

Utjecaj askorbinske kiseline na dinamiku rasta tumorskih sferoida dobivenih iz osteosarkoma

Ranilović, Monika

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:217:578763>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Monika Ranilović

**Utjecaj askorbinske kiseline na dinamiku
rasta tumorskih sferoida dobivenih iz
osteosarkoma**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu 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.

Želim se zahvaliti mentorici dr. sc. Ingi Urlič koja mi je omogućila izradu ovog Diplomskog rada, asistentu dr. sc. Bruni Polaku koji je započeo ovo istraživanje samnom i poučio me vještinama stanične kulture, dr. sc. Katarini Caput Mihalić i asistentici mag biol. mol. Maji Ledinski koje su nastavile rad samnom. Također se želim zahvaliti dr. sc. Maji Sabol koja je omogućila korištenje protočnog citometra na Institutu Ruđer Bošković za potrebe ovog istraživanja.

Hvala svim bližnjima i prijateljima koji su mi bili podrška tijekom studiranja!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj askorbinske kiseline na dinamiku rasta tumorskih sferoida dobivenih iz osteosarkoma

Monika Ranilović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Trenutna terapija osteosarkoma sastoji se od kemoterapije i kirurškog odstranjivanja, no nerijetko dolazi do ponovne pojave bolesti i metastaza. U tome važnu ulogu imaju tumorske matične stanice koje se iz cjelokupne populacije tumorskih stanica mogu selektivno uzgajati u neprijanjajućim uvjetima trodimenzionalne kulture. Askorbinska kiselina poznati je antioksidans, no u određenim uvjetima djeluje i pro-oksidativno. Istraživanja su pokazala da zahvaljujući još nekim svojstvima, selektivno negativno djeluje na vijabilnost različitih tumorskih stanica. Cilj istraživanja bio je testirati utjecaj tretmana askorbinskom kiselinom na subpopulaciju matičnih stanica u kulturi za uzgoj sferoida u prisutnosti i bez prisutnosti FGF2 (fibroblastnog faktora rasta 2). Tijekom 28 dana pratila sam kako tretman dvjema koncentracijama askorbinske kiseline utječe na broj i veličinu sferoida u prisutnosti i bez prisutnosti FGF2. Osim toga, testirala sam kako 24-satni tretman askorbinskom kiselinom utječe na udio apoptotskih stanica u adherentnoj kulturi osteosarkoma. Rezultati su pokazali kako tretman askorbinskom kiselinom ima negativan učinak na broj i veličinu sferoida te da prisutnost FGF2 ne sprječava takav učinak. Tretman 10 mM askorbinskom kiselinom 24 sata značajno je povećao udio stanica koje su krenule u apoptozu. Rezultati, dakle, ukazuju kako askorbinska kiselina ima negativan učinak na matične stanice osteosarkoma neovisno o prisustvu FGF2.

Ključne riječi: vitamin C, sferoidi osteosarkoma, matične stanice, 3D kultura, tretman (53 stranice, 14 slika, 7 tablica, 102 literaturna 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. Petra Peharec Štefanić
prof. dr. sc. Vesna Benković

Rad prihvaćen: 8. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

The effect of ascorbic acid on the growth dynamics of osteosarcoma-derived tumor spheroids

Monika Ranilović

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The current treatment of osteosarcoma consists of chemotherapy and surgical removal, but relapse and metastasis often occur. Here tumor stem cells have an important role. They can be selectively grown from the population of tumor cells in non-adherent conditions of three-dimensional culture. Ascorbic acid is a well-known antioxidant, but under certain conditions it acts as a pro-oxidant. Research has shown that thanks to some other properties, it has a selective negative effect on the vitality of various tumor cells. The aim of this research was to test the effect of ascorbic acid treatment on the subpopulation of stem cells in spheroid culture in the presence and without the presence of FGF2 (fibroblast growth factor 2). Over 28 days, I monitored how treatment with two concentrations of ascorbic acid affects the number and size of spheroids in the presence and absence of FGF2. In addition, I tested how a 24-hour treatment with ascorbic acid affects the proportion of apoptotic cells in an adherent osteosarcoma culture. The results showed that ascorbic acid treatment has a negative effect on the number and size of spheroids and that the presence of FGF2 does not interfere with this effect. Treatment with 10 mM ascorbic acid for 24 hours significantly increased the proportion of cells that started apoptosis. The results, therefore, show that ascorbic acid has a negative effect on osteosarcoma stem cells and that the effect is independent of FGF2 presence.

Keywords: vitamin C, osteosarcoma spheroids, stem cells, 3D culture, treatment
(53 pages, 14 figures, 7 tables, 102 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor:

Assoc. Prof. Inga Urlić, PhD

Reviewers:

Assoc. Prof. Inga Urlić, PhD

Assoc. Prof. Petra Peharec Štefanić, PhD

Prof. Vesna Benković, PhD

Thesis accepted: September 8th, 2022

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Osteosarkom.....	1
1.2 Terapija	2
1.3 Genomika ljudskog osteosarkoma	3
1.4 Matične stanice osteosarkoma.....	3
1.4.1 Karakteristike matičnih stanica osteosarkoma	5
1.4.2 Izolacija tumorskih matičnih stanica	5
1.4.3 Uzgoj sferoida.....	5
1.5 Askorbinska kiselina i osteosarkom.....	6
1.5.1 Askorbinska kiselina	6
1.5.2 Utjecaj askorbinske kiseline na tumorske stanice ili tumor u organizmu.....	8
1.5.3 Utjecaj askorbinske kiseline na stanice osteosarkoma	9
1.5.4 Utjecaj askorbinske kiseline na tumorske matične stanice	10
1.6 Uloga fibroblastnog faktora rasta 2 u uzgoju mezenhimskih matičnih stanica	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	11
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1 Stanična kultura	11
3.2 Praćenje dinamike rasta sferoida osteosarkoma u neprijanjajućoj kulturi.....	12
3.3 Praćenje površine presjeka sferoida osteosarkoma.....	13
3.4 Izolacija uzgojenih sferoida te izolacija RNA	14
3.5 Tretman DNazom i reverzna transkripcija.....	15
3.6 Analiza ekspresije markera matičnosti i osteogeneze qPCR-om.....	16
3.7 Praćenje stanične smrti protočnom citometrijom	16
3.8 Statistička obrada podataka	17
4. REZULTATI	19
4.1. Praćenje inhibicije rasta sferoida u ovisnosti o tretmanu	19
4.2 Praćenje utjecaja tretmana na površinu presjeka sferoida.....	22
4.3 Praćenje utjecaja naknadno dodanog tretmana na broj naraslih sferoida	27

4.4	Praćenje utjecaja naknadno dodanog tretmana na površinu naraslih sferoida	29
4.5	Rezultati analize ekspresije markera matičnosti i diferencijacije	32
4.6	Udio apoptotskih i mrtvih stanica nakon jednodnevnog tretmana	34
5.	RASPRAVA	36
6.	ZAKLJUČAK	42
6.	LITERATURA.....	44

Kratice:

TGF- β - transformirajući faktor rasta β , RANKL - ligand receptor aktivatora nuklearnog faktora κ B, RANK - receptor aktivator nuklearnog faktora κ B, GM-CSF - stimulirajući faktor granulocitne makrofagne kolonije, PD-1 - protein programirane stanične smrti 1, HER2 - receptor 2 ljudskog epidermalnog faktora rasta, BMP - koštani morfogenetski protein, FGF - fibroblastni faktor rasta, Runx2 - Runt-vezani transkripcijski faktor 2, Oct4 - Oktamer-vezući transkripcijski faktor 4, ALDH1 - aldehyd dehidrogenaza 1, MC - metil-celuloza, GG - gelan guma, EGF – epidermalni faktor rasta, DHA - dehidroaskorbinska kiselina, SVCT2 - natrijski transporter vitamina C, GLUT1 - glukozni transporter 1, NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, H₂O₂ – vodikov peroksid, JHDM - histonske demetilaze koje sadrže Jumonji C domenu, HIF-1 – čimbenik induciran hipoksijom, GAPDH - gliceraldehyd 3-fosfat dehidrogenaza, FGF2 - fibroblastni faktor rasta 2, FGFR1 - receptor fibroblastnog faktora rasta 1, AK – askorbinska kiselina, FBS - fetalni goveđi serum, PBS - fosfatni pufer, RNA - ribonukleinska kiselina, DNA – deoksiribonukleinska kiselina

1. UVOD

1.1 Osteosarkom

Osteosarkom je najčešći primarni nehematopoetski maligni tumor koštanog sustava za koji se smatra da nastaje od mezenhimskih stanica koje sudjeluju u stvaranju koštanog tkiva. Histološki se prepoznaje po stvaranju osteoida. Može sadržavati i druge populacije stanica s obzirom da iz multipotentnih mezenhimskih stanica nastaju i druge vrste stanica (Acchiappati i sur. 1965). U općoj populaciji od osteosarkoma godišnje u prosjeku oboli 3,1 osoba na milijun ljudi, no stopa pojavljivanja nije jednaka u svim dobnim skupinama. Najviša je kod djece i mladih odraslih sa stopom od 4,1 osobe na milijun te kod starijih od 60 godina sa stopom pojavljivanja od 4,2 osobe na milijun (Mirabello i sur. 2009). Petina pacijenata s osteosarkomom već prilikom prve dijagnoze ima prisutne metastaze, dok ih čak 80% preostalih pacijenata razvije nakon kirurškog odstranjivanja primarnog tumora (Marina i sur. 2004). Metastaze kod pacijenata kod kojih se tumor ponovo pojavio, pokazale su se puno manje osjetljive na daljnji tretman što upućuje na to da je primarna izloženost kemoterapiji omogućila selekciju onih stanica koje su rezistentne na kemoterapiju (Harris i sur. 1995). Iako se može pojaviti u bilo kojoj kosti, osteosarkom se najčešće javlja u dugim kostima udova u blizini ploče metafiznog rasta gdje je visoka stopa izgradnje i razgradnje koštanog tkiva. Najčešće se javlja u bedrenoj kosti (42%), goljeničnoj kosti (19%) i nadlaktičnoj kosti (10%) (Marina i sur. 2004; Trihia i Valavanis 2012). S obzirom da se javlja u dijelovima kosti koje karakterizira brza izgradnja i razgradnja koštanog tkiva, genetske i epigenetske promjene u proliferacijskim i diferencijacijskim putevima osteoblasta mogle bi biti uzrok pojave osteosarkoma (Haydon i sur. 2007; Thomas i Kansara 2006).

Osteosarkom ima visoki potencijal stvaranja metastaza, a u tom procesu vrlo su važne kompleksne interakcije između stanica te između stanica i matriksa. Slijed nastanka metastaze uključuje odvajanje stanice osteosarkoma od primarnog tumora, lizu koštanog matriksa, migraciju, invaziju kroz stromalno tkivo, intravazaciju i ekstravazaciju. Ulogu u tom procesu imaju stanice osteosarkoma, osteoblasti i osteoklasti (Trihia i Valavanis 2012). Na samom početku invazije otpušta se transformirajući faktor rasta β (TGF- β) iz razgrađenog koštanog matriksa i djeluje na stanice osteosarkoma te ih potiče na lučenje faktora koji stimuliraju djelovanje

osteoklasta i osteoblasta (Quinn i sur. 2001; Trihia i Valavanis 2012). Stanice osteosarkoma nezavisno i samostalno proizvode ligand receptor aktivatora nuklearnog faktora κ B (RANKL) koji se veže na receptor aktivator nuklearnog faktora κ B (RANK) na površini osteoklasta te ih aktivira. Djeluje kao glavni medijator aktivnosti i diferencijacije osteoklasta (Kinpara i sur. 2000). Aktivirani osteoklasti otpuštaju proteaze kao što je katepsin K koji je potreban za razgradnju kolagena I, osteopontina i osteonektina (Stoch i Wagner 2008).

1.2 Terapija

Danas se rutinski koristi operacija kojoj je cilj zadržati oboljeli ud kod 90%-95% pacijenata. Smatra se sigurnom, ali je vrlo zahtjevna. Osim toga, kao standardna komponenta tretmana koristi se kemoterapija i kod djece i kod odraslih. Odabir vremena primjene kemoterapije je kontroverzan, no najviše centara koristi preoperativnu kemoterapiju pogotovo kod osteosarkoma ekstremiteta gdje je cilj operacija kojom će se sačuvati ekstremitet. Značaj kemoterapije vidljiv je u činjenici da je postotak preživljenja porastao s 20% u razdoblju prije kemoterapije na 60% u razdoblju nakon primjene kemoterapije. Posebno veliki značaj ima kemoterapija kod pacijenata koji idu na operaciju u svrhu spašavanja zahvaćenog uda (Asha i sur. 2012). Trenutno najviše pacijenata prima kombinaciju doksorubicina, cisplatine i metotreksata kao prvu liniju terapije u kombinaciji s kirurškim odstranjivanjem primarnog tumora. Kod pacijenata s lokaliziranim tumorom, takav tretman omogućuje stopu od 70% petogodišnjeg preživljenja, dok je kod pacijenata s metastazama manje učinkovit i omogućuje stopu petogodišnjeg preživljenja od samo 10% - 40% (Harris i Hawkins 2022). Za tretman pacijenata s povratnim osteosarkomom istraživano je mnogo sistemskih terapija, no samo regorafenib je uniformno preporučen za korištenje u drugoj liniji terapije. Tretman visokim dozama ifosfamida s etopsidom i sorafenibom također se preporučuje u drugoj liniji terapije, ali bazirano na manje čvrstim dokazima. Više eksperimentalnih lijekova (dodataka kemoterapiji) u kliničkim fazama istraživanja pokazalo se ili nedovoljno učinkovitim ili toksičnim (Harris i Hawkins 2022). Česti problem je i balansiranje efikasnosti kemoterapije s njenim negativnim mijelosupresivnim učinkom. Kod pacijenata koji ne odgovaraju na standardnu kemoterapiju, alternativni tretman je djelovanje visokim dozama kemoterapije, a zatim autologna transplantacija matičnih stanica (Meyers 2004). Istraživanja su pokazala da takav tretman nije učinkovit jer nije povećao stopu preživljenja, a povećao je simptome uzrokovane

toksičnošću kemoterapije (Boye i sur. 2014; Fagioli i sur. 2002; Patel i sur. 2004). Različiti pokušaji imunoterapije kao što su inhalirani stimulirajući faktor granulocitne makrofagne kolonije (GM-CSF), rekombinantni interleukin 1 α s etopsidom, imunomodulator liposomalni muramil tripeptid (mifamurtid), inhibitori proteina programirane stanične smrti 1 (PD-1) i modificirane T-stanice s receptorom za antigen receptora 2 ljudskog epidermalnog faktora rasta (HER2) nisu pokazali značajnu učinkovitost (Harris i Hawkins 2022).

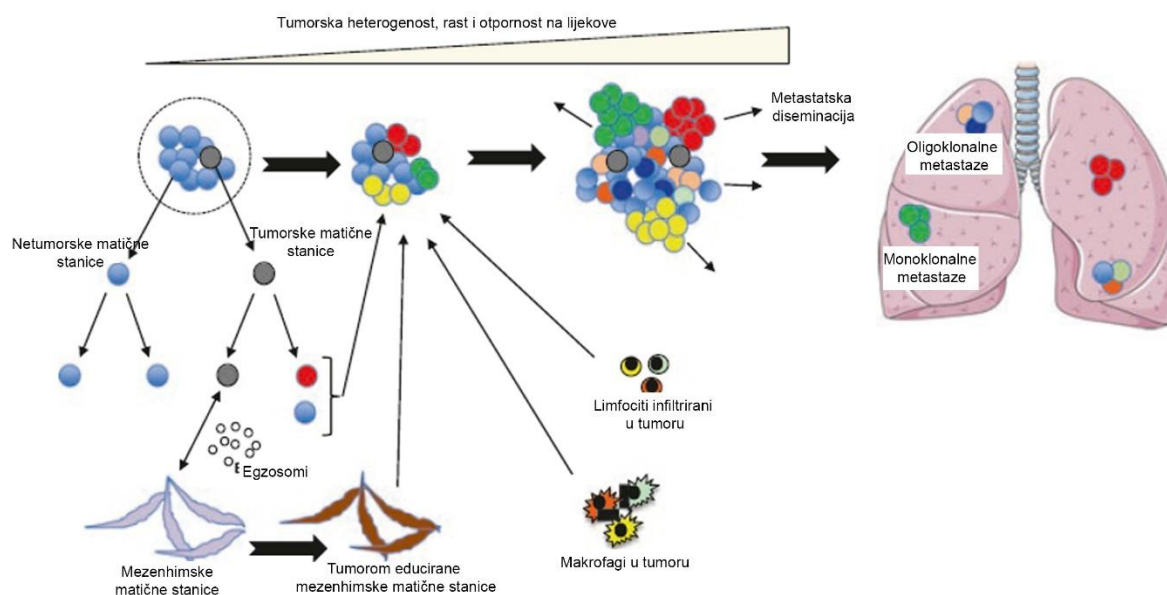
1.3 Genomika ljudskog osteosarkoma

Genom osteosarkoma vrlo je složen i nije homogen između različitih pacijenata, što se očituje u velikoj različitosti koja postoji između osteosarkoma pojedinih osoba. To je i jedan od razloga ne toliko uspješnog razvoja ciljane terapije. Osteosarkome uglavnom karakteriziraju strukturne promjene, aneuploidije te promjene u broju kopija gena, no ne postoji čvrsta povezanost s određenim onkogenom ili rearanžmanom (Kleinerman i Gorlick 2020). Postoji određena razina povezanosti sporadičnih i nasljednih osteosarkoma s mutacijama u genima Rb i p53 koji djeluju kao tumor supresori. Osobe s Li-Fraumeni sindromom (koji imaju mutaciju jedne kopije gena p53) imaju predispoziciju za razvoj osteosarkoma, dok osobe s mutacijom u genu pRb imaju čak 500 puta veći rizik (Basu-Roy i sur. 2013). Rosemann i sur. (2002) predlažu teoriju da upravo mutacije u ta dva gena u ishodišnoj stanici tumora omogućće dediferencijaciju u primitivnije stanje zbog čega stanica ima veći potencijal razviti osteosarkom. Dakle, neravnoteža između proliferacije i diferencijacije osteogenih progenitora mogla bi biti uzrok nastanka osteosarkoma. Nekoliko glavnih puteva koji kontroliraju osteogenu diferencijaciju stanica su Wnt signalni put, signalni put koštanog morfogenetskog proteina (BMP), fibroblastnog faktora rasta (FGF) i *Hedgehog* signalni put (Glass i Karsenty 2007; Luu i sur. 2007; Reya i Clevers 2005). Runt-vezani transkripcijski faktor 2 (Runx2) važan je regulator koji potiče progenitore na diferencijaciju u osteogenom smjeru preko indukcije BMP puta pri čemu se potakne i ekspresija terminalnih markera diferencijacije (Lian i sur. 2006; Nakashima i sur. 2002)

1.4 Matične stanice osteosarkoma

Hipoteza o postojanju tumorskih matičnih stanica pretpostavlja da u tumorskoj masi postoji vrlo mala subpopulacija stanica koja ima sposobnost samoobnavljanja te diferencijacije u druge

manje tumorigenične tipove tumorskih stanica (Slika 1). Smatra se da su odgovorne za održavanje tumorskog rasta, stvaranje metastaza te obnavljanje tumora nakon kemoterapije. Osim toga, eksprimiraju više transportera i proteina za popravak DNA zbog čega su uglavnom otporne na standardni tretman kemoterapijom (Basu-Roy i sur. 2013; Battle i Clevers 2017; Lytle i sur. 2018; Prasetyanti i Medema 2017). S obzirom da mogu obnoviti bilo koju vrstu tumorskih stanica, kada se inokuliraju u imunodeficientni organizam mogu stvoriti cijelu tumorsku masu (Najafi i sur. 2019). Između tumorskih matičnih stanica i njihovog mikro-okoliša u tumorskoj masi uspostavljen je dijalog. One “educiraju” okolne stanice kako bi omogućile uvjete za njihov razvoj i održavanje. Taj dijalog jedna je potencijalna meta razvoja novih lijekova (Schiavone i sur. 2019).



Slika 1. Razvoj tumorske mase iz jedne tumorske matične stanice. Određenim kancerogenim događajima jedna od netumorskih matičnih stanica postala je tumorska. Iz te stanice razvile su se sve ostale stanice tumora koje dodatno mutiraju pa nastaju zasebni subklonovi stanica. Tumorske matične stanice “educiraju” mezenhimske matične stanice kako bi one proizvodile uvjete koji održavaju i potiču matičnost. (Slika preuzeta i prevedena na hrvatski iz Schiavone i sur. (2019))

1.4.1 Karakteristike matičnih stanica osteosarkoma

Matične stanice osteosarkoma uglavnom su rezistentne na lijekove, imuno-tolerantne i imaju vrlo dug stanični ciklus. Ekspimiraju markere matičnosti kao što su Oktamer-vezući transkripcijski faktor 4 (Oct4), Nanog i Sox2 (Vallette i sur. 2019). Karakterizira ih sposobnost stvaranja sferoida *in vitro* koji su vrlo tumorigenični *in vivo* (Murase i sur. 2009; Yang i sur. 2011). Ekspimiraju visoku razinu aldehyd dehidrogenaze 1 (ALDH1) što je povezano s rezistencijom na kemoterapiju i metastatskim potencijalom (Greco i sur. 2014; Honoki 2010). S takvim svojstvima povezana je i ekspresija receptora za faktor rasta matičnih stanica (CD117) i markera mezenhimskih matičnih stanica STRO-1 (Adhikari i sur. 2010). Također ekspimiraju i CD133 (prominin-1) koji je transmembranski glikoprotein lokaliziran na staničnim izbočinama. Visoka ekspresija ovog markera povezana je s pojavom metastaza pluća i lošom prognozom (Glumac i LeBeau 2018; HE i sur. 2012). Za dediferencijaciju tumorskih stanica u matične tumorske stanice i održavanje matičnosti važni su signalni putevi TGFβ1 i Wnt/β-kenin (Lamora i sur. 2016; Zhang i sur. 2013). Za održavanje niše tumorskih matičnih stanica važan je FGF2 koji također potiče proliferaciju i mezenhimskih matičnih stanica (Dvorak i sur. 2006; Go i sur. 2007).

1.4.2 Izolacija tumorskih matičnih stanica

Najčešće metode za izolaciju tumorskih matičnih stanica iz osteosarkoma su uzgoj plutajućih 3D kolonija (sarkosfera, sferoida) u neprijanjajućim uvjetima kulture, sortiranje stanica s obzirom na ekspresiju specifičnih površinskih markera kao što su CD133, STRO1, CD117, CD271 itd., izolacija subpopulacije s visokom enzimskom aktivnošću ALDH1, izolacija subpopulacije sa sposobnošću izbacivanja fluorescentne boje pomoću ABC transportera koji su jako ekspimirani te praćenjem subpopulacije koja ekspimirira gene vezane uz svojstvo matičnosti (Adhikari i sur. 2010; Fujiwara i sur. 2014; Martins-Neves i sur. 2012; SUN i sur. 2015; WANG i TENG 2016; Yang i sur. 2011; Ying i sur. 2013; Yu i sur. 2013; Zhang i sur. 2016; Zhou i sur. 2020b).

1.4.3 Uzgoj sferoida

Uzgoj sferoida metoda je koja se koristi za obogaćivanje tumorske linije matičnim tumorskim stanicama te za karakterizaciju i istraživanje tumorskih matičnih stanica *in vitro* (Weiswald i sur. 2015). Glavna svojstva koja im omogućuju stvaranje sferoida u uvjetima

suspenzije su otpornost na apoptozu te aktivacija signalnih puteva matičnosti (Silginer i sur. 2014). Tradicionalna metoda uzgoja sferoida temelji se na neprijanjajućem sustavu kulture u suspenziji s medijom bez seruma koji sadrži faktore rasta. Takav sustav ima nekoliko nedostataka kao što su visoka cijena, niski prinos, spontana fuzija pojedinačnih sferoida te adherentni rast sferoida (Zweigerdt i sur. 2011). Spontana fuzija sferoida dovodi do diferencijacije tumorskih matičnih stanica te nestabilnosti u veličini i obliku sferoida (Zhu i sur. 2017). Proteklih godina korišteni su različiti biomaterijali kao što su hitosan-alginat, kolagen, alginat i agarozna kao trodimenzionalni matriks za uzgoj sferoida (Chen i sur. 2012; Palomeras i sur. 2016; Rao i sur. 2014; Su i sur. 2013). Zhu i sur. (2017) uspostavili su novi sustav trodimenzionalne kulture za uzgoj sferoida koji koristi dva različita biopolimera, metil-celulozu (MC) i gelan gumu (GG). MC koristi se kao zgušnjivač i stabilizator u industriji hrane, sustavima dopreme lijekova te kozmetici, dok GG stvara mrežaste strukture u hidrogelovima i koristi se također kao zgušnjivač, emulgator i stabilizator (García i sur. 2016; Pijper 1947; Vilela i Cunha 2016). Odabirom optimalnih koncentracija navedenih biopolimera, Zhu i sur. (2017) uspjeli su suprimirati spontanu fuziju i sedimentaciju sferoida. Palmi i sur. (2016) opisali su prilagođenu metodu uzgoja sferoida iz primarnih staničnih kultura dobivenih iz ljudskih biopsija osteosarkoma. Medij koji su koristili pomiješan 1:1 s 2%-tnom metil-celulozom sastoji se od 100 IU/ml penicilina, 100 µg/ml ljudskog FGF2, 20 nM progesterona, 100 µM putrescina, 30 nM natrijevog selenita, 25 µg/ml transferina, 20 µg/ml inzulina i 10 ng/mL ljudskog epidermalnog faktora rasta (EGF-a) u dva puta koncentriranom „Coon's modified Ham's F12“ mediju.

1.5 Askorbinska kiselina i osteosarkom

1.5.1 Askorbinska kiselina

L-askorbinska kiselina (AK) važan je mikronutrijent topiv u vodi koji djeluje kao antioksidans, a potreban je i za mnoge enzimatske reakcije (Golde 2003). Mogu ga sintetizirati više biljke i većina životinja iz glukoze, no ljudi su izgubili tu sposobnost zbog nedostatka gena za L-gulonolakton oksidazu koja je važna za zadnji korak u sintezi (Bánhegyi i sur. 1997; Gillberg i sur. 2018). Djeluje kao kofaktor Fe^{2+} i α -ketoglutarat ovisnih dioksigenaza (Gillberg i sur. 2018), a također može pojačati aktivnost histonskih demetilaza koje sadrže domenu Jumonji C i TET (deset-jedanaest translokacija) DNA hidroksilaza i tako utjecati na demetilaciju deoksiribonukleinske

kiseline (DNA) i histona (Cimmino i sur. 2018). Osim toga, AK katalizira enzimsku posttranslacijsku modifikaciju prokolagena. Potrebna je kao kofaktor u reakcijama hidroksilacije prolina i lizina u aminokiselinskom slijedu prokolagena kako bi nastao kolagen (Kivirikko i Myllylä 1985; Peterkofsky 1991). Nedostatak AK uzrokuje bolest skorbut koja može biti i smrtonosna, a liječi se uzimanjem AK (Padayatty i Levine 2016).

AK smatra se antioksidansom jer ima dva elektrona koja može otpustiti i reducirati drugu molekulu, no u određenim uvjetima može djelovati i tako da poveća stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta. Kad se nalazi u blizini metalnih iona kao što su ioni željeza ili bakra može ih reducirati pri čemu nastaju superoksid i vodikov peroksid što dovodi do stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta. Ta pojava događa se u organizmu kod farmakoloških koncentracija AK koje se mogu postići u plazmi i izvanstaničnoj tekućini (Parrow i sur. 2013). Reducirano željezo može reagirati s vodikovim peroksidom u Fentonovoj reakciji pri čemu nastaje hidroksilni radikal (Ngo i sur. 2019). Kad AK izgubi jedan elektron, nastaje radikal AK koji traje čak nekoliko sekundi do minuta ovisno o prisutnosti kisika i akceptora elektrona (Buettner 1993). Kad izgubi drugi elektron nastaje dehidroaskorbinska kiselina (DHA) koja je puno stabilniji oblik od radikala AK (Rumsey i sur. 1997, 2000).

AK apsorbira se iz tankog crijeva, a maksimalna koncentracija u plazmi postiže se otprilike 120-180 minuta nakon unošenja (Corpe i sur. 2013). Nakon apsorpcije, prenosi se krvlju jer je topiva u vodi i raspoređuje u izvanstanične prostore. Tkiva akumuliraju AK uglavnom preko natrijskog transportera vitamina C (SVCT2). Koncentracija u tkivima je često puno viša od onog koliko je potrebno za funkciju koenzima (milimolarne koncentracije). Takva prekomjerna količina AK vjerojatno služi kao rezerva ili ima neku drugu nepoznatu funkciju (Padayatty i Levine 2016). Normalna koncentracija AK u plazmi je 0,70-1,40 mg/dl, a nakon oralnog unosa može postići razinu od 1,3-4,0 mg/dl. Intravenoznim unosom može se postići koncentracija od čak 350 mg/dl (19,87 mmol/l) (Carr i Cook 2018).

1.5.2 Utjecaj askorbinske kiseline na tumorske stanice ili tumor u organizmu

Cameron i Pauling (1978) zaključili su da je tretman s 10 g AK na dan kod pacijenata s neizlječivim tumorom produžio vrijeme preživljenja čak 3 puta kod 90% pacijenata, dok je kod preostalih 10% produžio čak 20 puta.

Predloženo je nekoliko mogućih molekularnih mehanizama citotoksičnog djelovanja AK na tumorske stanice kada je primijenjena zasebno ili u kombinaciji s drugim kemoterapeutcima. Jedan od tih mehanizama je prooksidativno djelovanje stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta (Oka i sur. 2020). Dvije karakteristike tumorskih stanica čine ih podložnima na prooksidativno djelovanje AK, a to su visoki sadržaj željeznih iona te pojačan unos glukoze glukoznim transporterima 1 (GLUT1) (DeBerardinis i Chandel 2016; Ngo i sur. 2019; Torti i Torti 2013). Zbog strukturne sličnosti DHA i glukoze, DHA se može u tumorske stanice unositi preko transportera za glukozu čija ekspresija je često pojačana. Nakon unosa, DHA se ponovo reducira u AK pomoću glutationa i nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH), čime se troše unutarstanični antioksidansi i dolazi do porasta razine reaktivnih kisikovih vrsta (Ngo i sur. 2019). U usporedbi s normalnim stanicama, većina tumorskih stanica ima povišenu razinu i potrebu za unutarstaničnim željezom zbog pojačanog rasta i proliferacije (Torti i Torti 2013). Prisutnost nestabilnog željeza potiče prooksidativno djelovanje AK potičući stvaranje vodikovog peroksida (H_2O_2). Vodikov peroksid koji nastane može zatim reagirati s nestabilnim željezom pri čemu u Fentonovoj reakciji nastaje hidroksilni radikal koji može dodatno pojačati farmakološku toksičnost AK u tumorskim stanicama (Chen i sur. 2005). Hidroksilni radikali su reaktivniji od H_2O_2 pa jače uzrokuju oštećenja DNA, lipida i proteina (Torti i Torti 2013).

Sljedeći predloženi mehanizam je utjecaj na razinu metilacije genoma. DNA metilacija povezana je s regulacijom genske ekspresije i utišavanjem gena. Hipermetilacija u promotorskim regijama nekih gena za tumorske supresore dovodi do njihovog utišavanja. (Kulis i Esteller 2010). Članovi obitelji TET kataliziraju sukcesivnu hidroksilaciju 5-metilcitozina, odnosno demetiliraju DNA (Melamed i sur. 2018). Povišena koncentracija AK pojačava enzimatsku aktivnost histonskih demetilaza koje sadrže Jumonji C domenu (JHDM) i TET, što dovodi do smanjenja histonske i DNA metilacije (Satheesh i sur. 2020). Lee Chong i sur. (2019) predlažu da bi AK, u kombinaciji s terapijom koja također djeluje na epigenetsku regulaciju, u tumorskim stanicama mogao povratiti

normalno epigenetsko stanje koje je kod tumorskih stanica promijenjeno te vratiti normalan diferencijacijski potencijal i ekspresiju tumor supresora.

Još jedan mehanizam kojim AK utječe na tumorske stanice je utišavanje podjedinice čimbenika inducirano hipoksijom (HIF-1) pomoću hidrolaza koje su ovisne o njoj kod uvjeta normalne razine kisika (Kuiper i Vissers 2014; Mastrangelo i sur. 2018). HIF-1 je heterodimerni transkripcijski faktor koji je važan za epitelno-mezenhimalnu tranziciju, angiogenezu, održavanje matičnih stanica, metastaziranje i rezistenciju tumorskih stanica (Mastrangelo i sur. 2018; Semenza 2012). Kod hipoksičnih uvjeta kakvi su često prisutni u tumorima (Mastrangelo i sur. 2018), smanjuje se hidroksilacija HIF-1 što dovodi do pojačanja transkripcije gena reguliranih tim faktorom, a time i do neoangiogeneze i progresije tumora (Kuiper i Vissers 2014; Mastrangelo i sur. 2018).

1.5.3 Utjecaj askorbinske kiseline na stanice osteosarkoma

Istraživanje Oka i sur. (2020) pokazalo je da AK u kombinaciji sa cisplatinom pojačava djelovanje same cisplatine, odnosno pojačava supresiju stanične vijabilnosti i proliferacije tako što uzrokuje pojačano stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta, oštećenja DNA, mitohondrijsku disfunkciju i promjene u metabolizmu. Osim toga, kod U2OS stanica koje su rezistentne na tretman cisplatinom, AK je djelovala tako što je povratila njihovu osjetljivost. Zhou i sur. (2020a) pokazali su da tretman AK značajno povećava razinu vodikovog peroksida u stanicama osteosarkoma. Zaključili su kako željezo ima vrlo važnu ulogu u mehanizmu toksičnosti AK te da s povećanjem razine unutarstaničnog željeza raste i razina toksičnosti AK u tumorskim stanicama. Valenti i sur. (2014) istražili su utjecaj tretmana AK na MG-63 staničnu liniju osteosarkoma te zaključili kako niske koncentracije potiču diferencijaciju i proliferaciju navedenih stanica, dok visoke doze mogu inducirati apoptozu. U skladu s time, Fernandes i sur. (2017) pokazali su da visoka doza AK inhibira rast i potiče apoptozu stanične linije osteosarkoma G292, a niska koncentracija potiče diferencijaciju i metaboličku aktivnost. Kod tretmana niskom dozom došlo je do povećanja aktivnosti alkalne fosfataze i mineralizacije, dok je kod visoke doze došlo do njenog smanjenja. S obzirom da alkalna fosfataza djeluje kao marker diferencijacije osteoblasta, zaključili su kako niska doza potiče, a visoka doza inhibira diferencijaciju osteoblasta. Doza AK kod koje su zabilježeni antiproliferativni, antidiferencijacijski i proapoptotski efekti je 1000 μM (Fernandes i sur. 2017).

1.5.4 Utjecaj askorbinske kiseline na tumorske matične stanice

Oka i sur. (2020) pokazali su kako tretman kombinacijom cisplatine i AK uzrokuje smanjeno stvaranje sferoida U2OS stanica. Dakle, tretman je vjerojatno djelovao i na supresiju proliferacije matičnih tumorskih stanica. Kao mogući mehanizam predložili su sinergistički supresijski efekt cisplatine i AK na mitohondrijsku aktivnost koja je kod populacije matičnih tumorskih stanica značajna. Bonuccelli i sur. (2017) pokazali su na MCF7 staničnoj liniji raka dojke da AK kao inhibitor glikolize smanjuje matičnost u testu stvaranja mamosfera s IC_{50} vrijednošću 1 mM. Također, pokazalo se da je tretman doksiciklinom i AK u kombinaciji efektivan u uništavanju tumorskih matičnih stanica jer doksiciklin inhibira mitohondrijsku biogenezu i oksidativnu fosforilaciju, dok AK inhibira glikolizu preko inhibicije gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) (De Francesco i sur. 2017). Tretman hepatocelularnog karcinoma *in vivo* s AK utjecao je na smanjenje sposobnosti samoobnavljanja i preživljavanja tumorskih matičnih stanica te na smanjenje ekspresije gena povezanih s matičnošću (Lv i sur. 2018). Dakle, postoje istraživanja čiji rezultati pokazuju kako tretman AK ima određeni učinak na tumorske matične stanice različitih vrsta raka. Nije dovoljno istraženo kakav utjecaj ima tretman AK na tumorske matične stanice osteosarkoma i potrebno je više istraživanja u tome području.

1.6 Uloga fibroblastnog faktora rasta 2 u uzgoju mezenhimskih matičnih stanica

Fibroblastni faktor rasta 2 (FGF2) protein je iz obitelji FGF proteina. Svoje djelovanje postiže vežući se na tirozin-kinazne receptore fibroblastnog faktora rasta čime započinje stanično provođenje signala (Powers i sur. 2000). Tsutsumi i sur. (2001) pokazali su da FGF2 potiče proliferaciju mezenhimskih matičnih stanica te da njegova prisutnost omogućuje očuvanje multipotentnog potencijala mezenhimskih matičnih stanica tijekom velikog broja mitotskih diobi. Iz tog razloga, FGF2 koristi se kao uobičajeni dodatni faktor u uzgoju adultnih matičnih stanica (Zaragosi i sur. 2006). Dombrowski i sur. (2013) pokazali su kako blokiranje receptora 1 fibroblastnog faktora rasta (FGFR1) uzrokuje smanjenu proliferaciju i onemogućuje prelazak iz G1 u S fazu staničnog ciklusa kod mezenhimskih matičnih stanica dobivenih iz koštane srži. FGF2 vjerojatno pospješuje proliferaciju putem aktivacije kinaza reguliranih izvanstaničnim signalima (ERK) te omogućuje zadržavanje multipotentnosti aktivacijom Sox2 (Coutu i Galipeau 2011). Zhang i sur. (2018) pokazali su da je nedostatak FGF2 gotovo potpuno onemogućio stvaranje

tumorskih sferoida MG-63 stanične linije osteosarkoma, dok je kombinacija nutrijenta B27 izoliranog iz seruma i FGF2 bez ostalih faktora omogućila stvaranje tumorskih sferoida iste stanične linije. Dakle, FGF2 potiče proliferaciju i održavanje multipotentnog potencijala mezenhimskih matičnih stanica, a takav efekt pokazan je i na stanicama osteosarkoma. Iz tog razloga, prisutnost FGF2 u kulturi mogla bi oprečno djelovati od djelovanja AK za koju istraživanja pokazuju suprotna djelovanja.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja istražiti je utjecaj tretmana AK na matične stanice osteosarkoma te testirati utječe li prisutnost FGF2 na njen učinak. Točnije specifični ciljevi su:

1. istražiti inhibira li dodatak AK (1 mM i 10 mM) rast sferoida osteosarkoma, utječe li na površinu njihova presjeka te ima li prisutnost FGF2 učinak na utjecaj AK
2. istražiti kako dodatak AK (1 mM i 10mM) utječe na kretanje broja već naraslih sferoida, površinu njihova presjeka te utječe li prisutnost FGF2 na taj učinak
3. istražiti mehanizam djelovanja AK na matične stanice osteosarkoma određivanjem vijabilnosti/stanične smrti te analizom matičnosti/diferencijacije nakon tretmana

Hipoteza je da će tretman AK inhibirati rast i proliferaciju sferoida koje formiraju matične stanice osteosarkoma, da će inducirati njihov gubitak matičnosti i apoptozu te da će takav učinak biti jači kod tretmana većom koncentracijom AK. S obzirom da je FGF2 neophodan za održavanje matičnosti stanica mezenhimskog porijekla, pretpostavljam da će prisutnost FGF2 ublažiti djelovanje AK zbog svog oprečnog djelovanja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Stanična kultura

U istraživanju sam koristila matične stanice osteosarkoma prve generacije porijeklom od dva različita pacijenta. Te stanice prethodno su dobivene tako što su tumorske stanice osteosarkoma pojedinog pacijenta nasađene u adherentnu kulturu, a zatim u kulturu za uzgoj sferoida. Uzgojeni sferoidi su izolirani te ponovo nasađeni u adherentnu kulturu. Na taj način

dobivene su matične stanice osteosarkoma prve generacije pojedinog pacijenta. Istraživanje na ovim stanicama odobreno je od Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice (broj odobrenja: EP-16841/17-7).

3.2 Praćenje dinamike rasta sferoida osteosarkoma u neprijanjajućoj kulturi

Matične stanice osteosarkoma prve generacije dobivene od dva različita pacijenta uzgojila sam u adherentnoj kulturi u hranjivom mediju Coon's F12 Ham (Sigma-Aldrich) s 10%-tnim fetalnim goveđim serumom (FBS-om) te penicilinom (100 IU/ml) i streptomycinom (100 µg/ml) (Capricorn Scientific) uz dodatak FGF2 (10 ng/ml) („Gibco™ Human FGF-basic (FGF-2/bFGF) (aa 10-155) Recombinant Protein). Za eksperiment nasadila sam ih u pločicu s 24 jažice s neprijanjajućim dnom u kulturu za uzgoj sferoida. Medij za uzgoj sferoida pripremila sam tako što sam pomiješala hranjivi medij Coon's F12 Ham koji je dva puta koncentriran i sadrži faktore bitne za uzgoj sferoida (prema Palmi i sur. 2016) s metil-celulozom (2%-tnom) u omjeru 1:1. U svaku jažicu nasadila sam 10000 stanica u 1 mL medija s metil-celulozom. Imala sam 4 eksperimentalne skupine koje sam odmah u trenutku nasađivanja tretirala dvjema različitim koncentracijama AK (konačne koncentracije 1 mM i 10 mM) u prisutnosti i bez prisutnosti FGF2 te dvije kontrolne skupine koje nisam tretirala AK u prisutnosti i bez prisutnosti FGF2. Osim toga, imala sam još 4 eksperimentalne skupine u koje sam tretman dviju različitih koncentracija AK dodala 19. dan nakon nasađivanja u sferoide koji su rasli u prisutnosti i bez prisutnosti FGF2 kako bih testirala utjecaj tretmana na već postojeće sferoide. Svaka eksperimentalna skupina sadržavala je po dvije jažice, a kontrolne skupine po četiri jažice. Za bolje razumijevanje i pregled, sve skupine su navedene u Tablici 1 s pripadajućim oznakama i objašnjenjima.

Tablica 1. Prikaz eksperimentalnih i kontrolnih skupina u eksperimentu praćenja dinamike rasta sferoida osteosarkoma uz tretman AK.

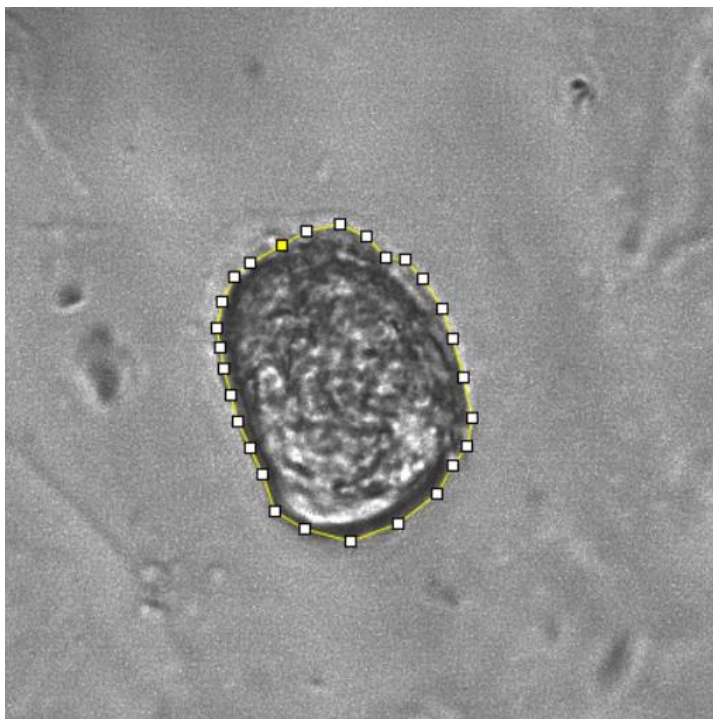
Oznaka skupine	Tretman AK	Prisutnost FGF2 (+ ili -)	Vrijeme prvog tretmana
10 mM AK +FGF2	10 mM	+	0. dan
10 mM AK - FGF2	10 mM	-	0. dan
1 mM AK +FGF2	1 mM	+	0. dan
1 mM AK - FGF2	1 mM	-	0. dan
10 mM AK 20d +FGF2	10 mM	+	19. dan
10 mM AK 20d - FGF2	10 mM	-	19. dan
1 mM AK 20d + FGF2	1 mM	+	19. dan
1 mM AK 20d - FGF2	1 mM	-	19. dan
KONTR + FGF2	-	+	-
KONTR - FGF2	-	-	-

Tijekom 28 dana brojala sam narasle sferoide u pojedinim jažicama svaka 2 ili 3 dana pomoću svjetlosnog mikroskopa (Zeiss Axiovert 40 CFL) na povećanju 100 puta. S obzirom da je na takvom povećanju teže razlikovati rane stadije sferoida od pojedinačnih stanica, pridržavala sam se subjektivnog kriterija da brojim samo one sferoide koji su veći od približno 120 μm . Tijekom eksperimenta u jažice nisam naknadno dodavala medij, FGF2 sam dodavala dva puta tjedno, a AK jednom tjedno.

3.3 Praćenje površine presjeka sferoida osteosarkoma

Od 11. dana nakon nasađivanja počela sam pratiti i površinu presjeka ponajvećih sferoida iz svake jažice tako što sam prilikom brojanja fotografirala najmanje 3, a najčešće i više najvećih sferoida iz svake eksperimentalne skupine. Ukoliko je u pojedinoj skupini bilo manje od tri sferoida koja sam brojala tada sam fotografirala samo njih (manje od tri). Fotografije sferoida kasnije sam analizirala u programu ImageJ kako bih fotografiranim sferoidima odredila površinu presjeka. U ImageJ programu prvo sam odredila mjernu skalu tako što sam odabrala alat za povlačenje ravnih linija, povukla ravnu liniju preko mjerila na fotografiji za koje znam da predstavlja dužinu od 200

μm , a zatim kliknula na *Analyze > Set Scale*. Pod *Known distance* upisala sam broj 200, a pod *Unit of length* μm . Nakon toga otvarala sam pojedinačne fotografije te na svakoj pomoću alata *Polygon selections* obrubila željeni sferoid kao na Slici 2 te odabrala *Analyze > Measure* gdje sam očitala vrijednost *Area*.



Slika 2. Odabrani sferoid pomoću alata *Polygon selections* u svrhu mjerenja površine presjeka u programu ImageJ

3.4 Izolacija uzgojenih sferoida te izolacija RNA

Nakon 28 dana praćenja broja i veličine uzgojenih sferoida u trodimenzionalnoj kulturi, izolirala sam sferoide iz pojedinih skupina koristeći filtere pora $40\ \mu\text{m}$ kako bih ih barem djelomično odvojila od medija i metil-celuloze u kojoj su rasli. Sferoide sam jednom ili dva puta isprala fosfatnim puferom (PBS-om) po potrebi. Nisam previše ispirala kako ih ne bih uništila. Izolirane sferoide u PBS-u držala sam na ledu. Ribonukleinsku kiselinu (RNA) iz sferoida izolirala sam pomoću reagensa Trizola. Sferoide u PBS-u centrifugirala sam 5 min na 300 g, a zatim isisala PBS. Na talog sam dodala po 0,8 ml Trizola, resuspendirala, prebacila u epicu od 2 ml te inkubirala 5 minuta na sobnoj temperaturi. Dodala $160\ \mu\text{l}$ kloroforma i rukom tresla 15 sekundi te inkubirala 2 minute na sobnoj temperaturi. Uzorke sam ponovo centrifugirala 15 min na 12000g na sobnoj

temperaturi. Nakon što se sadržaj odvojio u dva sloja, gornji vodeni sloj prebacila sam u novu epicu te u nju dodala 0,5 μ l glikogena (5-10 μ g) i 400 μ l izopropanola. Inkubirala sam 10 minuta na sobnoj temperaturi, a nakon toga centrifugirala 10 minuta na 12000 g. Nakon centrifugiranja, izbacila sam tekuću fazu, a zadržala talog. Na talog sam dodala 0,8 ml 80%-tnog etanola, vorteksirala te centrifugirala 5 minuta na 7500g na sobnoj temperaturi. Etanol sam odlila i ponovo zadržala talog. Talog sam osušila na zraku i otopila u 50 μ l vode bez RNaza. Uzorke sam pospremila na -20°C. Koncentraciju i čistoću izolirane RNA u svakom uzorku izmjerila sam pomoću uređaja za mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina i čistoće (NanoDrop - Thermo Scientific) na temelju mjerenja apsorbancije otopine na valnim duljinama 260 nm, 280 nm i 230 nm.

3.5 Tretman DNazom i reverzna transkripcija

Tretman uzoraka DNazom napravila sam pomoću „DNase I, RNase-free“ (Thermo Scientific) kita prema protokolu proizvođača. U svaku (duplu) reakciju dodala sam takav volumen uzorka RNA da masa dodane RNA bude 51,2 ng. Tretman DNazom za dvije negativne kontrole reverzne transkripcije napravila sam sa dva uzorka koja su imala najveću koncentraciju RNA od svakog pacijenta. Za njih sam pripremila jednostruku količinu reakcije pa sam u svaku dodala takav volumen uzorka da masa dodane RNA bude 25,6 ng.

Reverznu transkripciju provela sam pomoću „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-a“ (ThermoFisher Scientific) prema protokolu proizvođača. Pripremila sam duplu količinu reakcije za svaki uzorak tako što sam u svaku reakciju dodala cijeli uzorak nakon tretmana DNazom (22 μ L), 4 μ L 10x RT pufera, 1,6 μ L 25x dNTP miksa, 4,0 μ L 10x nasumičnih početnica, 2 μ L MultiScribe reverzne transkriptaze, 2 μ L inhibitora RNaza te 4,4 μ L vode bez nukleaza. Za dvije negativne kontrole reverzne transkripcije pripremila sam dvije jednostruke reakcije tako što sam u pojedinu reakciju dodala 11 μ L reakcije iz tretmana DNazom tog uzorka te sve ostale navedene sastojke osim reverzne transkriptaze. Umjesto 1 μ L reverzne transkriptaze u svaku reakciju sam dodala za 1 μ L više vode bez nukleaza. Napravila sam dvije negativne kontrole reverzne transkripcije, po jednu za svakog pacijenta. Pripremljene reakcije stavila sam u PCR uređaj na program prema protokolu proizvođača.

3.6 Analiza ekspresije markera matičnosti i osteogeneze qPCR-om

Kako bih odredila razinu ekspresije gena za alkalnu fosfatazu, kolagen, Sox2 i Oct4 provela sam kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom (qPCR) pomoću „Power SYBR Green PCR Master Mix-a“ (Applied Biosystems) prema protokolu proizvođača. Za uspoređivanje ekspresije gena koristila sam $\Delta\Delta C_t$ metodu, a kao endogeni kontrolni gen koristila sam gen za β -aktin. Pojedinu reakciju u qPCR-u pripremila sam tako što sam dodala 10 μ L Power SYBR Green Master Mix-a, 4 μ L otopine *forward* i *reverse* početnica (koncentracije 25 μ M), 2 μ L kalupa dobivenog reverznom transkripcijom te 4 μ L vode bez nukleaza. Za svaki uzorak pripremila sam 3 replike za svaki gen. Također, pripremila sam dvije vrste negativnih kontrola. Jedna negativna kontrola sadržavala je uzorak iz reverzne transkripcije gdje nije dodana reverzna transkriptaza (negativna kontrola reverzne transkripcije). Pripremljena je s početnicama za gen β -aktina (ACTB) te je pripremljena u triplikatu. Zatim, pripremila sam negativne kontrole za svaki gen u triplikatu tako što sam u reakciju dodala vodu bez nukleaza umjesto kalupa. qPCR provela sam na programu: 95 °C – 10 min, 45 ciklusa: (95 °C – 15 s, 52 °C – 30 s, 72 °C – 30s). U Tablici 2 navedene su početnice koje su korištene za pojedini gen.

Tablica 2. Popis korištenih početnica za umnažanje gena ALPL, COL1A1, SOX2, POU5F1 i ACTB te odgovarajućih temperatura taljenja.

GEN	<i>Forward</i> početnica	<i>Reverse</i> početnica	Tm / °C
ALPL	5'-CTGTTTACATTTGGATAC-3'	5'-ATGGAGACATTCTCGTTC-3'	40,6
COL1A1	5'-GCTATGATGAGAAATCAACCG-3'	5'-TCATCTCCATTCCAGG-3'	49,3
SOX2	5'-ATAATAACAATCATCATCGGCGG-3'	5'-AAAAAGAGAGAGGCAAACCTG-3'	52
POU5F1	5'-GATCACCTGGGATATACAC-3'	5'-GCTTTGCATATCTCCTGAAG-3'	49,8
ACTB	5'-GACGACATGGAGAAAATCTG-3'	5'-ATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'	50,9

3.7 Praćenje stanične smrti protočnom citometrijom

Za eksperiment praćenja udjela stanica koje odlaze u staničnu smrt u ovisnosti o tretmanu AK, nasadila sam stanice svakog pacijenta u 6 Petrijevih zdjelica u adherentnu kulturu. U svaku zdjelicu nasadila sam po 500 000 stanica u 10 ml medija Coon's F12 Ham te dodala 1 μ l FGF2.

Stanice sam stavila u inkubator na 37 °C i 5% CO₂. Treći dan nakon nasađivanja stanice sam tretirala. Imala sam četiri eksperimentalne skupine (tretirane 1 mM i 10 mM AK u prisutnosti i bez prisutnosti FGF2) te dvije kontrolne skupine (netretirane u prisutnosti i bez prisutnosti FGF2). Stanice sam tretirala tako što sam im odsisala medij u kojem su rasle 3 dana te dodala novi medij s odgovarajućim tretmanom AK koji sam prethodno pripremila. U skupine koje imaju tretman u prisutnosti FGF2 dodala sam i 1 µl FGF2 u medij, a kod skupina koje imaju tretman bez prisutnosti FGF2, nisam ga dodala. Na kontrolne skupine stanica dodala sam samo medij bez AK te FGF2 u jednu skupinu, a u drugu ne. Stanice sam ponovo stavila u inkubator na 24 sata. Sljedeći dan odsisala sam medij i stanice isprala s 10 ml PBS-a. Odvojila sam ih od podloge pomoću 1ml tripsina (Trypsin-EDTA (0,25%) u DPBS-u (1x) (Capricorn Scientific)), a tripsin blokirala s 5 ml medija. Stanice sam iz Petrijevih zdjelica premjestila u zasebne „falconice“ za pojedinu skupinu te ih centrifugirala 5 minuta na 1300g. Odsisala sam medij iznad taloga, a na talog dodala 1 mL medija i resuspendirala. Uzorke sam čuvala na ledu. Nastavak eksperimenta provela sam zajedno s profesoricom i asistenticom na Institutu Ruđer Bošković. U svaki uzorak od 100 µL dodale smo 100 µL reagensa iz „Muse Annexin V & Dead Cell Kit-a“ koji obilježava stanice koje na svojoj površini imaju aneksin V (stanice u apoptozi) i boja mrtve stanice. Uzorci su se tako inkubirali 20 minuta. Nakon 20 minuta krenule smo mjeriti udio pojedine vrste stanica (živih, mrtvih, ranih i kasnih apoptotskih) pomoću protočnog citometra Guava® Muse® Cell Analyzer prema odgovarajućem protokolu proizvođača. Mjerenje iz svakog uzorka ponovile smo tri puta. Rezultate mjerenja obradila sam u programu „Muse 1.9 Analysis“ tako što sam na rezultate svih uzoraka primijenila iste postavke vratiju (granice koje određuju koje područje detekcije će biti brojano kao određena vrsta stanice).

3.8 Statistička obrada podataka

Sakupljene podatke o broju sferoida za pojedinu skupinu u pojedinom danu uprosječila sam, a dobivene prosječne vrijednosti prikazala na grafu u ovisnosti o danu brojanja. Na isti način, uprosječila sam i prikazala podatke o površini sferoida iz pojedine skupine. Za računanje prosjeka površine koristila sam izmjerene površine 4 najvećih sferoida iz pojedine eksperimentalne skupine (bez obzira što neke skupine imaju i više od 4 fotografirana sferoida) jer bi korištenje nejednolikog broja fotografiranih sferoida snizilo prosjek onim skupinama koje imaju više fotografija. Za

statističku analizu podataka koristila sam program „IBM SPSS Statistics“. Razlike u dobivenim vrijednostima između pojedinih skupina testirala sam za svaki dan brojanja posebno pomoću *Two-way ANOVA* testa. Kako bih provjerila jesu li zadovoljene pretpostavke za provođenje navedenog testa testirala sam normalnu distribuciju podataka i homoscedastičnost. Jesu li podaci normalno distribuirani testirala sam pomoću testa Shapiro-Wilk u pojedinoj skupini. Ukoliko je statistička značajnost testa bila veća od 0,05, nisam odbacila H_0 hipotezu, tj. prihvatila sam hipotezu da su podaci u toj skupini normalno distribuirani. U eksperimentalnim skupinama nisam mogla provesti taj test jer imaju manje od 3 replike. Za njih sam pretpostavila da su podaci jednako distribuirani kao i u kontrolnim s obzirom da sadrže stanice iz iste populacije. Zatim sam testirala homoscedastičnost podataka između skupina u svakom danu pomoću Levene-ovog testa. Ukoliko je test pokazao statističku značajnost manju od 0,05 odbacila sam H_0 hipotezu te prihvatila hipotezu da podaci nisu homoscedastični. *Two-way ANOVA* analizu provela sam samo za one dane gdje su testirani podaci bili homoscedastični. Dvije nezavisne varijable bile su prisutnost FGF2 (s vrijednostima: prisutan i nije prisutan) te koncentracija AK (s vrijednostima: 0 mM, 1mM i 10 mM), dok je zavisna varijabla bila broj sferoida u eksperimentima brojanja sferoida, a površina presjeka sferoida u eksperimentima mjerenja površine. *Post-hoc* test koji sam koristila je Tukey. Ukoliko su rezultati *Two-way ANOVA-e* pokazali kako postoji interakcija između utjecaja dviju nezavisnih varijabli, tada sam provela test *Simple Main Effects* uz Sidak korekciju kako bih usporedila razlike između vrijednosti dobivenih uz različite kombinacije nezavisnih varijabli. Rezultati su prikazani i analizirani za svakog pacijenta posebno jer stanice ova dva pacijenta općenito rastu različitom brzinom i uspješnošću, što bi vjerojatno uzrokovalo neusporedivost podataka na tako maloj skupini koja bi se sastojala od dva pacijenta. Također, replike (različite jažice) porijeklom iz jednog pacijenta obradila sam kao biološke replike pa ne mogu kombinirati podatke navedene razine replika s razinom dvaju različitih pacijenata.

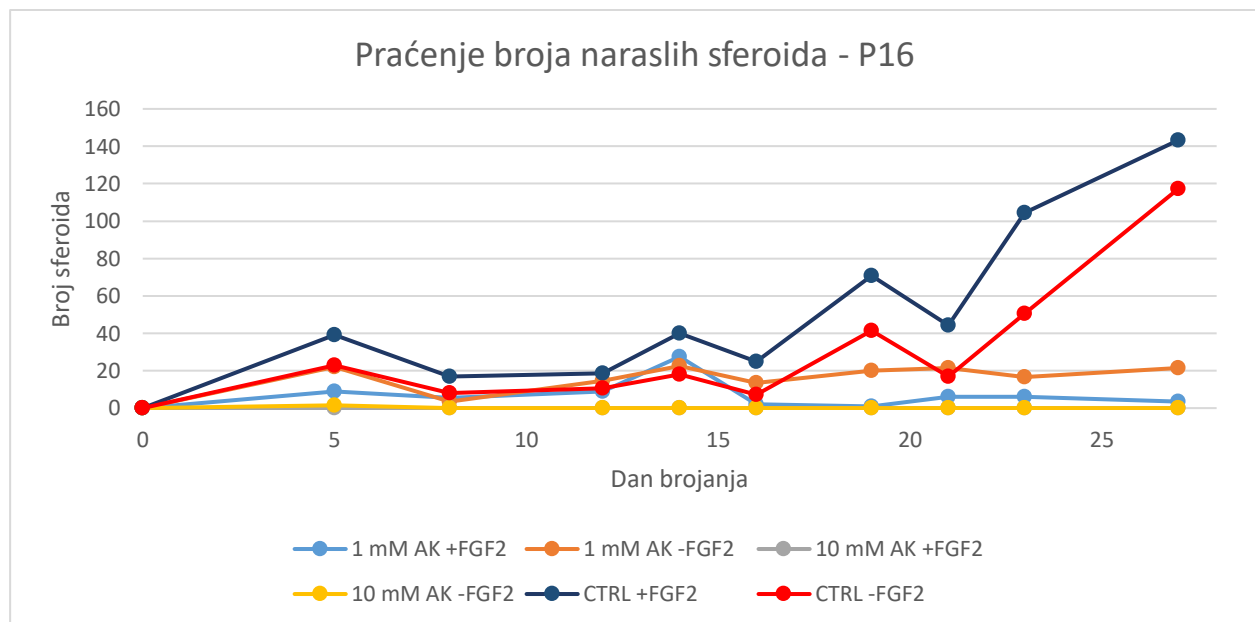
Za eksperiment određivanja udjela apoptotskih stanica u uzorku nakon 24 satnog tretmana AK u prisutnosti i bez prisutnosti FGF2, rezultate o postocima pojedine vrste stanica obradila sam tako što sam rezultate za triplikate uprosječila. Rezultate sam za svaki uzorak prikazala u obliku stupčastog dijagrama gdje zbroj udjela pojedinih vrsta stanica čini 100%. S obzirom da sam za

svakog pacijenta imala po jedan uzorak u svakoj eksperimentalnoj skupini, rezultate nisam statistički testirala.

4. REZULTATI

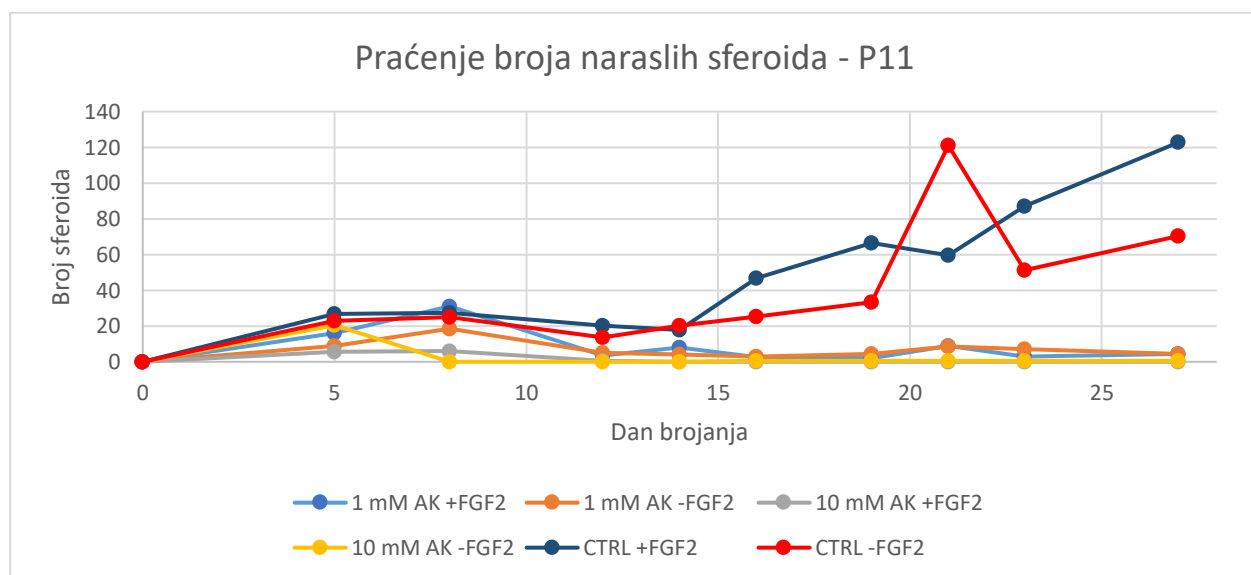
4.1. Praćenje inhibicije rasta sferoida u ovisnosti o tretmanu

Rezultati dobiveni brojanjem sferoida dobivenih od stanica pacijenta P16 u pojedinoj eksperimentalnoj skupini tijekom 27 dana prikazani su na grafu na Slici 3, a rezultati dobiveni brojanjem sferoida dobivenih od stanica pacijenta P11 na Slici 4. U prikazanim eksperimentalnim skupinama AK bila je dodana odmah prilikom nasađivanja stanica za sferoide. Za oba pacijenta iz grafa možemo vidjeti da su linije eksperimentalnih skupina 10 mM AK +FGF2 i 10 mM AK -FGF2 niže pozicionirane u odnosu na ostale skupine te da u razdoblju brojanja sferoida ne pokazuju bitni porast u broju sferoida. Također, za linije eksperimentalnih skupina 1 mM AK +FGF2 i 1 mM AK -FGF2 na grafovima se vidi da se otprilike nakon 15 dana počinju drugačije kretati od kontrolnih, odnosno u tom razdoblju broj sferoida u navedenim skupinama počinje stagnirati u odnosu na kontrolne u kojima počinje rasti.



Slika 3. Praćenje broja naraslih sferoida kod pacijenta P16. Graf koji prikazuje kretanje broja naraslih sferoida tijekom 27 dana u pojedinoj eksperimentalnoj skupini kod stanica porijeklom od pacijenta P16.

Svaka eksperimentalna skupina sastojala se od dvije replike, a kontrolne od četiri. Radi lakše interpretacije grafa, linije eksperimentalnih skupina s prisutnošću FGF2 prikazane su hladnim bojama, a linije eksperimentalnih skupina bez prisutnosti FGF2 prikazane su toplim bojama. 1 mM AK +FGF2 – eksperimentalna skupina tretirana 1 mM AK u prisustvu FGF2, 1 mM AK -FGF2 - eksperimentalna skupina tretirana 1 mM AK bez prisustva FGF2, 10 mM AK +FGF2 – eksperimentalna skupina tretirana 10 mM AK u prisustvu FGF2, 10 mM AK -FGF2 - eksperimentalna skupina tretirana 10 mM AK bez prisustva FGF2, CTRL +FGF2 – netretirana skupina u prisustvu FGF2, CTRL -FGF2 – netretirana skupina bez prisustva FGF2.



Slika 4. Praćenje broja naraslih sferoida kod pacijenta P11. Graf koji prikazuje kretanje broja naraslih sferoida tijekom 27 dana u pojedinoj eksperimentalnoj i kontrolnoj skupini kod stanica porijeklom od pacijenta P11. Svaka eksperimentalna skupina sastojala se od dvije replike, a kontrolne od četiri. Radi lakše interpretacije grafa, linije eksperimentalnih skupina s prisutnošću FGF2 prikazane su hladnim bojama, a linije eksperimentalnih skupina bez prisutnosti FGF2 prikazane su toplim bojama. 1 mM AK +FGF2 – eksperimentalna skupina tretirana 1 mM AK u prisustvu FGF2, 1 mM AK -FGF2 - eksperimentalna skupina tretirana 1 mM AK bez prisustva FGF2, 10 mM AK +FGF2 – eksperimentalna skupina tretirana 10 mM AK u prisustvu FGF2, 10 mM AK -FGF2 - eksperimentalna skupina tretirana 10 mM AK bez prisustva FGF2, CTRL +FGF2 – netretirana skupina u prisustvu FGF2, CTRL -FGF2 – netretirana skupina bez prisustva FGF2.

Statistička analiza eksperimentalnih skupina pacijenta P16 pokazala je kako nisu u svim danima podaci u pojedinim eksperimentalnim skupinama normalno distribuirani te da nisu svi homoscedastični. Razlog tome vjerojatno je mali broj replika te česte nagle promjene u broju

sferoida u pojedinoj jažici između dva brojanja što je dovelo do toga da se broj sferoida jako razlikuje između dvije replike, tj. da je varijanca u nekim skupinama puno veća od drugih. Rezultati statističke analize razlika između pojedinih skupina *two-way ANOVA-om* prikazani su u Tablici 3. za pacijenta P16. Za rezultate gdje je značajna interakcija između dviju neovisnih varijabli, dodatno su prikazani rezultati analize značajnosti razlika samo za one kombinacije neovisnih varijabli gdje je razlika bila značajna. U sva četiri dana utjecaj tretmana AK na broj naraslih sferoida pokazao se značajnim ($p < 0,001$), dok se utjecaj prisutnosti FGF2 nije pokazao značajnim. Razlika između tretmana 10 mM AK u odnosu na kontrolnu skupinu u prisutnosti i bez prisutnosti FGF2 pokazala se značajnom, dok se razlika između 1 mM AK i kontrolne skupine na dane 8 i 27 pokazala značajnom bez obzira na prisutnost FGF2, a na dane 5 i 23 samo u prisutnosti FGF2. Razlika između tretmana 1 mM AK i 10 mM AK nije se pokazala značajnom bez obzira na prisutnost FGF2 u sva četiri dana.

Tablica 3. Testiranje značajnosti razlika između pojedinih skupina kod pacijenta P16 u ovisnosti o dvjema neovisnim varijablama (AK i FGF2). P-vrijednosti niže od 0,05 smatraju se statistički značajnima i označene su zeleno. U danima kada je interakcija AK-FGF2 dala značajan rezultat, testirane su sve interakcije, ali su u tablici prikazane samo one koje su dale značajan rezultat.

Dan brojanja		Dan 5	Dan 8	Dan 23	Dan 27
p-vrijednost	AK	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	FGF2	0,898	0,067	0,156	0,903
	AK-FGF2 interakcija	0,044	0,106	0,024	0,665
	(1mM AK) - (0 mM AK)	-	0,008	-	0,002
	(10 mM AK) - (0 mM AK)	-	<0,001	-	<0,001
	(1 mM AK) - (10 mM AK)	-	0,183	-	0,901
	(10mM AK -FGF2) - (0 mM AK - FGF2)	0,044	-	0,026	-
	(0mM AK +FGF2) - (1 mM AK +FGF2)	0,006	-	<0,001	-
	(10mM AK +FGF2) - (0 mM AK +FGF2)	0,001	-	<0,001	-

Za pacijenta P11 rezultati statističke analize razlika između pojedinih skupina *two-way ANOVA-om* prikazani su u Tablici 4. Kod pacijenta P11 svi podaci u svim eksperimentalnim skupinama pokazali su se normalno distribuirani na svaki dan brojanja, no podaci za neke dane nisu bili homoscedastični, stoga za te dane nije provedena daljnja analiza. Podaci su pokazali kako

je tretman AK imao statistički značajan utjecaj na broj naraslih sferoida u odnosu na kontrolne skupine, dok prisutnost FGF2 nije imala značajan utjecaj niti je utjecala na utjecaj AK. Nadalje, u 8. danu brojanja statistički je značajna razlika između eksperimentalnih skupina tretiranih 10 mM AK u odnosu na kontrolne te između eksperimentalnih skupina tretiranih 1 mM AK u odnosu na eksperimentalne skupine tretirane 10 mM AK, dok razlika između skupina tretiranih s 1 mM AK i kontrolnih nije značajna. U svim ostalim danima za koje je učinjena analiza statistički je značajna razlika između skupina tretiranih objema koncentracijama AK u odnosu na kontrolne skupine, dok razlika između skupina tretiranih 1 mM AK i skupina tretiranih 10 mM AK nije značajna.

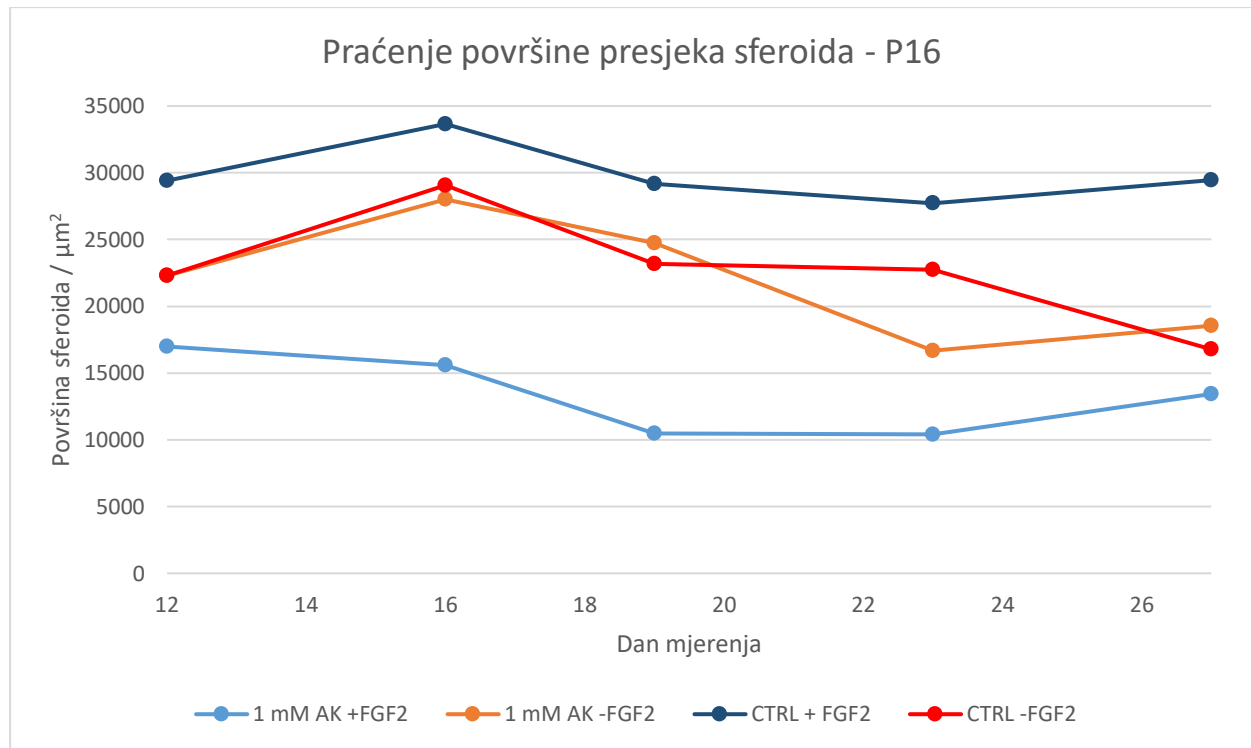
Tablica 4. Testiranje značajnosti razlika između pojedinih skupina kod pacijenta P11 u ovisnosti o dvjema neovisnim varijablama (AA i FGF2). P-vrijednosti niže od 0,05 smatraju se statistički značajnima i označene su zeleno.

Dan brojanja		Dan 8	Dan 14	Dan 16	Dan 19	Dan 27
p-vrijednost	AK	0,012	0,003	<0,001	0,001	<0,001
	FGF2	0,237	0,897	0,2	0,32	0,343
	AK-FGF2 int.	0,732	0,764	0,115	0,214	0,321
	(1mM AK) - (0 mM AK)	0,975	0,034	<0,001	0,005	0,003
	(10 mM AK) - (0 mM AK)	0,012	0,004	<0,001	0,003	0,002
	(1 mM AK) - (10 mM AK)	0,036	0,486	0,926	0,971	0,982

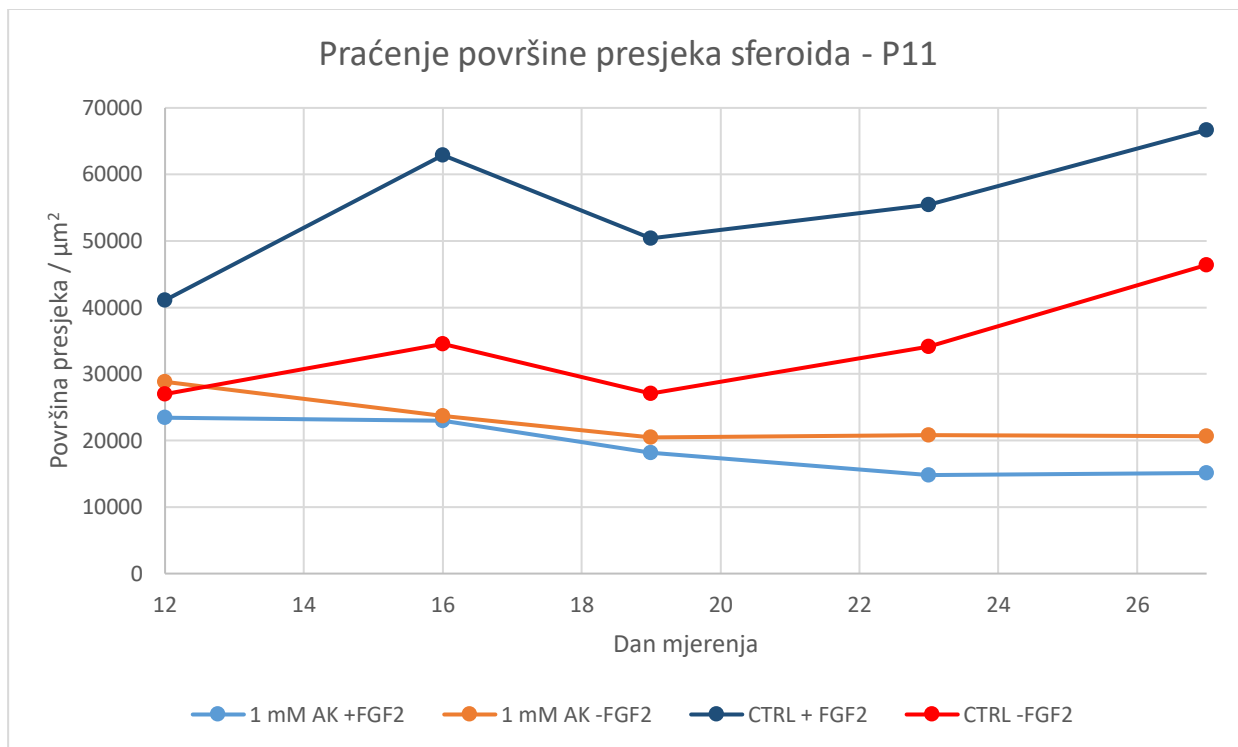
4.2 Praćenje utjecaja tretmana na površinu presjeka sferoida

Mjerenjem površine najvećih sferoida u pojedinoj eksperimentalnoj skupini dobivene su prosječne vrijednosti površina koje su prikazane na Slici 5 (za pacijenta P16) i na Slici 6 (za pacijenta P11) u ovisnosti o danu brojanja. Eksperimentalne skupine 10 mM AK +FGF2 i 10 mM AK -FGF2 nisu bile uključene u mjerenje zbog vrlo malog broja ili potpunog nedostatka sferoida. Kod oba pacijenta vidljiva je prilična razlika između površine presjeka najvećih sferoida kod kontrolne skupine gdje su sferoidi rasli u prisustvu FGF2 te skupine tretirane 1 mM AK u prisutvu FGF2. Zanimljivo je da su linije eksperimentalne skupine tretirane 1 mM AK bez prisustva FGF2 te kontrolne skupine bez prisustva FGF2 kod pacijenta P16 vrlo slične, tj. površine u pojedinim danima su približno jednake između ove dvije skupine. Kod pacijenta P11 ipak se vidi razlika između površina u tim dvjema skupinama, ali je puno manja od razlike u površinama između eksperimentalne skupine tretirane 1 mM AK u prisustvu FGF2 i kontrolne skupine u prisustvu FGF2

koja je velika kao i kod pacijenta P16. Na grafovima se također može vidjeti kako su sferoidi kod pacijenta P11 u skupinama koje su rasle u prisutnosti FGF2 veći od sferoida u istim skupinama kod pacijenta P16.

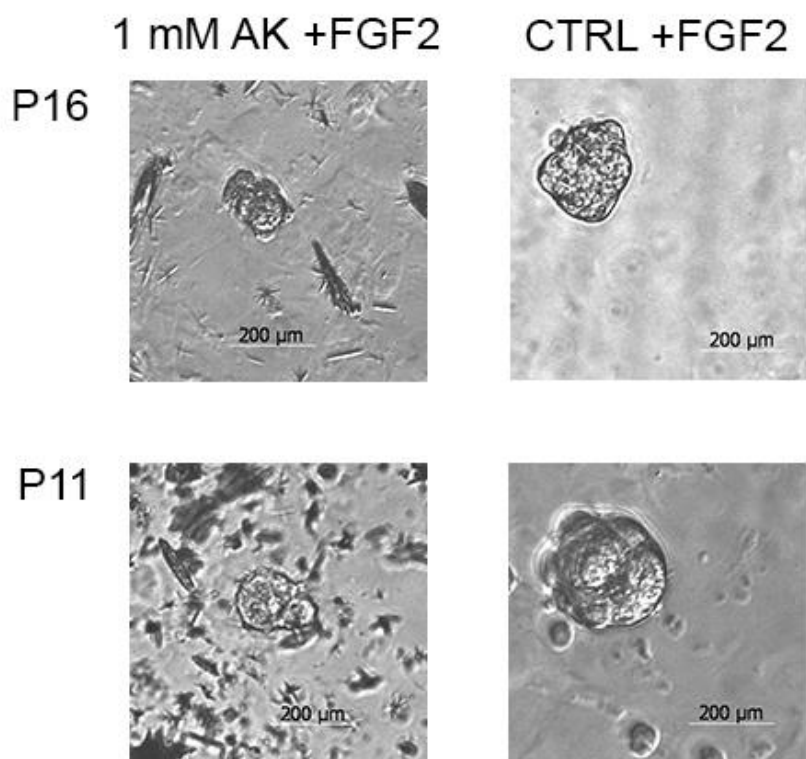


Slika 5. Praćenje površine presjeka najvećih sferoida kod pacijenta P16. Graf koji prikazuje kretanje površine presjeka najvećih sferoida tijekom 15 dana u pojedinoj eksperimentalnoj i kontrolnoj skupini kod stanica porijeklom od pacijenta P16. Svaka eksperimentalna skupina sastojala se od dvije replike, a kontrolne od četiri. 1 mM AK +FGF2 – eksperimentalna skupina tretirana 1 mM AK u prisustvu FGF2, 1 mM AK -FGF2 - eksperimentalna skupina tretirana 1 mM AK bez prisustva FGF2, CTRL +FGF2 – netretirana skupina u prisustvu FGF2, CTRL -FGF2 – netretirana skupina bez prisustva FGF2.



Slika 6. Praćenje površine presjeka najvećih sferoida kod pacijenta P11. Graf koji prikazuje kretanje površine presjeka najvećih sferoida tijekom 15 dana u pojedinoj eksperimentalnoj i kontrolnoj skupini kod stanica porijeklom od pacijenta P11. Svaka eksperimentalna skupina sastojala se od dvije replike, a kontrolne od četiri. 1 mM AK +FGF2 – eksperimentalna skupina tretirana 1 mM AK u prisustvu FGF2, 1 mM AK -FGF2 - eksperimentalna skupina tretirana 1 mM AK bez prisustva FGF2, CTRL +FGF2 – netretirana skupina u prisustvu FGF2, CTRL -FGF2 – netretirana skupina bez prisustva FGF2.

Na Slici 7 prikazan je najveći fotografirani sferoid iz skupine tretirane 1 mM AK u prisutnosti FGF2 i najveći fotografirani sferoid iz kontrolne skupine u prisutnosti FGF2 kod pacijenta P16 i pacijenta P11 na 19. dan uzgoja.



Slika 7. Prikaz najvećeg fotografiranog sferoida iz skupine tretirane 1 mM AK u prisutnosti FGF2 (1 mM AK +FGF2) i kontrolne skupine u prisutnosti FGF2 (CTRL +FGF2) kod oba pacijenta na 19. dan uzgoja

Statistička analiza podataka dobivenih mjerenjem površina presjeka najvećih sferoida pokazala je da su podaci normalno distribuirani u svakoj eksperimentalnoj i kontrolnoj skupini u svakom danu kod oba pacijenta. Također, podaci u svakom danu bili su homoscedastični kod pacijenta P16, dok kod pacijenta P11 nisu u zadnja dva dana. Iz tog razloga podatke iz zadnja dva dana mjerenja kod pacijenta P11 nisam analizirala *two-way ANOVA-om*. Rezultati statističke analize razlika između pojedinih skupina *two-way ANOVA-om* prikazani su u Tablici 5. za pacijenta P16. U svim danima pokazalo se da postoji značajna interakcija između dviju neovisnih varijabli (AK i FGF2) pa je u tablici prikazana samo p-vrijednost za interakciju, a ne i za svaku pojedinačnu varijablu jer se utjecaj pojedine varijable ne može interpretirati zasebno. Iz tog razloga, prikazani su rezultati analize značajnosti razlike između tretirane skupine i kontrolne skupine posebno u prisutnosti FGF2 i bez prisutnosti FGF2. Daljnja analiza pokazala je kako u svakom od dana postoji statistički značajna razlika između površine najvećih sferoida u eksperimentalnoj skupini tretiranoj 1 mM AK u prisutnosti FGF2 u odnosu na kontrolnu skupinu gdje su sferoidi rasli također u

prisutnosti FGF2. Nadalje, pokazalo se da ta razlika nije značajna između eksperimentalne skupine gdje su sferoidi tretirani 1 mM AK bez prisutnosti FGF2 u odnosu na kontrolnu skupinu bez prisutnosti FGF2.

Tablica 5. Testiranje značajnosti razlika u površini najvećih sferoida između pojedinih skupina kod pacijenta P16. U svim danima statistička značajnost interakcije dviju neovisnih varijabli (AK i FGF2) je značajna, zbog čega su razlike testirane između eksperimentalnih i kontrolnih skupina u prisutnosti FGF2 i bez prisutnosti FGF2. P-vrijednosti niže od 0,05 smatraju se statistički značajnima i označene su zeleno.

Dan brojanja		Dan 12	Dan 16	Dan 19	Dan 23	Dan 27
p-vrijednost	AK-FGF2 int.	<0,001	0,049	0,003	0,043	<0,001
	(1 mM AK +FGF2) - (0 mM AK +FGF2)	<0,001	0,008	<0,001	0,001	<0,001
	(1 mM AK -FGF2) - (0 mM AK -FGF2)	0,991	0,843	0,67	0,076	0,289

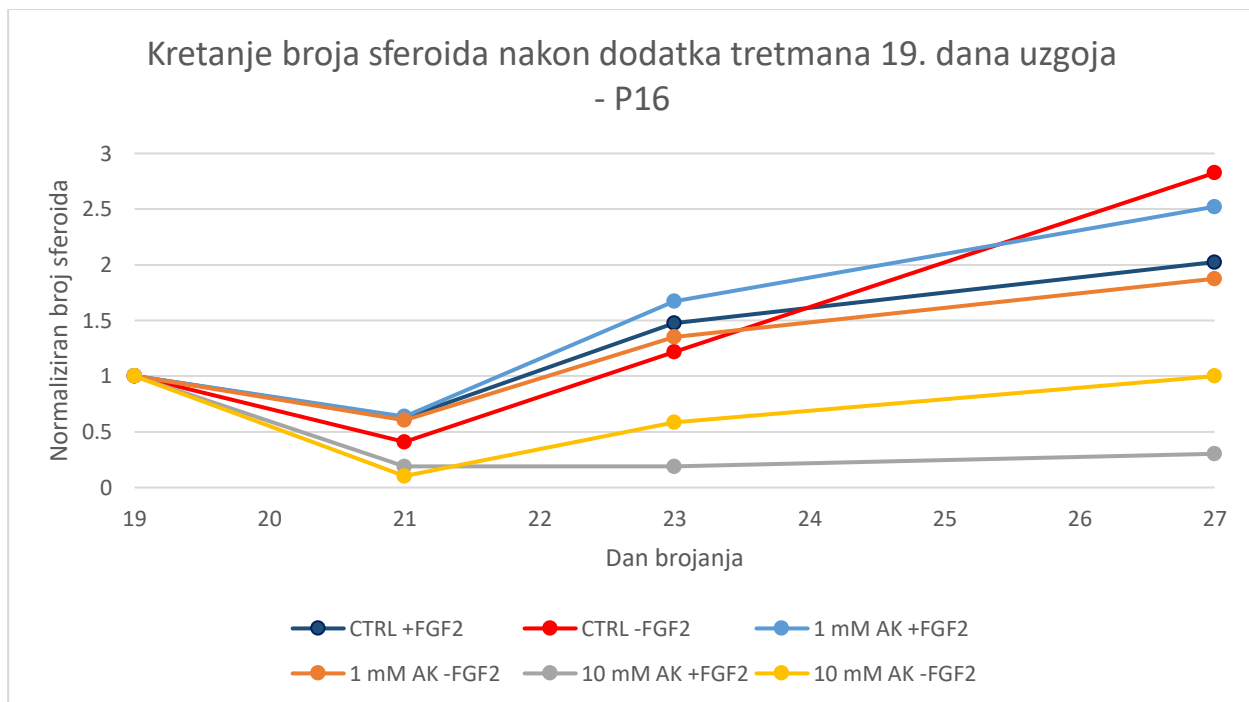
Za pacijenta P11, rezultati statističke analize razlika između pojedinih skupina *two-way ANOVA-om* prikazani su u Tablici 6. Analiza je pokazala da je u svakom danu mjerenja interakcija utjecaja neovisnih varijabli značajna te je u svim danima bila statistički značajna razlika između eksperimentalne skupine tretirane 1 mM AK u prisutnosti FGF2 te kontrolne skupine u prisutnosti FGF2 kao i kod pacijenta P16. Za razliku od pacijenta P16, ovdje se u 16. danu pokazala značajna i razlika između eksperimentalne skupine tretirane 1 mM AK bez prisutnosti FGF2 te kontrolne skupine bez prisutnosti FGF2. Ipak, odgovarajuća p-vrijednost ($p=0,011$) za tu razliku, veća je od ostalih dobivenih značajnih p-vrijednosti.

Tablica 6. Testiranje značajnosti razlika u površini najvećih sferoida između pojedinih skupina kod pacijenta P11. U svim danima statistička značajnost interakcije dviju neovisnih varijabli (AK i FGF2) je značajna, zbog čega su razlike testirane između eksperimentalnih i kontrolnih skupina u prisutnosti FGF2 i bez prisutnosti FGF2. P-vrijednosti niže od 0,05 smatraju se statistički značajnima i označene su zeleno.

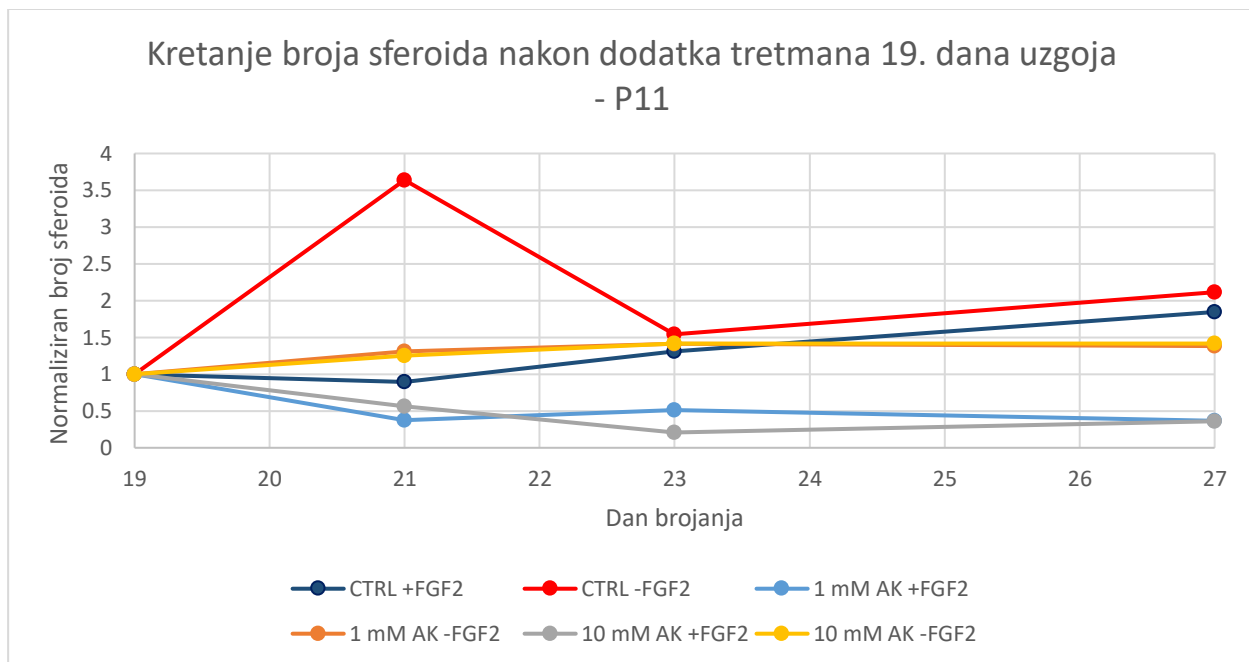
Dan brojanja		Dan 12	Dan 16	Dan 19
p-vrijednost	AK-FGF2 int.	0,004	0,001	0,042
	(1 mM AK +FGF2) - (0 mM AK +FGF2)	0,001	<0,001	0,004
	(1 mM AK -FGF2) - (0 mM AK -FGF2)	0,646	0,011	0,369

4.3 Praćenje utjecaja naknadno dodanog tretmana na broj naraslih sferoida

Podaci o kretanju broja naraslih sferoida u pojedinim eksperimentalnim skupinama gdje je AK dodana 19. dan uzgoja prikazani su u ovisnosti o danu brojanja na Slici 8 za pacijenta P16, a na Slici 9 za pacijenta P11. Kod pacijenta P16 na grafu se vidi da je 21. dan zabilježen pad broja sferoida u svim eksperimentalnim i kontrolnim skupinama, što znači da nije bio uzrokovan dodatkom tretmana već najvjerojatnije nekim vanjskim utjecajem. Sljedeća dva brojanja pokazala su da je u eksperimentalnim skupinama gdje je dodana AK konačne koncentracije 10 mM došlo do stagnacije broja sferoida nakon tog pada (kod skupine koja je rasla bez prisutnosti FGF2) ili do sporijeg rasta (kod skupine koja je rasla u prisutnosti FGF2). Dodatak AK konačne koncentracije 1 mM nije utjecao na broj i daljnji rast novih sferoida u tim eksperimentalnim skupinama. Nasuprot tome, kod pacijenta P11 rezultat se pokazao prilično drugačiji. Nakon dodatka tretmana došlo je do pada broja sferoida za otprilike pola u skupinama gdje je dodana AK obje koncentracije, a rastle su u prisutnosti FGF2, dok kod skupina gdje je dodana AK istih koncentracija, ali bez prisutnosti FGF2 uopće nije došlo do pada u broju sferoida, već je došlo i do blagog porasta. Potrebno je imati na umu kako su na grafovima prikazani normalizirani podaci koji samo govore o tome kako se broj sferoida kretao u pojedinoj skupini zasebno u odnosu na 19. dan, ali ne govore o stvarnom broju sferoida koji se nalazio u pojedinoj jažici jer tada podaci ne bi mogli biti usporedivi zbog razlika u početnom broju sferoida na 19. dan između jažica koje su kasnije tretirane ili nisu. Zbog toga što su podaci normalizirani, a podaci o stvarnom broju sferoida nisu usporedivi, statistička analiza nije učinjena za ovaj dio eksperimenta.



Slika 8. Kretanje broja sferoida nakon dodatka tretmana 19. dana uzgoja kod pacijenta P16. Graf koji prikazuje kretanje broja naraslih sferoida u pojedinoj eksperimentalnoj skupini i kontrolnim skupinama nakon 19. dana kada je u te eksperimentalne skupine dodan tretman. Svaka eksperimentalna skupina sastojala se od dvije replike, a kontrolne od četiri. Na grafovima je prikazan normaliziran broj sferoida u pojedinoj skupini u odnosu na broj sferoida u toj skupini na 19. dan. 1 mM AK +FGF2 – eksperimentalna skupina tretirana 1 mM AK u prisustvu FGF2, 1 mM AK -FGF2 - eksperimentalna skupina tretirana 1 mM AK bez prisustva FGF2, 10 mM AK +FGF2 – eksperimentalna skupina tretirana 10 mM AK u prisustvu FGF2, 10 mM AK -FGF2 - eksperimentalna skupina tretirana 10 mM AK bez prisustva FGF2, CTRL +FGF2 – netretirana skupina u prisustvu FGF2, CTRL -FGF2 – netretirana skupina bez prisustva FGF2.

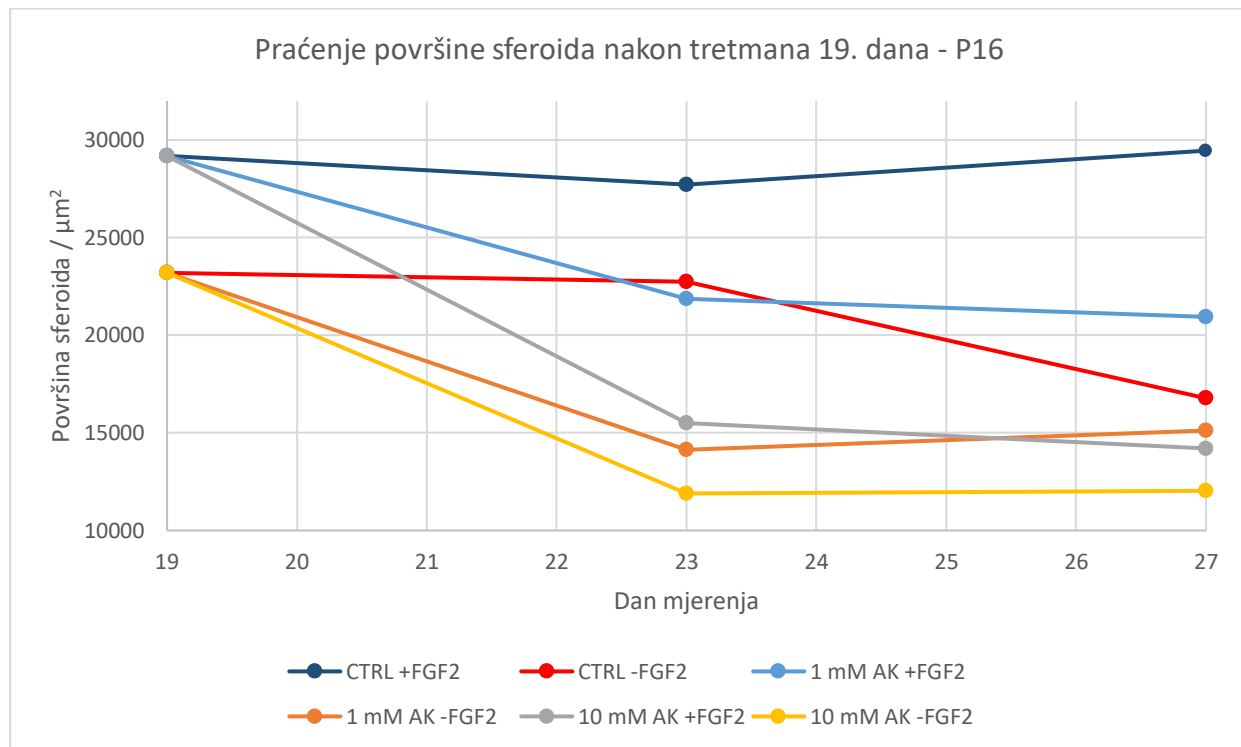


Slika 9. Kretanje broja sferoida nakon dodatka tretmana 19. dana uzgoja kod pacijenta P11. Graf koji prikazuje kretanje broja naraslih sferoida u pojedinoj eksperimentalnoj skupini i kontrolnim skupinama nakon 19. dana kada je u te eksperimentalne skupine dodan tretman. Svaka eksperimentalna skupina sastojala se od dvije replike, a kontrolne od četiri. Na grafovima je prikazan normaliziran broj sferoida u pojedinoj skupini u odnosu na broj sferoida u toj skupini na 19. dan. 1 mM AK +FGF2 – eksperimentalna skupina tretirana 1 mM AK u prisustvu FGF2, 1 mM AK -FGF2 - eksperimentalna skupina tretirana 1 mM AK bez prisustva FGF2, 10 mM AK +FGF2 – eksperimentalna skupina tretirana 10 mM AK u prisustvu FGF2, 10 mM AK -FGF2 - eksperimentalna skupina tretirana 10 mM AK bez prisustva FGF2, CTRL +FGF2 – netretirana skupina u prisustvu FGF2, CTRL -FGF2 – netretirana skupina bez prisustva FGF2.

4.4 Praćenje utjecaja naknadno dodanog tretmana na površinu naraslih sferoida

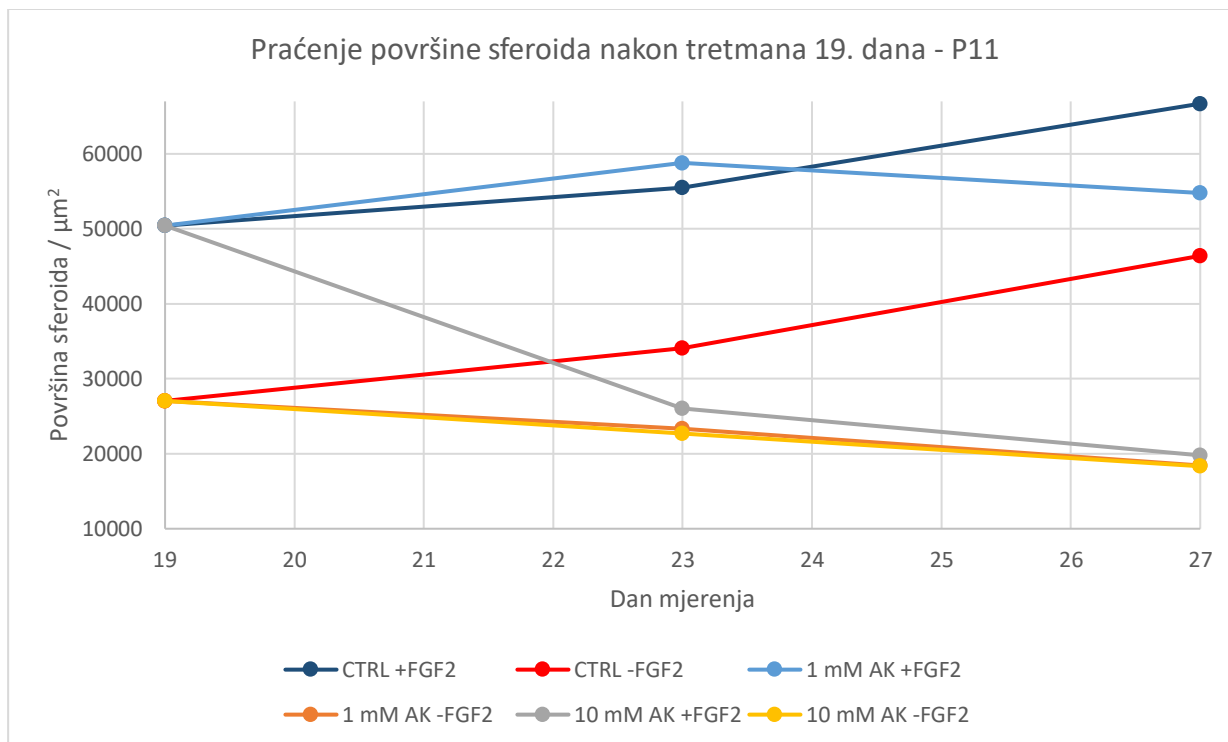
Rezultati dobiveni mjerenjem površine sferoida nakon dodatka tretmana u eksperimentalne skupine u odnosu na kontrolne u ovisnosti o danu mjerenja prikazani su na Slici 10 za pacijenta P16. Kod pacijenta P16 nakon dodatka tretmana došlo je do pada u površini presjeka sferoida u svim eksperimentalnim skupinama u odnosu na kontrolne koje nisu doživjele takav pad. Pad u površini koji se vidi na 27. dan kod kontrolne skupine koja je rasla bez FGF2 vjerojatno je uzrokovan općenito „iscrpljenjem“ kulture nakon 27 dana. I kod skupina koje su rasle u prisutnosti FGF2 i bez došlo je do većeg pada u površini presjeka najvećih sferoida u onim skupinama koje su tretirane 10 mM AK u odnosu na 1 mM. Veća razlika postoji između skupina

koje su rasle u prisutnosti FGF2, dok kod onih koje su rasle bez prisutnosti FGF2 nije velika razlika između skupine tretirane 10 mM AK i skupine tretirane 1 mM AK.



Slika 10. Graf koji prikazuje kretanje površine presjeka najvećih sferoida u pojedinoj eksperimentalnoj i kontrolnoj skupini nakon što je u eksperimentalne dodan tretman 19. dana uzgoja kod pacijenta P16. Svaka eksperimentalna skupina sastojala se od dvije replike, a kontrolne od četiri. 1 mM AK +FGF2 – eksperimentalna skupina tretirana 1 mM AK u prisustvu FGF2, 1 mM AK -FGF2 - eksperimentalna skupina tretirana 1 mM AK bez prisustva FGF2, 10 mM AK +FGF2 – eksperimentalna skupina tretirana 10 mM AK u prisustvu FGF2, 10 mM AK -FGF2 - eksperimentalna skupina tretirana 10 mM AK bez prisustva FGF2, CTRL +FGF2 – netretirana skupina u prisustvu FGF2, CTRL -FGF2 – netretirana skupina bez prisustva FGF2.

Za razliku od pacijenta P16, kod pacijenta P11 (Slika 11) uopće nije došlo do pada u površini presjeka najvećih sferoida u skupini koja je tretirana 1 mM AK u prisutnosti FGF2 do sljedećeg mjerenja nego je blagi pad zabilježen tek 27. dan mjerenja. Ovdje je do najvećeg pada u površini došlo kod skupine tretirane 10 mM AK u prisutnosti FGF2 koja se smanjila čak do razine na koju su pale površine u eksperimentalnim skupinama koje su rasle bez FGF2. U tim skupinama došlo je do pada u površini, ali je on bio blaži nego kod pacijenta P16.



Slika 11. Graf koji prikazuje kretanje površine presjeka najvećih sferoida u pojedinoj eksperimentalnoj i kontrolnoj skupini nakon što je u eksperimentalne dodan tretman 19. dana uzgoja kod pacijenta P11. Svaka eksperimentalna skupina sastojala se od dvije replike, a kontrolne od četiri. 1 mM AK +FGF2 – eksperimentalna skupina tretirana 1 mM AK u prisustvu FGF2, 1 mM AK -FGF2 - eksperimentalna skupina tretirana 1 mM AK bez prisustva FGF2, 10 mM AK +FGF2 – eksperimentalna skupina tretirana 10 mM AK u prisustvu FGF2, 10 mM AK -FGF2 - eksperimentalna skupina tretirana 10 mM AK bez prisustva FGF2, CTRL +FGF2 – netretirana skupina u prisustvu FGF2, CTRL -FGF2 – netretirana skupina bez prisustva FGF2.

U Tablici 7 prikazani su rezultati statističke analize značajnosti utjecaja pojedinih varijabli te značajnosti razlika između pojedinih eksperimentalnih i kontrolnih skupina za pacijenta P16 ukoliko se interakcija neovisnih varijabli (AK i FGF2) pokazala značajna. Statistička analiza pokazala je da je u 23. danu statistički značajan utjecaj obje neovisne varijable na mjerenu površinu ($p(\text{AK}) < 0,001$, $p(\text{FGF2}) = 0,003$), dok njihova interakcija nije značajna. Daljnja analiza pokazala je da postoji statistički značajna razlika u površini sferoida između eksperimentalnih skupina tretiranih 1 mM AK u odnosu na kontrolne ($p = 0,004$) te između eksperimentalnih skupina tretiranih 10 mM AK u odnosu na kontrolne ($< 0,001$), dok razlika između eksp. skupina tretiranih 1 mM AK i skupina tretiranih 10 mM AK nije značajna. U danu 27 pokazalo se da postoji statistički značajna interakcija između utjecaja dviju neovisnih varijabli ($p = 0,001$) pa su u daljnjoj analizi

testirane razlike između svih eksperimentalnih i kontrolnih skupina pojedinačno. Rezultat je pokazao kako je između skupina koje su rasle bez FGF2 značajna samo razlika između skupine koja je 19. dan tretirana 10 mM AK i kontrolne skupine. Nasuprot tome, kod skupina koje su rasle u prisutnosti FGF2 pokazala se statistički značajna razlika između skupine tretirane 10 mM AK i kontrolne, između skupine tretirane 1 mM AK i kontrolne te između skupine tretirane 10 mM AK i skupine tretirane 1 mM AK.

Tablica 7. Testiranje značajnosti razlika u površini najvećih sferoida između pojedinih skupina kod pacijenta P16 nakon što je tretman dodan 19. dan uzgoja. Prikaz dobivenih p-vrijednosti za utjecaj pojedine varijable na površinu presjeka sferoida te značajnosti razlika između pojedinih eksperimentalnih i kontrolnih skupina kod pacijenta P16. P-vrijednosti niže od 0,05 smatraju se statistički značajnima i označene su zeleno.

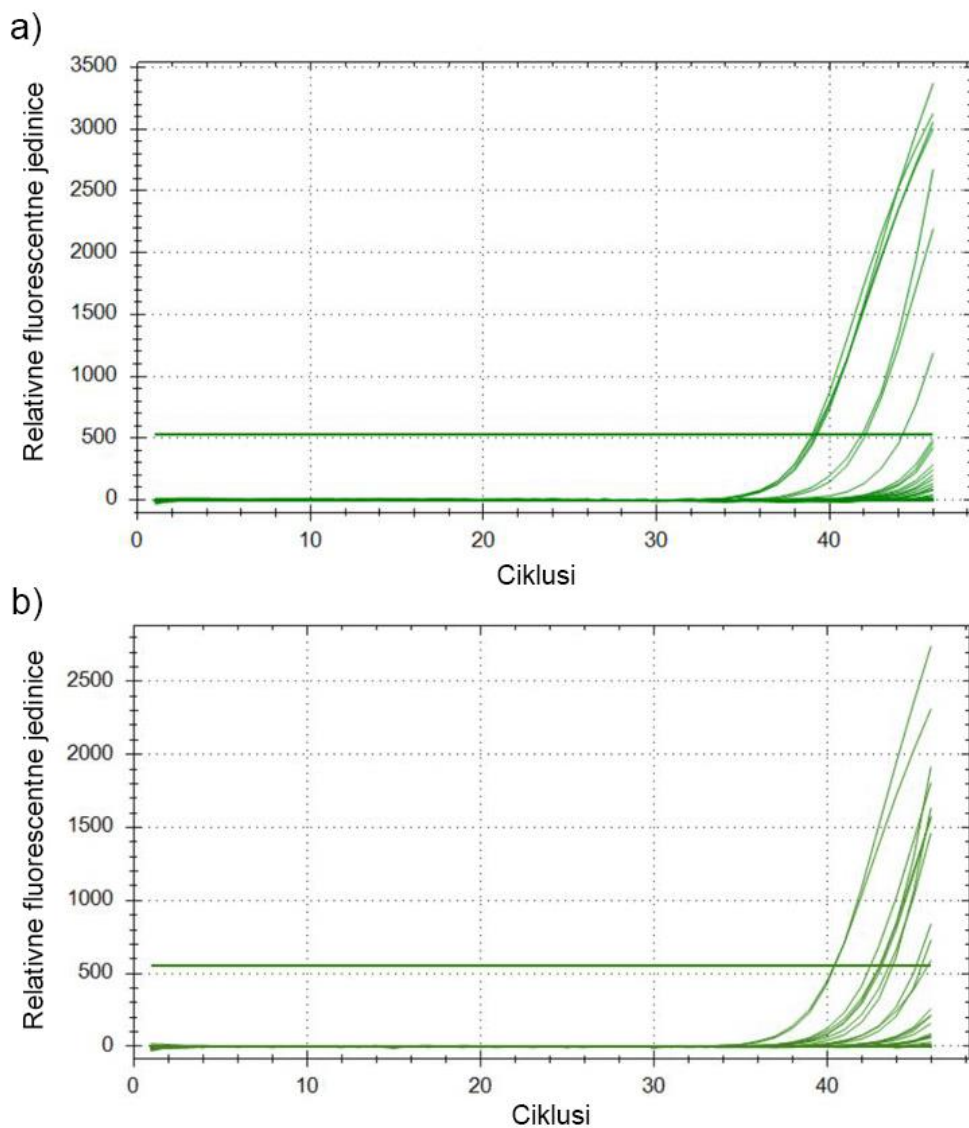
Dan brojanja		Dan 23	Dan 27
p-vrijednost	AK	<0,001	<0,001
	FGF2	0,003	<0,001
	AK-FGF2 int.	0,563	<0,001
	(1mM AK) - (0 mM AK)	0,004	
	(10 mM AK) - (0 mM AK)	<0,001	
	(1 mM AK) - (10 mM AK)	0,076	
	(10 mM AK -FGF2) - (0 mM AK -FGF2)		0,016
	(1 mM AK +FGF2) - (0 mM AK +FGF2)		<0,001
	(10 mM AK +FGF2) - (0 mM AK +FGF2)		<0,001
	(1 mM AK +FGF2) - (10 mM AK +FGF2)		0,002

Za pacijenta P11 *two-way ANOVA* nije učinjena jer se testiranjem podataka pokazalo kako podaci nisu homoscedastični, a to je jedan od preduvjeta provođenja *ANOVA*-e.

4.5 Rezultati analize ekspresije markera matičnosti i diferencijacije

Koncentracije RNA izolirane iz pojedinog uzorka sferoida bile su prilično niske te je omjer A260/A230 također bio jako nizak. Na uzorcima cDNA dobivenim reverznom transkripcijom uzoraka RNA izoliranim iz pojedine skupine sferoida analiza ekspresije markera matičnosti i diferencijacije nije uspjela. U qPCR-u nije uopće došlo do očitavanja signala za velik broj uzoraka, a tamo gdje je došlo to očitavanje dogodilo se u vrlo kasnim ciklusima (Slika 12), a najčešće je

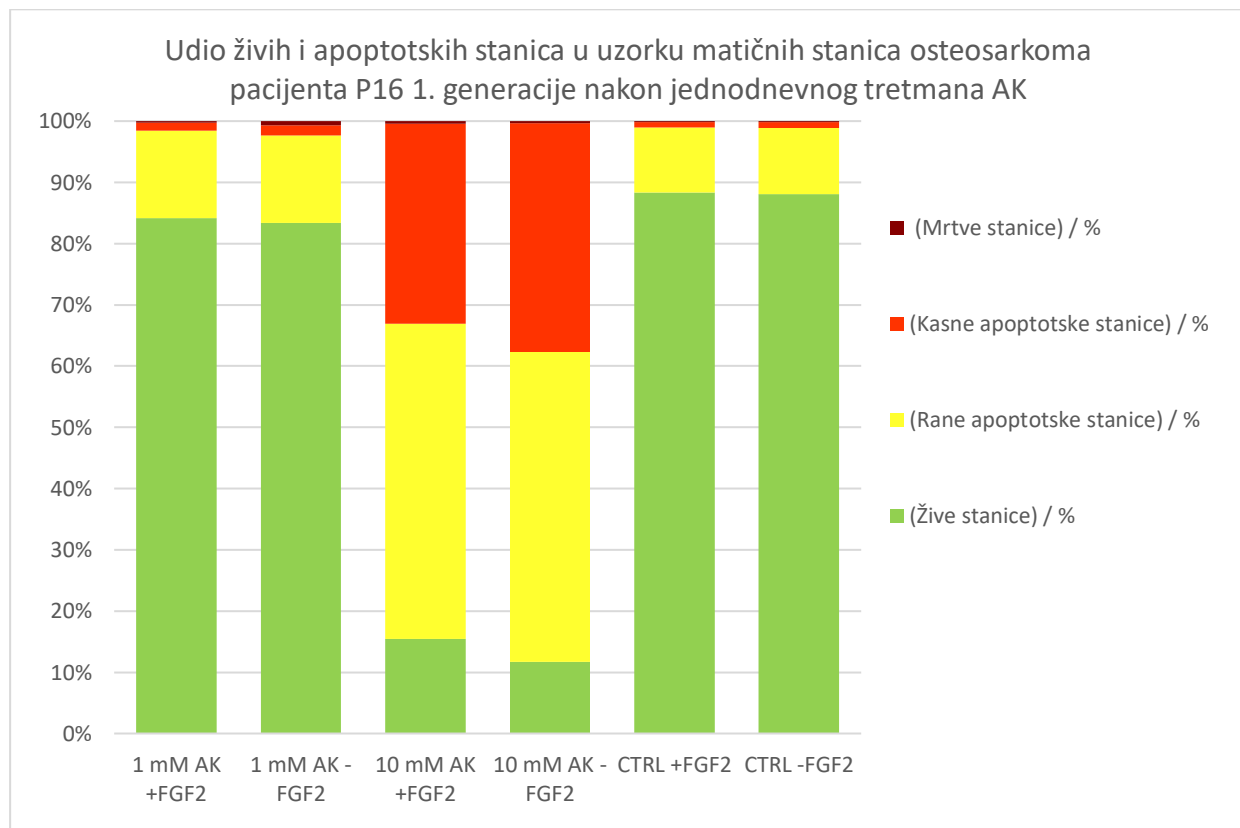
zabilježeno u samo jednoj od 3 replike. Iz tog razloga, nisam obradila podatke niti u tim slučajevima kada je signal očit u vrlo visokom ciklusu umnažanja jer je moguće da je nespecifičan. Gen za endogenu kontrolu (β -aktin) u većini uzoraka se umnožio, no signal je isto uglavnom detektiran u visokim ciklusima. Nisam analizirala njegove Ct vrijednosti jer taj gen nije od interesa već je trebao poslužiti kao endogena kontrola za analizu ekspresije drugih gena.



Slika 12. Krivulje detekcije fluorescentnog signala u ovisnosti o broju ciklusa u uzorcima gdje je signal očit kod pacijenta P16 (a) i pacijenta P11 (b). Fluorescentni signal u svim uzorcima detektiran je vrlo kasno, a liniju praga prelazi tek nakon 40 ciklusa i više.

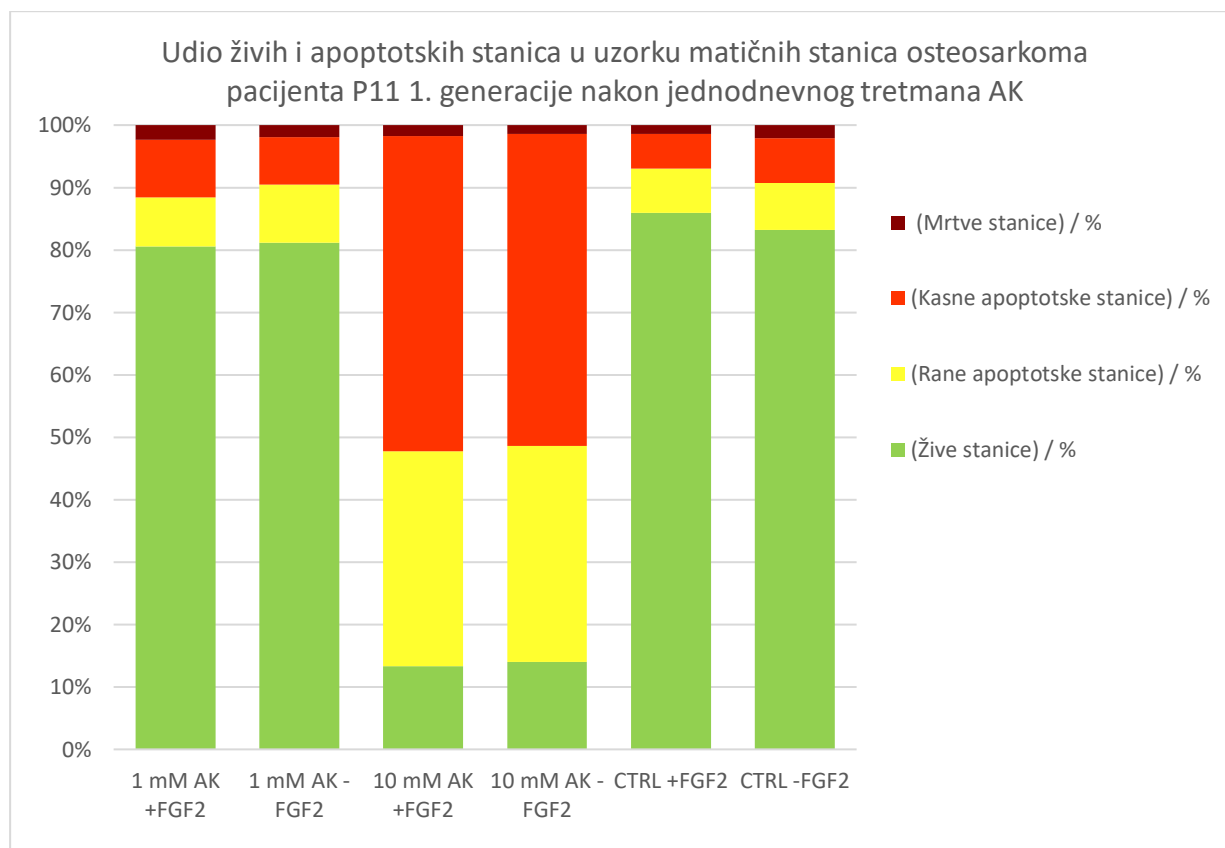
4.6 Udio apoptotskih i mrtvih stanica nakon jednodnevnog tretmana

Rezultati eksperimenta u kojem su matične stanice prve generacije u adherentnoj kulturi tretirane dvjema koncentracijama AA u prisutnosti i bez prisutnosti FGF2 24 sata, a zatim udio živih i apoptotskih stanica mjeren pomoću protočnog citometra, prikazani su na Slici 13 za pacijenta P16 te na Slici 14 za pacijenta P11. Kod oba pacijenta nakon 24-satnog tretmana 10 mM AK u prisutnosti i bez prisutnosti FGF2 došlo je do velikog pada udjela živih stanica (na 13-15%) u odnosu na kontrolne skupine gdje je udio živih stanica bio iznad 80%. Kod skupina tretiranih 1 mM AK u prisutnosti i bez prisutnosti FGF2 došlo je do vrlo blagog pada u udjelu živih stanica u odnosu na kontrolne skupine. Udio živih stanica smanjio se tek za nekoliko postotaka. Kod oba pacijenta pokazalo se da prisutnost ili neprisutnost FGF2 nije utjecala na udio živih i apoptotskih stanica u skupinama koje su tretirane istom koncentracijom AK. Jedina primjetna razlika zabilježena je kod pacijenta P16 između skupina koje su tretirane 10 mM AK, no niti ona nije velika.



Slika 13. Udio živih i apoptotskih stanica u uzorcima matičnih stanica osteosarkoma pacijenta P16 prve generacije nakon jednodnevnog tretmana AK u prisutnosti ili bez prisutnosti FGF2. Mjerenje je izvršeno 24 sata nakon tretmana. Svakim tretmanom tretirane su stanice u jednoj petrijevci. 1 mM AK +FGF2 – uzorak

tretiran 1 mM AK u prisustvu FGF2, 1 mM AK -FGF2 – uzorak tretiran 1 mM AK bez prisustva FGF2, 10 mM AK +FGF2 – uzorak tretiran 10 mM AK u prisustvu FGF2, 10 mM AK -FGF2 – uzorak tretiran 10 mM AK bez prisustva FGF2, CTRL +FGF2 – netretirani uzorak u prisustvu FGF2, CTRL -FGF2 – netretirani uzorak bez prisustva FGF2



Slika 14. Udio živih i apoptotskih stanica u uzorcima matičnih stanica osteosarkoma pacijenta P11 prve generacije nakon jednodnevnog tretmana AK u prisutnosti ili bez prisutnosti FGF2. Mjerenje je izvršeno 24 sata nakon tretmana. Svakim tretmanom tretirane su stanice u jednoj petrijevci. 1 mM AK +FGF2 – uzorak tretiran 1 mM AK u prisustvu FGF2, 1 mM AK -FGF2 - uzorak tretiran 1 mM AK bez prisustva FGF2, 10 mM AK +FGF2 – uzorak tretiran 10 mM AK u prisustvu FGF2, 10 mM AK -FGF2 – uzorak tretiran 10 mM AK bez prisustva FGF2, CTRL +FGF2 – netretirani uzorak u prisustvu FGF2, CTRL -FGF2 – netretirani uzorak bez prisustva FGF2

5. RASPRAVA

Rezultati dobiveni brojanjem sferoida koji su tretirani AK (1 mM i 10 mM) u prisutnosti ili bez prisutnosti FGF2 odmah prilikom nasađivanja pokazali su da tretman AK ima određeni negativan učinak na rast sferoida. Taj učinak nije bio u potpunosti jednoličan i potpuno predvidiv u svim danima i kod oba pacijenta. Ono što je najuniformnije pokazano kod oba pacijenta je razlika u broju naraslih sferoida između eksperimentalnih skupina tretiranih 10 mM AK u odnosu na kontrolne skupine koje nisu bile tretirane i ta razlika pokazala se statistički značajna bez obzira na prisutnost ili odsutnost FGF2. Ta koncentracija uzrokovala je gotovo potpunu inhibiciju rasta sferoida. Takav rezultat u skladu je s pretpostavkom da će 10 mM koncentracija AK uzrokovati jaču inhibiciju rasta, ali nije u skladu s pretpostavkom da će prisutnost FGF2 imati utjecaj na učinak AK. Kod pacijenta P11 u većini dana pokazala se statistički značajna razlika i između skupina tretiranih 1 mM AK u odnosu na kontrolne bez obzira na prisutnost FGF2, dok se kod pacijenta P16 ta razlika u dva dana (8 i 27) pokazala statistički značajnom bez obzira na prisutnost FGF2, a u druga dva dana (5 i 23) pokazala se značajnom samo u prisutnosti FGF2. Takav rezultat nije u potpunosti konzistentan i vjerojatno je tome uzrok mali broj replika. Također, nedostatak je što nije bilo moguće provesti statističku analizu za sve dane brojanja. Prilikom brojanja primijećena je pojava da nakon većeg porasta broja sferoida u određenoj jažici dođe do naglog pada sferoida u toj jažici i obrnuto. To bi mogao biti uzrok postojanja različite varijance u različitim skupinama. Kao prvi razlog tome pretpostavila sam da je subjektivnost u brojanju i procjeni je li nešto sferoid ili stanica, no učestalost takve pojave navela me na mišljenje kako ipak postoji neki biološki razlog koji uzrokuje takvu pojavu kao npr. dodavanje AK ili FGF2. Rezultati kod pacijenta P11 pokazali su kako prisutnost ili odsutnost FGF2 ne čini značajnu razliku na rezultat mjerenja, dok je kod pacijenta P16 u dva dana pokazano da postoji statistički značajna interakcija učinaka AK i FGF2. Takav rezultat uglavnom nije u skladu s pretpostavkom da će prisutnost FGF2 negativno utjecati na učinak AK jer FGF2 potiče održavanje matičnosti (Basu-Roy i sur. 2013). U danima i gdje je pokazana statistički značajna interakcija, učinak FGF2 bio je potpuno suprotan od očekivanog, njegova prisutnost pridonijela je inhibitornom djelovanju AK na rast sferoida. Da bi se potvrdio neutralan učinak FGF2 potrebno je provesti još sličnih eksperimenata koji bi trebali sadržavati više replika kako bi se umanjio efekt slučajnosti u donošenju zaključaka. Nepotpuna jednoznačnost

dobivenih rezultata vjerojatno slijedi i iz činjenice da su korištene stanice porijeklom iz dva različita pacijenta, što znači da nisu genetski identične, pa mogu pokazivati različite odgovore na određene uvjete. Dobiveni rezultat u skladu je s rezultatima Oka i sur. koji su pokazali da tretman kombinacijom cisplatine i AK uzrokuje smanjeno stvaranje sferoida U2OS stanica (stanična linija osteosarkoma). Ovo istraživanje pokazalo je i da AK sama ima takav inhibitorni učinak, no potrebno je još istraživanja i eksperimenata koji bi uključivali veći broj replika i različite koncentracije AK od 1mM do 10 mM. Utjecaj tretmana AK na sferoide osteosarkoma jako je malo istražen, no postoje istraživanja koja su testirala utjecaj tretmana AK na sferoide drugih vrsta raka. Xu i sur. (2020) pokazali su kako tretman AK inhibira stvaranje sferoida *in vitro* kod ID8 mišjih stanica koje su nalik ljudskim epitelnim tumorskim stanicama jajnika. U istraživanju Wan i sur. (2021) tretman AK Huh7 i Hep3B tumorskih stanica jetre također je smanjio broj naraslih sferoida, a efekt je bio ovisan o primijenjenoj dozi kao i u ovom istraživanju. Zatim, Bonuccelli i sur. (2017) tretirali su MCF7 staničnu liniju tumora dojke, a rezultati su pokazali kako tretman 1 mM AK otprilike upola smanjuje broj naraslih sferoida, dok 2 mM AK uzrokuje pad u broju sferoida od otprilike 80%. S obzirom da je u ovom istraživanju 10 mM AK gotovo u potpunosti inhibirala stvaranje sferoida, u budućim istraživanjima potrebno je testirati učinak i drugih koncentracija AK između 1 mM i 10 mM. Skube (2018) tretirao je matične stanice osteosarkoma 30 µg/ml (0,17 mM) i 40 µg/ml (0,23 mM) AK. U tretiranim uzorcima došlo je do formiranja samo nekoliko sferoida između 13. i 17. dana uzgoja. U ovom istraživanju nisu korištene koncentracije AK niže od 1 mM, ali možemo svejedno zaključiti da je zabilježen puno blaži efekt inhibicije formiranja sferoida jer su se sferoidi formirali i u uzorcima tretiranim 1 mM AK, samo u manjem broju od kontrolnih uzoraka. Ni jedno od navedenih prethodnih istraživanja, nije testiralo utječe li prisutnost FGF2 na djelovanje AK, stoga je potrebno još istraživanja koja bi testirala i taj utjecaj.

U praćenje površine presjeka najvećih sferoida u pojedinoj skupini uključene su bile samo eksperimentalne skupine tretirane 1 mM AK i kontrolne jer u eksperimentalnim skupinama tretiranim 10 mM AK nije bilo dovoljno zabilježenih sferoida. Kod oba pacijenta pokazalo se da dolazi do puno većeg smanjenja u tretiranoj skupini koja je rasla u prisutnosti FGF2 (u odnosu na kontrolnu koja je rasla u prisutnosti FGF2) nego kod tretirane skupine koja je rasla bez prisutnosti FGF2. Ta razlika pokazala se značajnom u svim danima kod oba pacijenta, a površina sferoida bila

je manja čak upola ili više. Činjenica da je došlo do smanjenja površine presjeka sferoida u tretiranoj skupini u skladu je s početnom pretpostavkom, ali pojava da je takav efekt smanjenja zabilježen kod skupina koje su rasle u prisutnosti FGF2 potpuno je suprotan od pretpostavke da će prisutnost FGF2 negativno utjecati na učinak AK. Kod pacijenta P16 pokazalo se da 1 mM AK nema značajan učinak na smanjenje površine sferoida koji su rasli bez prisutnosti FGF2, dok se kod pacijenta P11 u jednom danu pokazalo da ima značajan učinak, ali i u tom slučaju p-vrijednost bila je veća nego za skupinu tretiranu istom koncentracijom AK koja je rasla u prisutnosti FGF2. Dakle, praćenje utjecaja na površinu sferoida pokazalo je kako postoji statistički značajna interakcija između AK i FGF2. Osim toga, zanimljivo je primjetiti razliku u veličini sferoida između kontrolnih skupina koje su rasle u prisutnosti FGF2 između dva pacijenta. Sferoidi kod pacijenta P11 općenito su u toj skupini bili veći u odnosu na sferoide pacijenta P16, što govori o različitosti stanica tih dvaju pacijenata. U istraživanju u kojem su tretirane Huh7 i Hep3B tumorske stanice jetre s AK također je došlo do smanjenja volumena formiranih sferoida u odnosu na netretirane (Wan i sur. 2021).

Rezultati eksperimenta brojanja sferoida nakon što je tretman dodan 19. dana uzgoja prikazani su normalizirani da bi lakše bili usporedivi jer su se na dan tretmana pojedine jažice jako razlikovale u broju do tad naraslih sferoida. Normalizacijom podataka cilj je bio prikazati, ako sve skupine kreću iz iste pozicije, u kojem smjeru će se kretati broj sferoida u pojedinoj eksperimentalnoj skupini nakon tretmana. U ovom eksperimentu prilično različit rezultat dobiven je između dva pacijenta. Kod pacijenta P16 došlo je do pada, a zatim stagnacije ili sporijeg rasta kod skupina u koje je dodan tretman 10 mM AK u prisutnosti i bez prisutnosti FGF2, dok kod skupina u koje je dodana 1 mM AK nije došlo do primjetnog pada u broju sferoida u odnosu na kontrolne. Takav rezultat djelomično je u skladu s hipotezom jer je do najvećeg učinka došlo u eksperimentalnim skupinama tretiranim 10 mM AK, no hipoteza pretpostavlja da će do blažeg smanjenja doći i u eksperimentalnim skupinama tretiranim 1 mM AK, što se nije dogodilo. Ako usporedimo skupine tretirane 10 mM AK, do veće stagnacije došlo je u onoj skupini koja je rasla u prisutnosti FGF2. Takav rezultat ponovo je potpuno suprotan od onog što je očekivano hipotezom, no takva pojava više puta do sad zabilježena je u ovom istraživanju. Kod ovog pacijenta u svim skupinama došlo je do pada u broju sferoida do sljedećeg mjerenja nakon tretmana, no s

obzirom da je do njega došlo i u kontrolnim skupinama, uzrok tog pada nije dodatak AK. S druge strane, kod pacijenta P11 do zamjetnog pada došlo je kod skupina koje su bile tretirane 10 mM i 1 mM AK, a rasle su u prisutnosti FGF2. Takav rezultat ponovo nije u skladu s hipotezom jer kod ovog pacijenta obje koncentracije AA postižu isti efekt smanjenja u broju sferoida ako su rasle u prisutnosti FGF2, dok je hipoteza pretpostavljala da će efekt biti jači kod 10 mM AK. Također, činjenica da je do smanjenja došlo u onim skupinama koje su rasle u prisutnosti FGF2, dok uopće nije došlo do smanjenja u skupinama koje su rasle bez FGF2, potpuno je suprotna od hipoteze.

Praćenje površine sferoida u eksperimentalnim skupinama nakon istog tretmana 19. dana pokazalo je vrlo heterogene rezultate. Kod pacijenta P16 do sljedećeg mjerenja nakon tretmana došlo je do statistički značajnog pada u svim eksperimentalnim skupinama u odnosu na kontrolne. Najveći pad u odnosu na kontrolnu zabilježen je kod skupine koja je tretirana 10 mM AK, a rasla je u prisutnosti FGF2. Sferoidi u eksperimentalnim skupinama koje su rasle bez FGF2 pali su na nižu razinu, no i kontrolna skupina koja je rasla bez FGF2 nalazila se niže od kontrolne koja je rasla u prisutnosti FGF2. Iako je na grafu primjetna razlika između skupina koje su tretirane 1 mM AK i skupina tretiranih 10 mM AK, statistička analiza pokazala je da ta razlika nije statistički značajna na dan 23. Za sljedeći dan mjerenja, statistička analiza pokazala je da postoji statistički značajna razlika između skupina tretiranih objema koncentracijama AK u odnosu na kontrolnu ako su rasle u prisutnosti FGF2, dok je ta razlika kod onih koje su rasle bez FGF2 značajna samo između skupine tretirane 10 mM AK i kontrolne. Dakle, rezultati ovog eksperimenta kod ovog pacijenta vrlo su heterogeni, neki su u skladu s hipotezom, a neki nisu. Kako bi se testirala valjanost ovakvog rezultata, potrebno bi bilo ponoviti eksperiment s više replika.

Kod pacijenta P11 najveći pad u površini sferoida zabilježen je kod eksperimentalne skupine tretirane 10 mM AK u prisutnosti FGF2, dok skupina tretirana 1 mM AK u prisutnosti FGF2 uopće nije pretrpjela pad u površini sferoida. U obje tretirane skupine koje su rasle bez FGF2 također je došlo do pada u površini sferoida u odnosu na kontrolnu, no ipak manjeg nego kod prethodno spomenute skupine tretirane 10 mM AK koja je rasla u prisutnosti FGF2. Takav rezultat ponovo je samo djelomično u skladu hipotezom. AK generalno je imala negativan učinak na površinu sferoida nakon tretmana, no nije pokazan graduirani efekt u ovisnosti o koncentraciji AK. Također, najveći efekt na smanjenje površine sferoida primijećen je kod skupine koja je tretirana

10 mM AK, a rasla je u prisutnosti FGF2, dok hipoteza pretpostavlja da će FGF2 ublažiti učinak AK. Tijekom istraživanja konzistentno se pokazuje kako FGF2 nema ublažujući učinak na efekt AK, već se ponekad tek u njegovoj prisutnosti postiže maksimalan efekt.

Vezano uz eksperimente provedene uz pomoć uzgoja sferoida, za buduća istraživanja potrebno bi bilo povećati broj replika kako bi se postigla veća statistička snaga rezultata, kako bi se mogla prepoznati velika odstupanja te kako bi većina podataka bila normalno distribuirana i homoscedastična. Idealno bi bilo koristiti digitalni uređaj za brojanje sferoida kako bi istraživanje bilo potpuno objektivno te kako bi se eliminirao faktor subjektivnosti i ljudske pogreške. Time bi se smanjilo ograničenje broja replika koje uzrokuje vrijeme potrebno da prosječna osoba ručno pretraži veliki broj jažica i izbroji sferoide. Osim toga, potrebno je optimizirati metodu izolacije RNA iz sferoida koji su rasli u mediju s metil-celulozom, tj. razviti metodu kojom bi se sferoidi učinkovito izolirali od pojedinačnih stanica i medija u kojem su rasli. Vjerojatno je neuspješna izolacija RNA bila uzrok neuspjeha qPCR analize.

Eksperiment u kojem su stanice tretirane 24 sata, a zatim je pomoću protočnog citometra testirano koliki udio stanica u pojedinom uzorku ulazi u apoptozu, pokazao je konzistentne rezultate kod oba pacijenta. Do velikog porasta udjela stanica koje odlaze u apoptozu (ranih i kasnih) došlo je kod eksperimentalnih skupina tretiranih 10 mM AK, što je u skladu s hipotezom. Kod skupina tretiranih 1 mM AK došlo je do vrlo blagog porasta u broju stanica koje odlaze u apoptozu, što je djelomično u skladu s hipotezom jer je manji porast u odnosu na one koje su tretirane 10 mM AK, ali je puno manji od očekivanog. Razlika između skupina koje su tretirane u prisutnosti FGF2 i bez prisutnosti FGF2 nije vidljiva kod većine skupina, što nije u skladu s hipotezom koja pretpostavlja da će veći broj stanica krenuti u apoptozu kod onih skupina koje su tretirane bez prisutnosti FGF2. Primjetna je jedino između skupina tretiranih 10 mM AK kod pacijenta P16, ali nije velika. U tom slučaju veći broj stanica krenuo je u apoptozu u onoj skupini koja je tretirana bez FGF2 i takav rezultat u skladu je s hipotezom. Ovaj eksperiment razlikuje se od prethodnih u tome što su sve skupine rasle u prisutnosti FGF2, jedino je kod tretmana u neke skupine dodan, a u neke nije. Dakle, one skupine koje su tretirane bez prisutnosti FGF2, rasle su u njegovoj prisutnosti, jedino on nije bio prisutan na kraju tijekom 24-satnog tretmana. To bi mogao biti razlog neprimjetnih razlika između skupina koje su tretirane u prisutnosti i bez prisutnosti

FGF2. Valenti i sur. (2014) testirali su učinak 24-satnog tretmana MG-63 stanica osteosarkoma različitim koncentracijama AK od kojih je najveća bila 1 mM. Njihovi rezultati pokazali su da je nakon tretmana 1 mM AK oko 30 % stanica otišlo u apoptozu nakon 24 sata. U ovom istraživanju taj udio bio je manji i iznosio oko 20%. Razlika u navedenim rezultatima mogla bi biti uzrokovana korištenjem različite vrste stanica. MG-63 je stanična linija osteosarkoma, dok su stanice koje su korištene u ovom istraživanju matične stanice prve generacije dvaju različitih pacijenata. Moguće je da različite stanice imaju različitu osjetljivost na AK. Skube (2018) tretirao je matične stanice osteosarkoma AK koncentracije 30 $\mu\text{g/ml}$ i 40 $\mu\text{g/ml}$ (0,17 mM i 0,23 mM) 24 sata. Pokazalo se da je u kontrolnom uzorku nakon 24 sata 88,58% vijabilnih stanica, što je u skladu i s rezultatom dobivenim u ovom istraživanju kod oba pacijenta. Zatim, pokazalo se da je tretman 30 $\mu\text{g/ml}$ AK smanjio udio živih stanica na samo 9,47%, dok je najveći udio stanica bio u kasnoj apoptozi i nekrozi, a sličan rezultat dobiven je i kada su stanice tretirane s 40 $\mu\text{g/ml}$ AK. Rezultat dobiven u ovom istraživanju nije u skladu s takvim rezultatom jer 1 mM AK (nekoliko puta veća koncentracija), uzrokovala je tek nekoliko postotaka manji udio živih stanica u odnosu na kontrolnu skupinu. Dakle, u ovom istraživanju, matične stanice osteosarkoma pokazale su se manje osjetljivima na određenu dozu AK. Uzrok tome mogao bi biti korištenje stanica različitih pacijenata, no razlika je i uz taj efekt jako velika. Xu i sur. (2020) testirali su kako 24 satni tretman AK stanica ID8 utječe na udio stanica koje odlaze u apoptozu i pokazali su kako 1 mM AK blago povećava broj stanica koje odlaze u apoptozu, dok je 2 mM AK za otprilike 50% povećala taj broj. Takav rezultat više je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, no nije potpuno usporediv jer su korištene mišje epitelne tumorske stanice jajnika. Wan i sur. (2021) pokazali su na Huh7 i Hep3B matičnim tumorskim stanicama jetre da je nakon tretmana 1 mM AK vijabilnost stanica pala na 52,37% i 33,04% u odnosu na kontrolne. Pokazali su da je IC_{50} vrijednost za tretman AK navedenih stanica 1,21 mM (za Huh7) odnosno 0,52 mM (za Hep3B). Navedeni rezultat ponovo pokazuje puno veću osjetljivost tumorskih matičnih stanica na tretman 1 mM AK u odnosu na rezultat dobiven u ovom istraživanju.

S obzirom na dobivene rezultate, u daljnja istraživanja potrebno bi bilo uključiti veći broj replika i veći broj pacijenata. Također, mislim da bi bilo korisno istražiti i druge koncentracije AK koje se nalaze u rasponu od 1 mM do 10 mM jer možda i neka niža koncentracija od 10 mM može

postići isti efekt. Negativan efekt AK zasigurno postoji, ali ga je potrebno jednoznačnije opisati pomoću eksperimenata koji uključuju više uzoraka. Smatram da se daljnja istraživanja mogu provoditi samo u prisutnosti FGF2 jer se pokazalo da njegova prisutnost ne utječe negativno na učinak AK. Tamo i gdje je uočena razlika između skupina tretiranih u prisutnosti i bez prisutnosti FGF2, učinak AK bio je jači u njegovoj prisutnosti.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati istraživanja pokazali su kako AK ima negativan učinak na rast sferoida, njihovu površinu te vitalnost matičnih stanica osteosarkoma. Taj učinak nije se pokazao ovisnim o prisutnosti FGF2, tj. pokazalo se da prisutnost FGF2 nema negativan učinak na djelovanje AK. U nekim slučajevima do negativnog učinka AK došlo je tek u prisutnosti FGF2. Specifični zaključci su:

1. Tretman 10 mM AK gotovo u potpunosti inhibira rast sferoida osteosarkoma u trodimenzionalnoj kulturi, dok 1 mM AK u manjoj mjeri, ali uglavnom također značajno. Takav rezultat u skladu je s pretpostavkom hipoteze da će 10 mM AK imati jači učinak inhibicije od 1 mM AK. Zaključak da taj efekt inhibicije nije bio blaži u prisutnosti FGF2 (nego čak jači u nekoliko slučajeva) nije u skladu s hipotezom da će prisutnost FGF2 negativno utjecati na učinak AK zbog svog oprečnog djelovanja.
2. Tretman 1 mM AK, kada sferoidi rastu u prisutnosti FGF2, značajno smanjuje površinu njihova presjeka, dok na površinu sferoida koji rastu bez prisutnosti FGF2 nema učinak ili je on vrlo mali. Takav zaključak u skladu je s pretpostavkom da će AK negativno utjecati na površinu sferoida osteosarkoma, no u potpunoj je suprotnosti s očekivanjem da će prisutnost FGF2 ublažiti njen učinak. Ovdje je negativan učinak AK na površinu presjeka sferoida primijećen upravo u prisutnosti FGF2.
3. Utjecaj na kretanje broja sferoida nije se pokazao potpuno jednoznačnim kod oba pacijenta kada je AK dodana 19. dana uzgoja. Možemo zaključiti jedino da 10 mM AK smanjuje broj sferoida kada je dodana 19. dana uzgoja u skupinu sferoida koja je rasla u prisutnosti FGF2. Takav zaključak ponovo je samo djelomično u skladu s hipotezom koja također pretpostavlja najveći učinak 10 mM AK na smanjenje broja sferoida, no

pretpostavlja da će on biti jači kod sferoida koji rastu bez prisutnosti FGF2, a ne u njegovoj prisutnosti.

4. Naknadno dodani tretman 10 mM AK u sferoide koji rastu u prisutnosti FGF2 dovodi do najvećeg pada u površini presjeka sferoida kod oba pacijenta. Do pada u površini presjeka također dolazi i kod sferoida naknadno tretiranih 1 mM AK i 10 mM AK bez prisutnosti FGF2 no taj pad u odnosu na kontrolnu skupinu koja raste bez FGF2 nije toliko velik kao kod skupina koje rastu u njegovoj prisutnosti. Takav zaključak ponovo je u skladu s očekivanjem da će 10 mM AK imati najveći učinak, no nije u skladu s očekivanjem da će on biti jači kod sferoida koji rastu bez prisutnosti FGF2.
5. Iz eksperimenta u kojem su matične stanice osteosarkoma prve generacije 24 sata tretirane AK u prisutnosti i bez prisutnosti FGF2, možemo zaključiti da 24-satni tretman 10 mM AK bez obzira na prisutnost FGF2 potakne velik broj stanica da ode u apoptozu (više od 80%), dok 1 mM AK nema značajan učinak u odnosu na kontrolne skupine. Takav učinak 10 mM AK u skladu je s hipotezom, no hipoteza je pretpostavljala da će doći i do slabijeg, ali značajnog učinka 1 mM AK na broj stanica u apoptozi.

S obzirom na sve provedene eksperimente možemo zaključiti da 10 mM AK ima vrlo značajan negativan učinak na broj i veličinu sferoida osteosarkoma u trodimenzionalnoj kulturi te na udio stanica koje odlaze u apoptozu u adherentnoj kulturi matičnih stanica osteosarkoma prve generacije. 1 mM AK također može pokazati značajan utjecaj, no on nije uvijek prisutan i jednoznačan. Prisutnost FGF2 ne ublažava djelovanje AK, u nekim slučajevima čak omogućuje njeno bolje djelovanje.

6. LITERATURA

- Acchiappati G., Randelli G., Randelli M. (1965): [Observations on osteogenous-osteogenetic sarcoma]. Arch. Ortop. **78**: 57–156.
- Adhikari A.S., Agarwal N., Wood B.M., Porretta C., Ruiz B., Pochampally R.R., Iwakuma T. (2010): CD117 and Stro-1 Identify Osteosarcoma Tumor-Initiating Cells Associated with Metastasis and Drug Resistance. Cancer Res. **70**: 4602–4612.
- Asha K., Sachin A., Muzammil S. (2012): Chemotherapy in Osteosarcoma. Osteosarcoma doi:10.5772/45726.
- Bánhegyi G., Braun L., Csala M., Puskás F., Mandl J. (1997): Ascorbate Metabolism and Its Regulation in Animals. Free Radic. Biol. Med. **23**: 793–803.
- Basu-Roy U., Basilico C., Mansukhani A. (2013): Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma. Cancer Lett. **338**: 158–167.
- Batlle E., Clevers H. (2017): Cancer stem cells revisited. Nat. Med. **23**: 1124–1134.
- 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.
- Boye K., Prever A.B. Del, Eriksson M., Saeter G., Tienghi A., Lindholm P., Fagioli F., Skjeldal S., Ferrari S., Hall K.S. (2014): High-dose chemotherapy with stem cell rescue in the primary treatment of metastatic and pelvic osteosarcoma: Final results of the ISG/SSG II study. Pediatr. Blood Cancer **61**: 840–845.
- Buettner G.R. (1993): The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. Arch. Biochem. Biophys. **300**: 535–543.
- Cameron E., Pauling L. (1978): Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. **75**: 4538–4542.

- Carr A.C., Cook J. (2018): Intravenous Vitamin C for Cancer Therapy – Identifying the Current Gaps in Our Knowledge. *Front. Physiol.* **9**: .
- Chen L., Xiao Z., Meng Y., Zhao Y., Han J., Su G., Chen B., Dai J. (2012): The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. *Biomaterials* **33**: 1437–1444.
- 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.
- Cimmino L., Neel B.G., Aifantis I. (2018): Vitamin C in Stem Cell Reprogramming and Cancer. *Trends Cell Biol.* **28**: 698–708.
- 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.
- Coutu D.L., Galipeau J. (2011): Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging (Albany, NY)*. **3**: 920–933.
- DeBerardinis R.J., Chandel N.S. (2016): Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* **2**: .
- Dombrowski C., Helledie T., Ling L., Grünert M., Canning C.A., Jones C.M., Hui J.H., Nurcombe V., Wijnen A.J. van, Cool S.M. (2013): FGFR1 Signaling Stimulates Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells by Inhibiting the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21Waf1 and p27Kip1. *Stem Cells* **31**: 2724–2736.
- Dvorak P., Dvorakova D., Hampl A. (2006): Fibroblast growth factor signaling in embryonic and cancer stem cells. *FEBS Lett.* **580**: 2869–2874.
- Fagioli F., Aglietta M., Tienghi A., Ferrari S., Brach del Prever A., Vassallo E., Palmero A., Biasin E., Bacci G., Picci P., Madon E. (2002): High-Dose Chemotherapy in the Treatment of Relapsed Osteosarcoma: An Italian Sarcoma Group Study. *J. Clin. Oncol.* **20**: 2150–2156.
- Fernandes G., Barone A.W., Dziak R. (2017): The effect of ascorbic acid on bone cancer cells in

vitro . *Cogent Biol.* **3**: 1288335.

Francesco E.M. De, Bonuccelli G., Maggiolini M., Sotgia F., Lisanti M.P. (2017): Vitamin C and Doxycycline: A synthetic lethal combination therapy targeting metabolic flexibility in cancer stem cells (CSCs). *Oncotarget* **8**: 67269–67286.

Fujiwara T., Katsuda T., Hagiwara K., Kosaka N., Yoshioka Y., Takahashi R.-U., Takeshita F., Kubota D., Kondo T., Ichikawa H., Yoshida A., Kobayashi E., Kawai A., Ozaki T., Ochiya T. (2014): Clinical Relevance and Therapeutic Significance of MicroRNA-133a Expression Profiles and Functions in Malignant Osteosarcoma-Initiating Cells. *Stem Cells* **32**: 959–973.

García M.C., Alfaro M.C., Muñoz J. (2016): Rheology of sheared gels based on low acyl-gellan gum. *Food Sci. Technol. Int.* **22**: 325–332.

Gillberg L., Ørskov A.D., Liu M., Harsløf L.B.S., Jones P.A., Grønbaek K. (2018): Vitamin C – A new player in regulation of the cancer epigenome. *Semin. Cancer Biol.* **51**: 59–67.

Glass D.A., Karsenty G. (2007): Minireview: In vivo analysis of Wnt signaling in bone. *Endocrinology* **148**: 2630–2634.

Glumac P.M., LeBeau A.M. (2018): The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clin. Transl. Med.* **7**: .

Go M.J., Takenaka C., Ohgushi H. (2007): Effect of Forced Expression of Basic Fibroblast Growth Factor in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *J. Biochem.* **142**: 741–748.

Golde D.W. (2003): Vitamin C in Cancer. *Integr. Cancer Ther.* **2**: 158–159.

Greco N., Schott T., Mu X., Rothenberg A., Voigt C., McGough III R.L., Goodman M., Huard J., Weiss K.R. (2014): ALDH Activity Correlates with Metastatic Potential in Primary Sarcomas of Bone. *J. Cancer Ther.* **05**: 331–338.

Harris M.A., Hawkins C.J. (2022): Recent and Ongoing Research into Metastatic Osteosarcoma Treatments. *Int. J. Mol. Sci.* **23**: 3817.

- Harris M.B., Cantor A.B., Goorin A.M., Shochat S.J., Ayala A.G., Ferguson W.S., Holbrook T., Link M.P. (1995): Treatment of osteosarcoma with ifosfamide: Comparison of response in pediatric patients with recurrent disease versus patients previously untreated: A pediatric oncology group study. *Med. Pediatr. Oncol.* **24**: 87–92.
- Haydon R.C., Luu H.H., He T.-C. (2007): Osteosarcoma and Osteoblastic Differentiation. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **454**: 237–246.
- HE A., QI W., HUANG Y., FENG T., CHEN J., SUN Y., SHEN Z., YAO Y. (2012): CD133 expression predicts lung metastasis and poor prognosis in osteosarcoma patients: A clinical and experimental study. *Exp. Ther. Med.* **4**: 435–441.
- Honoki (2010): Possible involvement of stem-like populations with elevated ALDH1 in sarcomas for chemotherapeutic drug resistance. *Oncol. Rep.* **24**: .
- Kinpara K., Mogi M., Kuzushima M., Togari A. (2000): Osteoclast Differentiation Factor in Human Osteosarcoma Cell Line. *J. Immunoassay* **21**: 327–340.
- Kivirikko K.I., Myllylä R. (1985): Post-Translational Processing of Procollagens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **460**: 187–201.
- Kleinerman E.S., Gorlick R. (Springer International Publishing: Cham, 2020). *Current Advances in the Science of Osteosarcoma*. *J. Japanese Orthop. Assoc.* **1258**: .
- Kuiper C., Vissers M.C.M. (2014): Ascorbate as a Co-Factor for Fe- and 2-Oxoglutarate Dependent Dioxygenases: Physiological Activity in Tumor Growth and Progression. *Front. Oncol.* **4**: .
- Kulis M., Esteller M. (2010): DNA Methylation and Cancer. 27–56doi:10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2.
- Lamora A., Talbot J., Mullard M., Brounais-Le Royer B., Redini F., Verrecchia F. (2016): TGF- β Signaling in Bone Remodeling and Osteosarcoma Progression. *J. Clin. Med.* **5**: 96.
- Lee Chong T., Ahearn E.L., Cimmino L. (2019): Reprogramming the Epigenome With Vitamin C. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**: .

- Lian Ø., Dahl J., Ackermann P.W., Frihagen F., Engebretsen L., Bahr R. (2006): Pronociceptive and antinociceptive neuromediators in patellar tendinopathy. *Am. J. Sports Med.* **34**: 1801–1808.
- Luu H.H., Song W.-X., Luo X., Manning D., Luo J., Deng Z.-L., Sharff K.A., Montag A.G., Haydon R.C., He T.-C. (2007): Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **25**: 665–677.
- Lv H., Wang C., Fang T., Li T., Lv G., Han Q., Yang W., Wang H. (2018): Vitamin C preferentially kills cancer stem cells in hepatocellular carcinoma via SVCT-2. *npj Precis. Oncol.* **2**: 1.
- Lytle N.K., Barber A.G., Reya T. (2018): Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nat. Rev. Cancer* **18**: 669–680.
- Marina N., Gebhardt M., Teot L., Gorlick R. (2004): Biology and Therapeutic Advances for Pediatric Osteosarcoma. *Oncologist* **9**: 422–441.
- Martins-Neves S.R., Lopes Á.O., Carmo A. do, Paiva A.A., Simões P.C., Abrunhosa A.J., Gomes C.M. (2012): Therapeutic implications of an enriched cancer stem-like cell population in a human osteosarcoma cell line. *BMC Cancer* **12**: 139.
- Mastrangelo D., Pelosi E., Castelli G., Lo-Coco F., Testa U. (2018): Mechanisms of anti-cancer effects of ascorbate: Cytotoxic activity and epigenetic modulation. *Blood Cells, Mol. Dis.* **69**: 57–64.
- Melamed P., Yosefzon Y., David C., Tsukerman A., Pnueli L. (2018): Tet Enzymes, Variants, and Differential Effects on Function. *Front. Cell Dev. Biol.* **6**: .
- Meyers P.A. (2004): High-dose therapy with autologous stem cell rescue for pediatric sarcomas. *Curr. Opin. Oncol.* **16**: 120–125.
- Mirabello L., Troisi R.J., Savage S.A. (2009): Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004. *Cancer* **115**: 1531–1543.
- Murase M., Kano M., Tsukahara T., Takahashi A., Torigoe T., Kawaguchi S., Kimura S., Wada T., Uchihashi Y., Kondo T., Yamashita T., Sato N. (2009): Side population cells have the characteristics of cancer stem-like cells/cancer-initiating cells in bone sarcomas. *Br. J. Cancer*

101: 1425–1432.

Najafi M., Farhood B., Mortezaee K. (2019): Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *J. Cell. Physiol.* **234:** 8381–8395.

Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R., Crombrugge B. de (2002): The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell* **108:** 17–29.

Ngo B., Riper J.M. Van, Cantley L.C., Yun J. (2019): Targeting cancer vulnerabilities with high-dose vitamin C. *Nat. Rev. Cancer* **19:** 271–282.

Oka N., Komuro A., Amano H., Dash S., Honda M., Ota K., Nishimura S., Ueda T., Akagi M., Okada H. (2020): Ascorbate sensitizes human osteosarcoma cells to the cytostatic effects of cisplatin. *Pharmacol. Res. Perspect.* **8:** 1–12.

Padayatty S., Levine M. (2016): Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Dis.* **22:** 463–493.

Palmi G., Zonefrati R., Mavilia C., Aldinucci A., Luzi E., Marini F., Franchi A., Capanna R., Tanini A., Brandi M.L. (2016): Establishment of Cancer Stem Cell Cultures from Human Conventional Osteosarcoma. *J. Vis. Exp.* **2016:** 1–17.

Palomeras S., Rabionet M., Ferrer I., Sarrats A., Garcia-Romeu M., Puig T., Ciurana J. (2016): Breast Cancer Stem Cell Culture and Enrichment Using Poly(ϵ -Caprolactone) Scaffolds. *Molecules* **21:** 537.

Parrow N.L., Leshin J.A., Levine M. (2013): Parenteral Ascorbate As a Cancer Therapeutic: A Reassessment Based on Pharmacokinetics. *Antioxid. Redox Signal.* **19:** 2141–2156.

Patel S.R., Papadopolous N., Raymond A.K., Donato M., Seong C.M., Yasko A.W., Lewis V.O., Lin P.P., Champlin R., Benjamin R.S. (2004): A phase II study of cisplatin, doxorubicin, and ifosfamide with peripheral blood stem cell support in patients with skeletal osteosarcoma and variant bone tumors with a poor prognosis. *Cancer* **101:** 156–163.

Peterkofsky B. (1991): Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen:

- relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**: 1135S-1140S.
- Pijper A. (1947): Methylcellulose and Bacterial Motility. *J. Bacteriol.* **53**: 257–269.
- Powers C.J., McLeskey S.W., Wellstein A. (2000): Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat. Cancer* 165–197doi:10.1677/erc.0.0070165.
- Prasetyanti P.R., Medema J.P. (2017): Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol. Cancer* **16**: 41.
- Quinn J.M.W., Itoh K., Udagawa N., Häusler K., Yasuda H., Shima N., Mizuno A., Higashio K., Takahashi N., Suda T., Martin T.J., Gillespie M.T. (2001): Transforming Growth Factor β Affects Osteoclast Differentiation via Direct and Indirect Actions. *J. Bone Miner. Res.* **16**: 1787–1794.
- Rao W., Zhao S., Yu J., Lu X., Zynger D.L., He X. (2014): Enhanced enrichment of prostate cancer stem-like cells with miniaturized 3D culture in liquid core-hydrogel shell microcapsules. *Biomaterials* **35**: 7762–7773.
- Reya T., Clevers H. (2005): Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**: 843–850.
- Rosemann M., Kuosaitė V., Nathrath M., Atkinson M.J. (2002): The genetics of radiation-induced and sporadic osteosarcoma: A unifying theory? *J. Radiol. Prot.* **22**: .
- Rumsey S.C., Daruwala R., Al-Hasani H., Zarnowski M.J., Simpson I.A., Levine M. (2000): Dehydroascorbic Acid Transport by GLUT4 in *Xenopus* Oocytes and Isolated Rat Adipocytes. *J. Biol. Chem.* **275**: 28246–28253.
- Rumsey S.C., Kwon O., Xu G.W., Burant C.F., Simpson I., Levine M. (1997): Glucose Transporter Isoforms GLUT1 and GLUT3 Transport Dehydroascorbic Acid. *J. Biol. Chem.* **272**: 18982–18989.
- Satheesh N.J., Samuel S.M., Büsselberg D. (2020): Combination therapy with vitamin C could eradicate cancer stem cells. *Biomolecules* **10**: .
- Schiavone K., Garnier D., Heymann M.-F., Heymann D. (2019): The Heterogeneity of

- Osteosarcoma: The Role Played by Cancer Stem Cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1139**: 187–200.
- Semenza G.L. (2012): Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**: 207–214.
- Silginer M., Weller M., Ziegler U., Roth P. (2014): Integrin inhibition promotes atypical anoikis in glioma cells. *Cell Death Dis.* **5**: e1012–e1012.
- Skube K. (2018): Učinci askorbinske kiseline na matične stanice osteosarkoma. .
- Stoch S., Wagner J. (2008): Cathepsin K Inhibitors: A Novel Target for Osteoporosis Therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**: 172–176.
- Su G., Zhao Y., Wei J., Han J., Chen L., Xiao Z., Chen B., Dai J. (2013): The effect of forced growth of cells into 3D spheres using low attachment surfaces on the acquisition of stemness properties. *Biomaterials* **34**: 3215–3222.
- SUN D.-X., LIAO G.-J., LIU K.-G., JIAN H. (2015): Endosialin-expressing bone sarcoma stem-like cells are highly tumor-initiating and invasive. *Mol. Med. Rep.* **12**: 5665–5670.
- Thomas D., Kansara M. (2006): Epigenetic modifications in osteogenic differentiation and transformation. *J. Cell. Biochem.* **98**: 757–769.
- Torti S. V., Torti F.M. (2013): Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat. Rev. Cancer* **13**: 342–355.
- Trihia H., Valavanis C. (2012): Histopathology and Molecular Pathology of Bone and Extraskeletal Osteosarcomas. *Osteosarcoma* doi:10.5772/31431.
- Tsutsumi S., Shimazu A., Miyazaki K., Pan H., Koike C., Yoshida E., Takagishi K., Kato Y. (2001): Retention of Multilineage Differentiation Potential of Mesenchymal Cells during Proliferation in Response to FGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**: 413–419.
- Valenti M.T., Zanatta M., Donatelli L., Viviano G., Cavallini C., Scupoli M.T., Dalle Carbonare L. (2014): Ascorbic acid induces either differentiation or apoptosis in MG-63 osteosarcoma lineage. *Anticancer Res.* **34**: 1617–27.

- Vallette F.M., Olivier C., Lézot F., Oliver L., Cochonneau D., Lalier L., Cartron P.-F., Heymann D. (2019): Dormant, quiescent, tolerant and persister cells: Four synonyms for the same target in cancer. *Biochem. Pharmacol.* **162**: 169–176.
- Vilela J.A.P., Cunha R.L. da (2016): High acyl gellan as an emulsion stabilizer. *Carbohydr. Polym.* **139**: 115–124.
- Wan J., Zhou J., Fu L., Li Y., Zeng H., Xu X., Lv C., Jin H. (2021): Ascorbic Acid Inhibits Liver Cancer Growth and Metastasis in vitro and in vivo, Independent of Stemness Gene Regulation. *Front. Pharmacol.* **12**: .
- WANG Y., TENG J.-S. (2016): Increased multi-drug resistance and reduced apoptosis in osteosarcoma side population cells are crucial factors for tumor recurrence. *Exp. Ther. Med.* **12**: 81–86.
- Weiswald L.-B., Bellet D., Dangles-Marie V. (2015): Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia* **17**: 1–15.
- Xu Y., Guo X., Wang G., Zhou C. (2020): Vitamin C Inhibits Metastasis of Peritoneal Tumors By Preventing Spheroid Formation in ID8 Murine Epithelial Peritoneal Cancer Model. *Front. Pharmacol.* **11**: .
- Yang M., Yan M., Zhang R., Li J., Luo Z. (2011): Side population cells isolated from human osteosarcoma are enriched with tumor-initiating cells. *Cancer Sci.* **102**: 1774–1781.
- Ying M., Liu G., Shimada H., Ding W., May W.A., He Q., Adams G.B., Wu L. (2013): Human osteosarcoma CD49^f-CD133⁺ cells: impaired in osteogenic fate while gain of tumorigenicity. *Oncogene* **32**: 4252–4263.
- Yu L., Liu S., Zhang C., Zhang B., Simões B.M., Eyre R., Liang Y., Yan H., Wu Z., Guo W., Clarke R.B. (2013): Enrichment of human osteosarcoma stem cells based on hTERT transcriptional activity. *Oncotarget* **4**: 2326–2338.
- Zaragosi L., Ailhaud G., Dani C. (2006): Autocrine Fibroblast Growth Factor 2 Signaling Is Critical for Self-Renewal of Human Multipotent Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells* **24**: 2412–

2419.

Zhang D., Zhao Q., Sun H., Yin L., Wu J., Xu J., He T., Yang C., Liang C. (2016): Defective autophagy leads to the suppression of stem-like features of CD271+ osteosarcoma cells. *J. Biomed. Sci.* **23**: 82.

Zhang H., Wu H., Zheng J., Yu P., Xu L., Jiang P., Gao J., Wang H., Zhang Y. (2013): Transforming Growth Factor β 1 Signal is Crucial for Dedifferentiation of Cancer Cells to Cancer Stem Cells in Osteosarcoma. *Stem Cells* **31**: 433–446.

Zhang W., Zhao J.-M., Lin J., Hu C.-Z., Zhang W.-B., Yang W.-L., Zhang J., Zhang J.-W., Zhu J. (2018): Adaptive Fibrogenic Reprogramming of Osteosarcoma Stem Cells Promotes Metastatic Growth. *Cell Rep.* **24**: 1266-1277.e5.

Zhou L., Zhang L., Wang S., Zhao B., Lv H., Shang P. (2020a): Labile iron affects pharmacological ascorbate-induced toxicity in osteosarcoma cell lines. *Free Radic. Res.* **54**: 385–396.

Zhou Z., Li Y., Kuang M., Wang X., Jia Q., Cao J., Hu J., Wu S., Wang Z., Xiao J. (2020b): The CD24+ cell subset promotes invasion and metastasis in human osteosarcoma. *EBioMedicine* **51**: 102598.

Zhu Z., Chen L., Liu J., Huang J., Wu G., Zheng Y., Yao K. (2017): A novel three-dimensional tumorsphere culture system for the efficient and low-cost enrichment of cancer stem cells with natural polymers. *Exp. Ther. Med.* **15**: 85–92.

Zweigerdt R., Olmer R., Singh H., Haverich A., Martin U. (2011): Scalable expansion of human pluripotent stem cells in suspension culture. *Nat. Protoc.* **6**: 689–700.

ŽIVOTOPIS

Zovem se Monika Ranilović. Rođena sam 10. siječnja 1999. u Koprivnici. Trenutno studiram na drugoj godini Diplomskog studija molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Preddiplomski studij molekularne biologije završila sam 2020. g. također na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Na preddiplomskom studiju ostvarila sam prosjek ocjena 4,76, a na diplomskom 4,86. Izborni predmet Stručnu praksu odradila sam u InovaGen d.o.o. Od 2013. g. do 2017. g. išla sam u prirodoslovno-matematičku gimnaziju u Gimnaziji „Fran Galović“ u Koprivnici. Sudjelovala sam na županijskim natjecanjima iz fizike, kemije i biologije, a iz fizike sam tri puta bila na državnom natjecanju. Do sada sam radila više studentskih poslova (konobarenje i rad u arhivi) koji su mi omogućili stjecanje radnih navika. Trenutno radim studentski posao u InovaGen d.o.o., firmi koja se bavi testiranjem životinjskih uzoraka na genetske bolesti. Taj posao pomogao mi je da steknem samopouzdanje u radu u laboratoriju. Poslovi koje radim su izolacija DNA, priprema PCR-a, elektroforeza, pročišćavanje PCR produkta, sekvenciranje, dizajn početnica, održavanje laboratorija, itd.

Od stranih jezika razumijem i govorim engleski jezik, dok španjolski razumijem vrlo dobro, ali nisam ga imala prilike govoriti. Od računalnih programa, imam iskustva u radu s MS Office-om, Photoshop-om, SnapGene-om i ImageJ-om. U slobodno vrijeme bavim se fotografiranjem i crtanjem portreta.

