhibitor, has potent antitumor activity against adenoid cystic carcinoma with activated NOTCH signaling. *Cell Death Dis.* 13: 678.
27. Foster C.S., Dodson A., Karavana V., Smith P.H., Ke Y. (2002): An introduction to stem cells. *J Pathol.* 197: 419–423.
28. Fujisawa K., Hara K., Takami T., Okada S., Matsumoto T., Yamamoto N., Sakaida I. (2018): Evaluation of the effects of ascorbic acid on metabolism of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 9: 1–12.
29. Gasch C., Ffrench B., O’Leary J.J., Gallagher M.F. (2017): Catching moving targets: Cancer stem cell hierarchies, therapy-resistance & considerations for clinical intervention. *Mol. Cancer* 16: 1–15.
30. Gopinath D., Ravi D., Rao B.R., Apte S.S., Renuka D., Rambhau D. (2004): Ascorbyl palmitate vesicles (Aspasomes): formation , characterization and applications. *Int.J. Pharm.* 271: 95–113.
31. Gorlick R., Khanna C. (2010): Osteosarcoma. *J Bone Miner Res.* 25: 683–691.
32. Hameed M., Mandelker D. (2018): Tumor Syndromes Predisposing to Osteosarcoma. *Adv Anat Pathol.* 25: 217–222.
33. Hong A.M., Millington S., Ahern V., Mccowage G., Boyle R., Tattersall M., Haydu L., Stalley P.D. (2013): Limb preservation surgery with extracorporeal irradiation in the management of malignant bone tumor : the oncological outcomes of 101 patients. *Ann Oncol.* 24: 2676–2680.
34. Huayllani M.T., Restrepo D.J., Boczar D., Sisti A., Spaulding A.C., Parker A.S., Manrique O.J., Lu X., Wilke B.K., Forte A.J. (2019): What factors define limb salvage or amputation surgery in osteosarcoma of the upper extremities? *Anticancer Res.* 39: 6807–6811.

35. Hwang N.R., Yim S.H., Kim Y.M., Jeong J., Song E.J., Lee Y., Lee J.H., Choi S., Lee K.J. (2009): Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions. *Biochem J.* 423: 253–264.
36. Jukanti, R., Devraj, G., Shashank, A. S., & Devraj, R. (2011). Biodistribution of ascorbyl palmitate loaded doxorubicin pegylated liposomes in solid tumor bearing mice. *J Microencapsul.* 28 (2): 142–149
37. Khdair A., Chen D., Patil Y., Ma L., Dou Q.P., Shekhar M.P.V, Panyam J. (2010): Nanoparticle-mediated combination chemotherapy and photodynamic therapy overcomes tumor drug resistance. *J Control Release.* 141: 137–144.
38. Koźmiński P, Halik PK, Chesori R, Gniazdowska E. (2020): Overview of Dual-Acting Drug Methotrexate in Different Neurological Diseases, Autoimmune Pathologies and Cancers. *Int J Mol Sci.* 21(10): 3483.
39. Kristl J., Volk B., Gašperlin M., Šentjunc M., Jurkovič P. (2003): Effect of colloidal carriers on ascorbyl palmitate stability. *Eur J Pharm. Sci.* 19: 181–189.
40. Kuiper C., Vissers M.C.M. (2014): Ascorbate as a cofactor for Fe-and 2-oxoglutarate dependent dioxygenases: Physiological activity in tumour growth and progression. *Front. Oncol.* 4: 1–11.
41. La Porta C. A. (2012): Thoughts about cancer stem cells in solid tumors. *World J Stem Cells.* 4 (3): 17–20.
42. Langenbach F., Handschel J. (2013): Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 4: 117.
43. Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuri M.A., Dick J.E. (1994): A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367: 645–648.
44. Lazarev V.F., Guzhova I.V., Margulis B.A. (2020): Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a Multifaceted Therapeutic Target. *Pharmaceutics*, 12(5): 416.
45. Leng Z., Yang Z., Li L., Zhong X., Zhou H., Li Y., Yang G., Zhang G., Xiong Y., Zhou T., Li J., Wang D., Li J. (2017). A reliable method for the sorting and identification of ALDH^{high} cancer stem cells by flow cytometry. *Exp Ther Med.* 14 (4): 2801–2808.
46. Li Y., Wang Z., Ajani J.A., Song S. (2021): Drug resistance and Cancer stem cells. *Cell Commun Signal.* 19: 19.

47. Liberti M. V, Locasale J.W. (2016): The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* 41: 211–218.
48. Lin P.P., Patel S. (2013): Osteosarcoma - Bone Sarcoma. 75–97.
49. Linster C.L., Schaftingen E. Van (2007): Vitamin C: Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J.* 274: 1–22.
50. Lytle N. K., Barber A. G., Reya T. (2018): Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nat Rev Cancer.* 18 (11): 669–680.
51. Macan A.M., Kraljević T.G., Raić-malić S. (2019): Therapeutic perspective of vitamin C and its derivatives. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(8), 247.
52. Majumdar S., Liu S.-T. (2020): Cell division symmetry control and cancer stem cells. *AIMS Mol Sci.* 7: 82–98.
53. Marec-Berard P., Laurence V., Ocean B.V., Ray-Coquard I., Linassier C., Corradini N., Collard O., Chaigneau L., Cupissol D., Kerbrat P., Saada-Bouzid E., Delcambre C., Gouin F., Guillemet C., Jimenez M., Lervat C., Gaspar N., Deley M.C. Le, Brugieres L., Piperno-Neumann S. (2020): Methotrexate-Etoposide-Ifosfamide compared with Doxorubicin-Cisplatin-Ifosfamide chemotherapy in osteosarcoma treatment, patients aged 18-25 Years. *J Adolesc Young Adult Oncol.* 9: 172–182.
54. Melchionda F., Oncology P., Spreafico F., Unit P.O., Hemato-oncology P., Ciceri S., Unit G.T., Medicine P., Lima M., Unit P.S., Collini P., Pession A., Massimino M., Radice P., Perotti D. (2013): Letter to the editor a novel WT1 mutation in familial Wilms tumor. *Pediatr Blood Cancer:* 1388–1389.
55. Mudalige T., Qu H., Haute D. Van, Ansar S.M., Paredes A., Ingle T. (2019): Chapter 11 - Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges. *Micro Nano Technol.* 313–353.
56. Mukherjee S., Ray S., Thakur R.S. (2009): Solid lipid nanoparticles: A modern formulation approach in drug delivery system. *Indian J Pharm Sci.* 71: 349–358.
57. Naidu K.A. (2003): Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J.* 2: 7.
58. Ogata Y. (2008): Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. *J Periodontal Res.* 43: 127–135.
59. Padayatty S.J., Levine M. (2000): Reevaluation of ascorbate in cancer treatment: emerging evidence, open minds and serendipity. *J Am Coll Nutr.* 19: 423–425.

60. Park S. (2013): The Effects of high concentrations of vitamin C on cancer cells. *Nutr.* 5: 3496–3505.
61. Park S., Han S.-S., Park C.H., Hahm E.-R., Lee S.J., Park H.K., Lee S.-H., Kim W.S., Jung C.W., Park K., Riordan H.D., Kimler B.F., Kim K., Lee J.-H. (2004): L-Ascorbic acid induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells via hydrogen peroxide-mediated mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol.* 36: 2180–2195.
62. Patel K.J., Tannock I.F. (2009): The influence of P-glycoprotein expression and its inhibitors on the distribution of doxorubicin in breast tumors. *BMC Cancer.* 9: 356.
63. Pawlowska E., Szczepanska J., Blasiak J. (2019): Pro- and Antioxidant Effects of Vitamin C in Cancer in correspondence to Its Dietary and Pharmacological Concentrations. *Oxid Med Cell Longev.* 2019, 7286737.
64. Pomella, S., Cassandri, M., Braghini, M. R., Marampon, F., Alisi, A., & Rota, R. (2022). New Insights on the Nuclear Functions and Targeting of FAK in Cancer. *Int J Mol Sci.* 23(4), 1998.
65. Potters G., Gara L. De, Asard H., Horemans N. (2002): Ascorbate and glutathione: Guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol Biochem.* 40: 537–548.
66. Roa F.J., Peña E., Gatica M., Escobar-Acuña K., Saavedra P., Maldonado M., Cuevas M.E., Moraga-Cid G., Rivas C.I., Muñoz-Montesino C. (2020): Therapeutic Use of Vitamin C in Cancer: Physiological Considerations. *Front Pharmacol.* 11: 1–8.
67. Satheesh, N. J., Samuel, S. M., & Büsselberg, D. (2020). Combination Therapy with Vitamin C Could Eradicate Cancer Stem Cells. *Biomolecules*, 10 (1): 79.
68. Savini I., Rossi A., Pierro C., Avigliano L., Catani M. V. (2008): SVCT1 and SVCT2: Key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids* 34: 347–355.
69. Savvidou I., Khong T., Cuddihy A., McLean C., Horrigan S., Spencer A. (2017): β -Catenin inhibitor BC2059 is efficacious as monotherapy or in combination with proteasome inhibitor Bortezomib in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther.* 16:1765–1778.
70. Shah R., Eldridge D., Palombo E., Harding I. (2014): Optimisation and Stability Assessment of Solid Lipid Nanoparticles using Particle Size and Zeta Potential. 25: 59–75.
71. Shi M.F., Jiao J., Lu W.G., Ye F., Ma D., Dong Q.G., Xie X. (2010): Identification of cancer stem cell-like cells from human epithelial ovarian carcinoma cell line. *Cell Mol Life Sci.* 67: 3915–3925.
72. Silva, G.M., Campos, P.M. (2000): Ascorbic acid and its derivatives in cosmetic formulations. *Cosmet Toilet.* 115: 59–62.

73. Stamford N.P.J. (2012): Stability, transdermal penetration, and cutaneous effects of ascorbic acid and its derivatives. *J Cosmet Dermatol.* 11: 310–317.
74. Sugihara E., Saya H. (2013): Complexity of cancer stem cells. *Int. J. Cancer* 132: 1249–1259.
75. Taran S.J., Taran R., Malipatil N.B. (2017): Pediatric osteosarcoma: An updated review. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 38: 33–43.
76. Taymaz-Nikerel H., Karabekmez M.E., Eraslan S., Kırdar B. (2018): Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells. *Sci Rep.* 8: 13672.
77. Valenti M.T., Zanatta M., Donatelli L., Viviano G., Cavallini C., Scupoli M.T., Carbonare L.D. (2014): Ascorbic acid induces either differentiation or apoptosis in MG-63 osteosarcoma lineage. *Anticancer Res.* 34: 1617–1628.
78. Vater C., Kasten P., Stiehler M. (2011): Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater.* 7: 463–477.
79. Viguet-Carrin S., Garnero P., Delmas P.D. (2006): The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int.* 17: 319–336.
80. Yang X., Zhu L., Wang Y., Li Y., Wang D. (2019): Current Advance of Therapeutic Agents in Clinical Trials Potentially Targeting Tumor Plasticity. 9: 1–10.
81. Yun J., Mullarky E., Lu C., Bosch K.N., Kavalier A., Rivera K., Roper J., Chio I.I., Giannopoulou E. G., Rago C., Muley A., Asara J.M., Paik J., Elemento O., Chen Z., Pappin D.J., Dow L.E., Papadopoulos N., Gross S.S., Cantley L.C. (2015): Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science.* 350 (6266): 1391–1396.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 7. studenog 1997. godine u Osijeku. Srednjoškolsko obrazovanje stekla sam pohađajući I. gimnaziju u Osijeku, koju sam završila 2016. godine. Iste godine upisala sam trogodišnji preddiplomski sveučilišni studij biologije na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Preddiplomski studij završila sam u srpnju 2019. godine čime sam stekla zvanje sveučilišnog prvostupnika biologije. Iste godine upisala sam diplomski studij Molekularna biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu koji završavam ovim diplomskim radom. Tijekom studiranja sudjelovala sam u brojnim manifestacijama i sveučilišnim aktivnostima. Odlično poznajem engleski jezik te sam tijekom srednjoškolskog obrazovanja stekla i dobro znanje njemačkog jezika. Za vrijeme izrade ovog diplomskog rada imala sam priliku steći značajno iskustvo rada u laboratoriju, a također sam se pobliže upoznala i sa brojnim molekularnim metodama.