

Praćenje karakteristika matičnih stanica osteosarkoma čovjeka tijekom progresije bolesti

Ivanišin, Andrija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:217:492251>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Andrija Ivanišin

**Praćenje karakteristika matičnih stanica
osteosarkoma čovjeka tijekom progresije
bolesti**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju zavoda za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Inga Urlić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Za početak iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ingi Urlič na pristupačnosti, ljubaznosti i pomoći kao i na sveukupnom ugodnom iskustvu rada na ovom diplomskom radu.

Također, veliko hvala i asistentici mag. nutr. clin. Karli Ostojić na strpljenju, obazrivosti i pomoći pri radu kako eksperimentalnog tako i pisanog dijela ovog diplomskog rada.

Svim mojim prijateljima i onima koji više nisu s nama od srca hvala za vrijeme provedeno u druženju i zabavi, ali i u ozbiljnim trenutcima koje smo zajedno prošli. :)

Najveće hvala mojoj obitelji mami i tati, nani i didu, babi i dedu te tetama i dundu na podršci i ljubavi koje su mi pružili kroz moje studiranje, a i prije, a nadam se i poslije. Za kraj hvala mom psu Aronu i mačku Garfildu što su tako slatki i umiljati.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Praćenje karakteristika matičnih stanica osteosarkoma čovjeka tijekom progresije bolesti

Andrija Ivanišin

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Osteosarkom najčešći je primarni tumor kosti, a karakteriziraju ga maligne stanice mezenhinskog porijekla koje stvaraju osteoide. Stopa dugotrajne izliječenosti ovog tumora ponajviše ovisi o prisutnosti metastaza, prvenstveno plućnih i koštanih za vrijeme dijagnoze, koje su ujedno i glavni uzročnik smrti u ovoj bolesti. Sve više istraživanja ističe matične stanice raka, populaciju tumorskih stanica koje imaju sposobnost samoobnove i diferencijacije u sve ostale tumorske stanice kao jedan od glavnih uzročnika otpornosti na kemoterapeutike i povratka bolesti. Iz tih razloga u ovom istraživanju pratili smo promjene u metastatskom potencijalu, rezistenciji na kemoterapeutike i aktivnosti telomeraze u tumorskim matičnim stanicama tijekom progresije bolesti: za vrijeme dijagnoze, nakon prvog ciklusa kemoterapije te nakon recidiva bolesti. Utvrđen je pad u udjelu matičnih stanica raka nakon prvog ciklusa kemoterapije te njegov porast nakon recidiva bolesti što je u korelaciji s metastatskim potencijalom tumora. Nije zabilježena aktivnost telomeraze ni u jednoj fazi bolesti što upućuje na moguću aktivnost alternativnog mehanizma produljenja telomera, što bi trebalo biti ispitano u daljnjim istraživanjima. Osteosarkom je pokazao najmanju rezistenciju na kemoterapeutike neposredno nakon prvog ciklusa kemoterapije.

Ključne riječi: osteosarkom, matične stanice, metastaze, telomeraza, ALT, rezistencija
(60 stranica, 25 slika, 5 tablica, 63 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Prof. dr. sc. Inga Urlić

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Inga Urlić
Prof. dr. sc. Nada Oršolić
Prof. dr. sc. Maja Matulić

Rad prihvaćen: 05.09.2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Monitoring the characteristics of osteosarcoma human stem cells during disease progression

Andrija Ivanišin

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Osteosarcoma is the most common primary bone tumor, characterized by malignant cells of mesenchymal origin, which produce osteoid. The percentage of long-term cure rate mostly depends on the presence of metastases, primarily of lung and bone during diagnoses, which are also the main cause of death in this disease. More and more research highlights cancer stem cells, a population of tumor cells that can self-renew and differentiate into all other cancer cells as a main source of chemotherapy resistance and disease recurrence. For these reasons in this research, we monitored the change in metastatic potential, chemotherapy resistance and telomerase activity in cancer stem cells during disease progression: during diagnoses, after the first round of chemotherapy and after disease recurrence. We noticed a decrease in cancer stem cell rate after the first round of chemotherapy along with its rise after the disease recurrence, which correlates with metastatic potential of the tumor. Telomerase activity was not registered in either disease phase, which might point to the activity of the alternative mechanism of telomere elongation, which should be tested in further research. Osteosarcoma showed the least resistance to the chemotherapeutic agents immediately after the first round of chemotherapy.

Keywords: osteosarcoma, stem cells, metastases, telomerase, ALT, resistance
(60 pages, 25 figures, 5 tables, 63 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Inga Urlić, PhD

Reviewers:

Prof. Inga Urlić, PhD
Prof. Nada Oršolić, PhD
Prof. Maja Matulić, PhD

Thesis accepted: 05.09.2024.

Sadržaj

1	Uvod	1
1.1	Osteosarkom	1
1.2	Etiologija osteosarkoma	1
1.2.1	Inicijacija i promocija	2
1.2.2	Progresija	3
1.3	Genetika osteosarkoma	5
1.3.1	Učestale mutacije	6
1.4	Dijagnoza i klasični slijed terapije	9
1.4.1	Djelovanje kemoterapeutika	11
1.5	Matične stanice raka	13
1.5.1	Porijeklo matičnih stanica raka	14
1.6	Interakcija matičnih stanica s mikrokolišem kosti	16
1.7	Mehanizmi besmrtnosti	20
1.7.1	Telomeraza	21
1.7.2	Alternativni mehanizam produljenja telomera	22
1.7.3	Utjecaj telomera i telomeraze na razvoj osteosarkoma	22
2	Cilj istraživanja	24
3	Materijali i metode	25
3.1	Uzgoj matičnih stanica osteosarkoma	25
3.2	Test formiranja sferoida	25
3.3	Mjerenje relativne duljine telomera	26
3.3.1	Izolacija DNA	26
3.3.2	Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu	27
3.4	Detekcija ekspresije telomeraze	28
3.4.1	Izolacija RNA	28
3.4.2	Tretman uzoraka DNazom	28
3.4.3	Sinteza cDNA	29
3.4.4	Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu	29
3.5	Određivanje vijabilnosti stanica nakon tretmana kemoterapeuticima	31

3.6	Statistička obrada podataka	32
4	Rezultati	33
4.1	Sposobnost formiranja sferoida kod stanica osteosarkoma	33
4.2	Analiza relativne duljine telomera u uzorcima stanica osteosarkoma	34
4.3	Analiza ekspresije telomeraze u uzorcima stanica osteosarkoma.....	36
4.4	Analiza vijabilnosti stanica osteosarkoma nakon tretmana kemoterapeuticima	36
5	Rasprava.....	48
6	Zaključak	53
7	Literatura.....	54

Popis kratica:

EMT – epitelno-mezenhimalna tranzicija (engl. *epithelial-mesenchymal transition*)

CDK – ciklin ovisne kinaza (engl. *cyclin-dependent kinases*)

EV – izvanstanični vezikuli (engl. *extracellular vesicles*)

CT - računalna tomografija (engl. *computed tomography*)

MRI - magnetska rezonanca (engl. *magnetic resonance imaging*)

PET - pozitronsku emisijsku tomografiju (engl. *positron emission tomography*)

ALP - alkalna fosfataza (engl. *alkaline phosphatase*)

LDH - laktat dehidrogenaza (engl. *lactate dehydrogenase*)

DOX – doksorubicin (engl. *doxorubicin*)

TOP2 – topoizomeraza II (engl. *topoisomerase II*)

ROS – reaktivni kisikovi radikali (engl. *reactive oxygen species*)

CIS – cisplatina (engl. *cisplatin*)

MET – metotreksat (engl. *methotrexate*)

DHFR – dihidrofolat reduktaza (engl. *dihydrofolate reductase*)

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

MSC – mezenhimske matične stanice (engl. *mesenchymal stem cells*)

BMP - koštani morfogenetski protein (engl. *bone morphogenetic proteins*)

RB - retinoblastomski protein (engl. *retinoblastoma protein*)

PTHrP - peptid strukturno sličan paratiroidnom hormonu (engl. *parathyroid hormone-related protein*)

IL – interleukin (engl. *interleukin*)

TGF- β – transformirajući faktor rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*)

FGF – faktor rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor*)

HIF – hipoksijom inducirani faktor (engl. *hypoxia-inducible factor*)

RANK - receptor aktivatora nuklearnog faktora kapa B (engl. *receptor activator of nuclear factor-kappa B*)

RANKL - liganda za receptor aktivatora nuklearnog faktora kapa B (engl. *receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand*)

TNF α – faktor nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*)

ALT - alternativno produljivanje telomera (engl. *alternative lengthening of telomeres*)

RT – reverzna transkriptaza (engl. *reverse transcriptase*)

TERT – proteinska komponenta telomeraze (engl. *telomerase reverse transcriptase*)

TER – RNA komponenta telomeraze (engl. *telomerase RNA component*)

PML – protein promijelocitne leukemije (engl. *the promyelocytic leukemia protein*)

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

FBS - fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*)

PBS - fosfatni pufer (engl. *phosphate buffer saline*)

EGF - epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*)

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (engl. *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*)

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

1 Uvod

1.1 Osteosarkom

Maligne neoplazme koje nastaju iz vezivnog tkiva nazivaju se sarkomi te se nadalje mogu razlikovati ovisno o vrsti tkiva iz kojeg potječu, pa tako razlikujemo sarkome mekog tkiva te osteosarkom, tumor koštanog tkiva. Upravo osteosarkom najčešći je maligni primarni tumor kostiju (Jones 2011, Compton 2020). Karakteriziraju ga maligne stanice mezenhinskog porijekla koje stvaraju osteoide, nemineralizirani dio koštanog matriksa građen od kolagena i ljepljivog mukopolisaharida (Lindsey i sur. 2017). Pojava ovog tumora zabilježena je u svim tipovima kostiju, no najčešće se formira u dugim kostima udova - specifično, najčešće nastaje u distalnoj regiji nadlaktične kosti te proksimalnoj regiji bedrene i podkoljenične kosti što su regije poznate kao „zone rasta“, to jest područja intenzivne proliferacije (Abarrategi 2016).

Stopa izlječenja pacijenata s ovim tipom tumora uvelike ovisi o prisutnosti metastaza u vrijeme dijagnoze; u slučaju nemetastatskog oblika vjerojatnost pozitivnog ishoda liječenja iznosi relativno visokih 60%, no ona drastično pada kod pacijenata kod kojih su metastaze bile prisutne. Stopa preživljavanja kod pacijenata s plućnim i koštanim metastazama kroz pet godina iznosi niskih 19%, a čak 40% od prethodno spomenutih izliječenih osoba naknadno razvija sekundarne metastaze. Ovako niski postotci izlječenja konstantni su kroz proteklih par desetljeća što nam ukazuje na nužnost pronalaska novih, boljih i za pacijenta specifičnijih, pristupa liječenju. (Lindsey i sur. 2017).

1.2 Etiologija osteosarkoma

Iako su uočene mnoge poveznice između razvoja osteosarkoma te dobi, spola, rase, genomskih promjena i okolišnih faktora, etiologija bolesti nije u potpunosti jasna, a razlog tomu jest iznimna heterogenost patogeneze i genetike tumora (Lindsey i sur. 2017).

Svi tumori, pa tako i osteosarkom, nastaju zbog postepenog nakupljanja mutacija ključnih gena koje rezultiraju nekontroliranom i povećanom proliferacijom stanica. Ključni geni u procesu razvoja raka, to jest karcinogeneze su onkogeni, tumor supresor geni te geni odgovorni za popravak DNA. Produkti onkogeni ključni su u promociji rasta stanice, dok produkti tumor supresor gena imaju inhibirajuću ulogu u tom procesu (Broadhead i sur. 2011, Hill 2019).

Mutacije u genomu neophodan su korak u nastanku tumora, a na njihovu učestalost utječu okolišni faktori, nasljeđivanje i nasumične mutacije tijekom normalne replikacije DNA. U okolišne faktore spadaju svi vanjski utjecaji koji mogu dovesti do povećanja stope mutacija kao što su različiti kemijski i infektivni karcinogeni te izloženost radijaciji. Zanimljiva je činjenica da je upravo liječenje malignih bolesti radijacijom jedan od vodećih uzroka nastanka osteosarkoma u starijoj dobi. Infektivni karcinogeni, koji su najčešće virusi, nisu utvrđeni kao uzročnici osteosarkoma (Jones 2011, Compton 2020).

Nasumične mutacije normalna su i relativno česta pojava tijekom replikacije DNA, no većina ovakvih mutacija ili biva popravljena prije nego što stanica uđe u diobu, ili pak u slučaju nemogućnosti popravka stanica ulazi u kontroliranu staničnu smrt, apoptozu, čime se sprječava mogućnost nastanka tumora. Ako mutacija ne bude primijećena tijekom provjere repliciranog DNA materijala koju vrši enzim DNA polimeraza, ili ako stanica nije u mogućnosti ući u apoptozu, postoji opasnost od nastanka tumora. Iz navedenog može se zaključiti da stanice koje prolaze kroz veći broj dioba imaju i veći rizik da postanu maligne.

Nadalje, samo mutacije u kodirajućoj regiji genoma mogu uzrokovati funkcionalne promjene u proteinskom produktu (Tomasetti i sur. 2017, Compton 2020). Mutacije u promotorskoj ili kodirajućoj regiji onkogena koje dovode do povećanja ekspresije produkata onkogena ili njihove promjene u funkciji dovode do nekontrolirane proliferacije stanica, a delecijom ili mutacijom koja inaktivira produkte tumor supresor gena dolazi do gubitka njihove inhibirajuće funkcije što također dovodi do nekontrolirane diobe stanica. Važnu razliku u onkogenezi čini količina mutiranih alela u ovisnosti s vrstom produkta za kojeg ti geni kodiraju; naime, jedan funkcionalni alel tumor supresor gena i dalje će stvarati funkcionalni proteinski produkt koji može obavljati svoju inhibirajuću funkciju, što znači da za prestanak funkcije takvog gena su potrebne mutacije u oba alela. Suprotno tome, mutacija samo jednog alela onkogena dovodi do njegove aberante funkcije čime se stvara proteinski produkt koji će nekontrolirano promovirati proliferaciju neovisno o zdravom alelu (Compton 2020).

1.2.1 Inicijacija i promocija

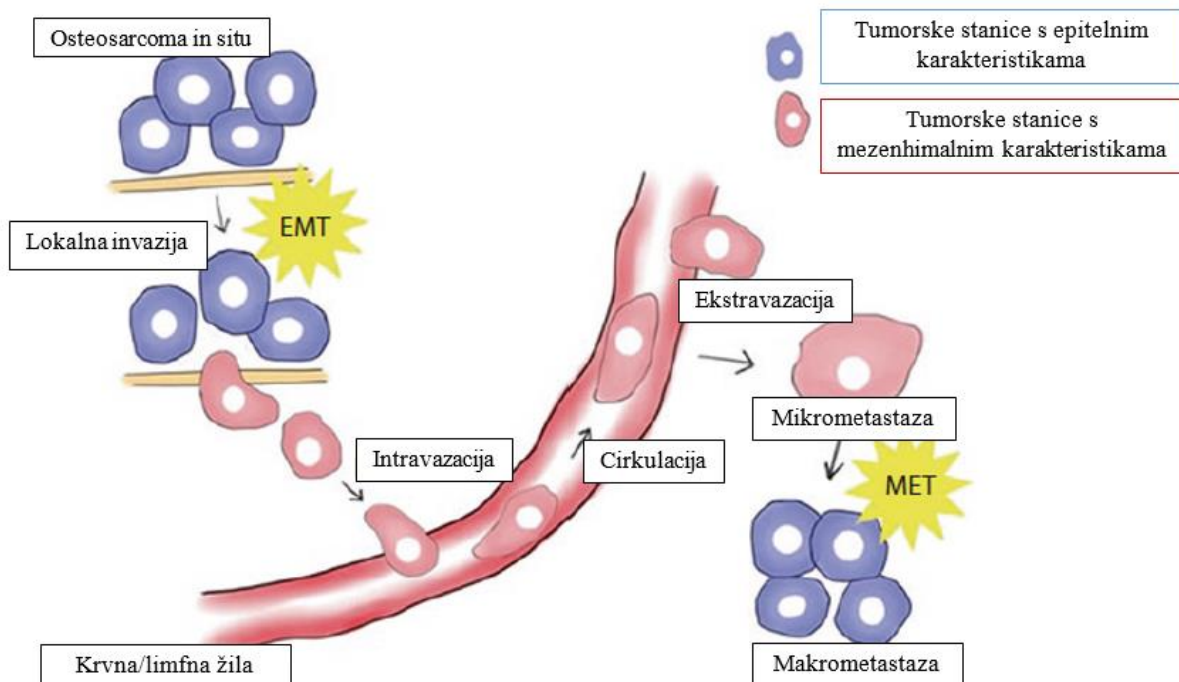
Nastanak prve ključne mutacije u stanici koja može ući u diobu naziva se inicijacija. Ta stanica diobom stvara klonove koji također sadrže tu mutaciju kroz proces koji se naziva promocija. Kroz

promociju se povećava proliferacija transformiranih stanica, ali stanice ne prikupljaju nove mutacije. Tijekom klonalne ekspanzije genom nastalih stanica kćeri mutira na različite načine, čime nastaju grupe subklonova s različitim karakteristikama. Ovaj proces naziva se progresija i odgovoran je za iznimnu heterogenost tumorskih stanica. Također, progresija je ključna faza za razvoj tumora jer mu omogućava sakupljanje karakteristika koje mu pomažu u preživljavanju, kao što su nekontroliran rast, invazija u okolna tkiva i stvaranje metastaza (Broadhead i sur. 2011).

Postoje dva modela tumorigeneze koja nisu međusobno isključiva, prema prvom tumorske stanice podilaze selektivnom pritisku da preživljavaju i rastu, a po drugom unutar tumora postoje matične stanice odgovorne za proliferaciju (Odri i sur. 2022). Geni za popravak DNA također imaju bitnu ulogu u ovome procesu te njihovom mutacijom se proces karcinogeneze ubrzava, zbog daljnjeg nakupljanja mutacija koje se ne mogu popraviti (Broadhead i sur. 2011, Hill 2019).

1.2.2 Progresija

Mogućnost stvaranja metastaza najsmrtonosnija je karakteristika osteosarkoma. Kako bi mogle stvarati metastaze, tumorske stanice moraju proći niz strukturnih i funkcionalnih promjena kojima poprimaju osobine mezenhimalnih stanica, proces zvan epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT). Iako je osteosarkom tumor mezenhimalnog porijekla, ovaj proces ključan je u reprogramiranju tumorskih stanica prema većem metastatskom potencijalu. Promjena u ekspresiji kadherina, molekula odgovornih za vezu između stanica i promjena u ekspresiji integrina, molekula odgovornih za vezu između stanica i izvanstaničnog matriksa omogućuje stanicama odvajanje od primarnog tumora, dok stvaranje enzima kao što metaloproteaze omogućava razgradnju vezivnog tkiva. Kroz EMT tumorske stanice dobivaju mogućnost kretanja i razgradnje vezivnog tkiva što je neophodno za dopiranje do krvnih ili limfnih žila koje koriste za prijenos u udaljene dijelove tijela (put prikazan na Slici 1).



Slika 1. Faze kroz koje tumorske stanice moraju proći kako bi formirale metastaze. Osteosarkom *in situ* zadržava se u tkivu u kojem je nastao, no nakon probijanja bazalne membrane tumorske stanice se šire u okolno tkivo, ulaze u krvne ili limfne žile te putuju do mjesta ekstravazacije u novo tkivo (preuzeto i prilagođeno prema Compton 2020).

Stanice osteosarkoma većinom koriste krvne žile pri stvaranju metastaza. Probijanje tumorskih stanica u krvne žile naziva se intravazacija. Ovo je zahtjevan proces za tumorske stanice, s obzirom da one stanice koje uspiju ući u krvne žile moraju preživjeti radikalnu promjenu okoliša. Zbog činjenice da će u krvi tumorske stanice biti u suspenziji, neophodna prilagodba je izbjegavanje inducirane stanične smrti zbog gubitka veza s izvanstaničnim matriksom ili takozvani anoikis. Zatim tumorske stanice izlaze iz žila kroz proces koji se naziva ekstravazacija. Tumorske stanice izlaze iz krvnih žila u povoljnom okolišu kojeg mogu signalizirati različite molekule koje induciraju vezanje tumorskih stanica za endotelne stanice. Tumorske stanice osteosarkoma prvenstveno stvaraju metastaze u plućima i drugim kostima, no mogu metastazirati i u ostale organe. Nakon ekstravazacije tumorske stanice moraju ponovno poprimiti karakteristike epitelnih stanica kako bi mogle preživjeti i proliferirati u novom okolišu procesom koji se naziva mezenhimalno-epitelna tranzicija (Compton 2020, Odri i sur. 2022).

Progresija je dugotrajan proces koji ne staje, tumorske stanice postupno nakupljaju mutacije koje su odgovorne za karakteristike tumora koje ga čine sve bolje prilagođenim za daljnje širenje:

konstantna aktivnost proliferativnih signala, izbjegavanje inhibicije rasta, gubitak sposobnosti apoptoze, neograničena sposobnost diobe, promjena metabolizma stanice, stvaranje novih krvnih žila ili angiogeneza, sposobnost invazije i stvaranja metastaza, izbjegavanje imunskog sustava i mogućnost kontroliranja okolnih netumorskih stanica u svoju korist. U sljedećem poglavlju proći ću kroz neke od najvažnijih genskih promjena osteosarkoma koje omogućuju navedene karakteristike (Compton 2020).

1.3 Genetika osteosarkoma

Jedna od karakteristika osteosarkoma izrazita je heterogenost patogeneze i genetike te je zbog velike količine promjena u genomu teško odrediti koje su promjene ključne za inicijaciju i progresiju tumora. Iz mnogih promjena u genomu bitno je izdvojiti „pokretačke“ (engl. *driver*) mutacije koje su odgovorne za inicijaciju i proliferativnu prednost tumora nad normalnim stanicama. Uz njih postoje i „sputničke“ (engl. *passenger*) mutacije koje ne utječu na inicijaciju tumora. „Sputničke“ mutacije česte su u koštanim stanicama koje se konstantno dijele u svrhu oporavka koštanog tkiva (Rickel i sur. 2017).

Iako je većina slučajeva sporadična, istraživanja ljudskih nasljednih bolesti povezanih s predispozicijom za razvijanje osteosarkoma, pomogla su u otkrivanju nekih od genskih modifikacija odgovornih za inicijaciju osteosarkoma (Abarrategi 2016, Lindsey i sur. 2017). Sve nasljedne bolesti kojima je dokazana povezanost s razvitkom osteosarkoma vezane su uz mutirane tumor supresor gene kao što su nasljedni retinoblastom i gen *RBI* te Li-Fraumeni sindroma i gen *TP53* (Rickel i sur. 2017).

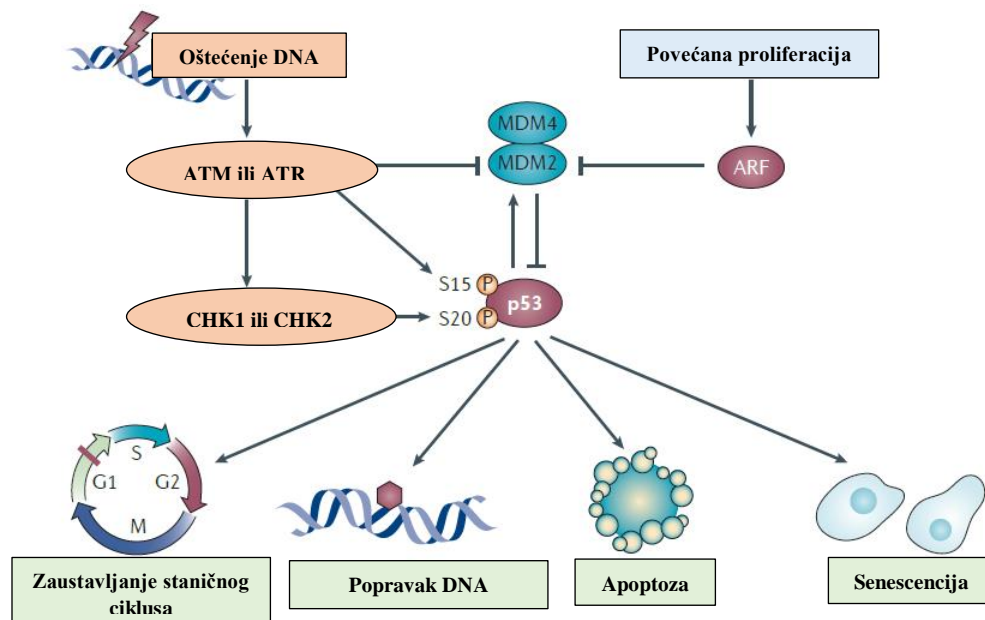
S ciljem otkrivanja „pogonskih“ mutacija provedena su sekvenciranja cijelog genoma velikog broja uzoraka osteosarkoma. Otkriven je velik broj „pokretačkih“ mutacija koje se mogu podijeliti u dvije skupine, primarne i sinergističke mutacije. Primarne „pokretačke“ mutacije, koje same mogu započeti proces karcinogeneze u kostima su: *TP53*, *NOTCH1*, *MYC*, *FOS*, *NF2*, *WIF1*, *BRCA2*, *APC*, *PTCH1* i *PRKARIA*. Drugu skupinu uključuju mutacije koje ne mogu same započeti proces karcinogeneze, ali uz primarne „pokretačke“ mutacije mogu ubrzati proces inicijacije i promocije, nazivaju se sinergističke mutacije, a uključuju: *RBI*, *TWIST*, *PTEN* i *JUN*.

Uz dosad već poznate mehanizme nastanka mutacija u osteosarkomu kao što su točkaste mutacije, insercije i delecije manjih dijelova DNA, euploidija i tako dalje otkriven je i mehanizam zvan

„kromotripsis“ (engl. *chromothripsis*) tijekom kojeg dolazi do velikog broja lomova DNA i kromosomskog preuređenja što je fundamentalno drukčije od uobičajenog postepenog prikupljanja mutacija. Većina stanica koje prođu kroz ovakav događaj ući će u apoptozu, no one koje prežive vrlo vjerojatno će poprimiti maligni fenotip. Kritično skraćivanje telomera ili lomovi kromosoma kao posljedica zračenja mogući su uzročnici ovog procesa. „Kromotripsis“ često je popraćen i lokalnim zonama hipermutacije više parova dušičnih baza (Rickel i sur. 2017).

1.3.1 Učestale mutacije

Tumor supresor geni skupina su gena koja kodira proteine čija uloga se može podijeliti u dvije skupine: provjera i popravak DNA te kontrola staničnog ciklusa i apoptoze. Gen *TP53* koji kodira p53 protein ima ključnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa i apoptoze, a mutiran je u 50% tumora i 22% osteosarkoma. Protein p53 je transkripcijski faktor koji se aktivira u odgovoru na stanični stres uzrokovan oštećenjima DNA, hipoksijom i aktivacijom onkogeni. Ovaj protein konstitutivno je inhibiran proteinom MDM2, a njegova aktivacija i djelovanje prikazani su na Slici 2.



Slika 2. Aktivacija p53 i njegovo djelovanje. Dvolančani lomovi DNA aktiviraju serin treonin kinazu (ATM), dok greške u replikacijskoj vilici aktiviraju serin treonin kinazu (ATR). Ovi enzimi fosforiliraju „checkpoint“ kinaze 1 i 2 (CHK1, CHK2). p53 je supstrat za ATM i ATR te za CHK1 i CHK2. Fosforilacijom se p53 odvaja od MDM2 i MDM4 koji su vezani za njegovu transkripcijsku regiju i time inhibiraju njegovo djelovanje. Također, fosforilacija omogućuje interakciju p53 s transkripcijskim kofaktorima što je bitno za aktivaciju gena koji su odgovorni za zaustavljanje staničnog ciklusa, popravak DNA, apoptozu i senescenciju. Signalizacija povećane proliferacije oslobađa transkripcijski faktor E2F, koji aktivira transkripciju tumor supresora ARF koji inhibira MDM2 što omogućava aktivnost p53 (preuzeto i prilagođeno iz Bieging i sur. 2014).

Mutacije u *TP53* genu dovode do gubitka kontrole staničnog ciklusa i gubitka mogućnosti ulaska u apoptozu što dovodi do nagomilavanja mutacija i povećanja genomske nestabilnosti (Bieging i sur. 2014, Compton 2020). Pretjerana ekspresija proteina MDM2 još je jedan od mehanizama kojima tumor prekida normalno djelovanje p53 signalnog puta. Isto tako, promjene u ekspresiji ili funkciji drugih molekula koje sudjeluju u ovom signalnom putu mogu utjecati na normalnu funkciju proteina p53 (Ragland i sur. 2002).

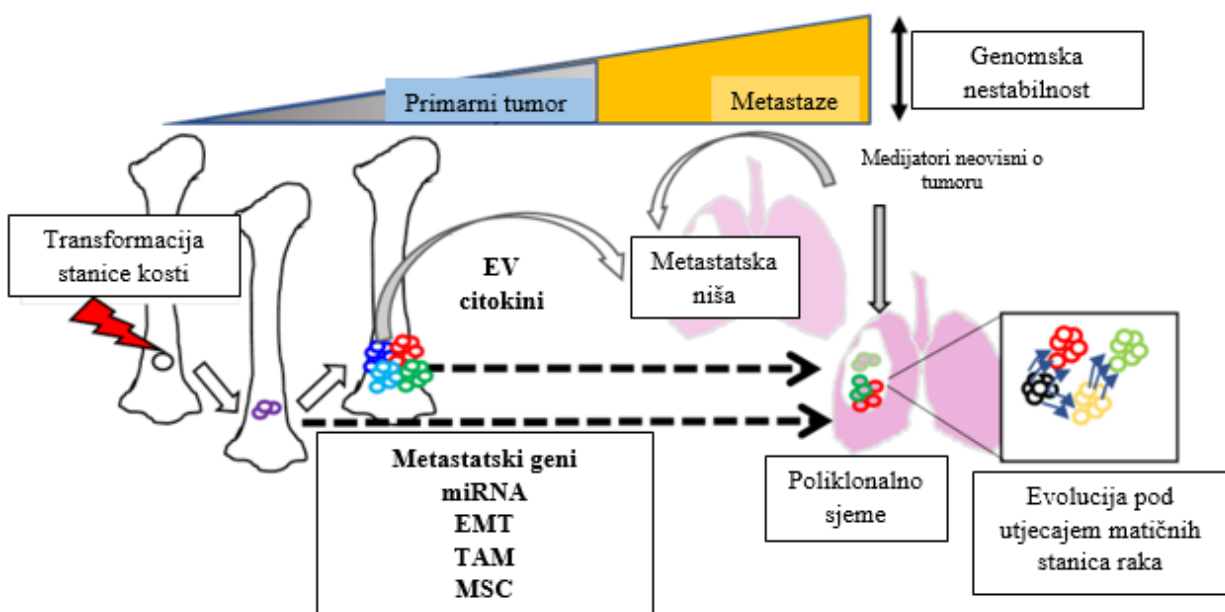
Uz gen *TP53* najčešće je mutiran tumor supresor gen *RBI*, čija mutacija sama ne može uzrokovati formiranje osteosarkoma, no uz druge „pogonske“ mutacije ubrzava proces karcinogeneze. Protein Rb inhibira transkripcijski faktor E2F, odgovoran za ekspresiju gena uključenih u replikaciju DNA i prelazak iz G₁ u S fazu staničnog ciklusa. Aberantni protein Rb ne može inhibirati E2F, što omogućava tumorskim stanicama konstantnu diobu. (Bieging i sur. 2014, Compton 2020).

Onkogeni su mutirana forma proto onkogeni, skupine gena odgovorne za stvaranje i prijenos signala koji potiču staničnu diobu. Kodiraju faktore rasta, njihove receptore, signalne molekule, transkripcijske faktore odgovorne za replikaciju DNA te cikline odgovorne za napredak stanice kroz stanični ciklus. Jedan od najčešće mutiranih onkogeni u osteosarkomu je gen *c-Myc*. Povišena ekspresija ovog gena, koja je često uzrokovana amplifikacijom, povezana je s povećanom proliferacijom i rezistencijom na kemoterapeutike (Czarnecka i sur. 2020).

Delecija ili mutacija tumor supresor gena kao što su *TP53* i *RBI* ili amplifikacija onkogeni kao što je *c-Myc* uzrokuju gubitak inhibicije kinaza ovisnih o ciklinu (CDK), zbog čega dolazi do gubitka kontrole nad staničnim ciklusom. Amplifikacija ili povećana ekspresija drugih gena staničnog ciklusa, kao što su ciklini D i E također utječe na izbjegavanje apoptoze i gubitak kontrole nad staničnim ciklusom što su bitne karakteristike koje omogućavaju osteosarkomu preživljavanje i širenje u ranim fazama progresije (Abarrtegi i sur. 2016).

Usporedbom metastatskih i nemetastatskih uzoraka osteosarkoma zapažena je znatno viša ekspresija onkogeni *c-Myc*, *c-Fos* i *c-Jun* kod metastatskih uzoraka, što upućuje na njihovu ulogu u invaziji i stvaranju metastaza. Još jedan bitan protein u nastanku osteosarkoma jest aktivatorski protein 1 (AP-1), transkripcijski faktor koji kontrolira staničnu diferencijaciju, proliferaciju i metabolizam kostiju, a građen je od proteina Fos i Jun kodiranih onkogenima *c-Fos* i *c-Jun*.

Genomskom analizom metastaza, u usporedbi s primarnim osteosarkomom, kod određenih uzoraka mogu se primijetiti jednake genske promjene, dok pak drugi uzorci pokazuju drastično različite genske promjene. Uzrok tome je različito vrijeme odvajanja od primarnog osteosarkoma; metastaze mogu nastati iz već zrelog tumora, no mogu se odvojiti i tijekom ranije faze razvoja tumora što rezultira paralelnom evolucijom metastaza i primarnog tumora, procesom prikazanim na Slici 3 (Odri i sur. 2022). Sposobnost tumorskih stanica da stvaraju metastaze ovisi o njihovoj mogućnosti napuštanja primarnog tumora. U netumorskim stanicama signalni put Hippo ima ulogu u kontroli proliferacije, diferencijacije i migracije stanica tijekom razvoja organa. Kod osteosarkoma, gubitak kontrole nad ovim signalnim putem vodi stanice prema EMT-u. Transkripcijski faktori YAP i TAZ glavni su efektori ovog signalnog puta, njihova ekspresija ovisi o integriranim nutritivnim i mehaničkim signalima poput dodira između stanica. YAP i TAZ djeluju na ključne transkripcijske faktore odgovorne za EMT, poput molekule SNAIL (engl. „*snail family transcriptional repressors*”). U obitelji transkripcijskih faktora SNAIL spadaju SNAIL1 i SNAIL2, čija povećana ekspresija u osteosarkomu smanjuje ekspresiju adhezijske molekule E-kadherin, a zamjena E-kadherina s N-kadherinom je glavna karakteristika EMT. Također, pretjerana ekspresija proteina



Slika 3 Shema formiranja plućnih metastaza iz osteosarkoma. Nakon transformacije stanice kosti nastaje tumor čija mogućnost stvaranja metastaza ovisi o različitim faktorima: metastatski geni, miRNA, EMT, makrofazi pridruženi tumoru, mezenhimske matične stanice (MSC). Tumorske stanice mogu ranije ili kasnije napustiti tumor što simboliziraju isprekidane strelice. Primarni tumor stvara faktore koji mogu inducirati stvaranje metastaza, prenose se izvanstaničnim vezikulima (EV) na moguće mjesto stvaranja metastaza. Tumorske matične stanice (CSC) mogući su inicijatori populacije metastatskih tumorskih stanica (preuzeto i prilagođeno iz Odri i sur. 2022).

SNAIL vodi do povećane ekspresije transkripcijskog faktora Runx2 što utječe na normalnu diferencijaciju osteoblasta (Yang i sur. 2013, Meng i sur. 2016).

Uz genske promjene bitno je istaknuti i epigenetske promjene koje mogu utjecati na formiranje metastaza kao što su prisustvo određenih dugih nekodirajućih molekula RNA i mikroRNA (miRNA) može poslužiti kao prognostički biljeg metastaziranja te kao takav je bitan u određivanju prognoze i terapije. Na formiranje metastaze utječu i interakcije tumora s mikrookolišom, to jest s proteinima izvanstaničnog matriksa kao što su kolagen, fibronektin i laminini. Aberantne promjene ovih proteina mogu utjecati na povećanu ekspresiju matriks metaloproteinaza odgovornih za razgradnju izvanstaničnog matriksa i promjene u signalnom putu integrina što može dovesti do povećane ekspresije proteina SNAIL (Guo i sur. 2014). Tumori utječu i na budući mikrookoliš metastaza kako bi ih učinili pogodnima za njihov razvoj na način da stvaraju izvanstanične vezikule (EV, engl. *extracellular vesicles*) unutar kojih tumori luče različite citokine, faktore rasta i miRNA (Odri i sur. 2022).

1.4 Dijagnoza i klasični slijed terapije

Jedan od najčešćih simptoma koji ukazuju na malignu bolest kostiju jest povremena bol te moguća prisutnost opipljive mase na zahvaćenom području. Kako bi se uklonila ili potvrdila sumnja postojanja maligne bolesti, pacijente se prvo podvrgava neinvazivnim metodama dijagnostike kao što su različite tehnike snimanja kosti ili uporaba određenih biokemijskih biljega (Lindsey i sur. 2017).

Tehnike snimanja zahvaćenog područja uključuju rendgenski snimak, računalnu tomografiju (CT), magnetsku rezonancu (MRI) te pozitronsku emisijsku tomografiju (PET). Rendgenski snimak, CT i MRI daju informacije o anatomskoj raširenosti tumora, a u kombinaciji s PET-om, koji se koristi za određivanje metaboličke aktivnosti, može se precizno odrediti regija tumora čija će finalna i najtočnija dijagnoza biti potvrđena biopsijom. Na opisani način također je moguće pratiti utjecaj terapije na tumor.

Biokemijski biljezi kao što su alkalna fosfataza (ALP) i laktat dehidrogenaza (LDH) mogu se koristiti u dijagnostici te prognoziranju i praćenju djelovanja terapije. Razine ALP u krvi povišene su u prisutnosti osteosarkoma zbog pojačane aktivnosti osteoblasta te koreliraju s volumenom tumora. LDH, koja ima ulogu u anaerobnom metabolizmu tumora koji se javlja tijekom rasta

tumora zbog nedostatne količine kisika, također korelira s volumenom tumora, no u manjoj mjeri, s obzirom da navedeni enzim nema jednako specifičnu ulogu u metabolizmu kao primjerice ALP (Kundu 2014).

Nakon što se neinvazivnim metoda pretpostavi dijagnoza potrebno ju je potvrditi biopsijom tumora te histološkom analizom sekcije tkiva čiji je cilj utvrditi prisutnost malignih stanica koje proizvode osteoidni matriks, svojstven svim podtipovima osteosarkoma. Nadalje, biopsija je nužna pri određivanju stadija i gradusa tumora kao i određivanju daljnje terapije. Kao što je prethodno spomenuto, od iznimne važnosti jest odrediti eventualnu prisutnost te lokaciju metastaza zbog njihovog utjecaja na prognozu i slijed terapije. Klasifikacija stadija tumora prema organizaciji „*American Joint Committee on Cancer*“ (AJCC), prikazana je u Tablici 1. Stadij predstavlja mjerilo veličine i raširenosti tumora, dok gradus označava stupanj diferenciranosti stanica, to jest sličnost tumorskih stanica s normalnim zdravim stanicama. Prema AJCC-u tumori koji spadaju u stadij I niskog su gradusa, što znači da su stanice dobro diferencirane, a nadalje se dijele na stadij I-A i I-B prema veličini, gdje I-A označava tumor veće veličine. Isto vrijedi i za tumore visokog gradusa koji se dijele u stadije II-A i II-B. Stadij III karakteriziraju takozvane „*skip*“ metastaze, nepovezane tumorske lezije stvorene u istoj kosti. Prisutnost udaljenih metastaza karakterizira stadije IV, zbog lošije prognoze liječenja pacijenata s ne-plućnim metastazama stadij je podijeljen na IV-A i IV-B. Ne-plućne metastaze su znak lošije prognoze bolesti jer često nastaju sekundarno iz plućnih metastaza (Lindsey i sur. 2017, Kundu 2014).

Tablica 1. Klasifikacija stadija osteosarkom prema AJCC-u (preuzeto i prilagođeno iz Kundu 2014).

Stadij	Gradus	Veličina	Metastaze
I-A	Nizak	< 8 cm	/
I-B	Nizak	> 8 cm	/
II-A	Visok	< 8 cm	/
II-B	Visok	> 8 cm	/
III	Visok/nizak	Bilo koja	„ <i>skip</i> “ metastaze
IV-A	Visok/nizak	Bilo koja	Plućne metastaze
IV-B	Visok/nizak	Bilo koja	Ne-plućne metastaze

Klasični slijed liječenja počinje neoadjuvantnom terapijom koja može uključivati kemoterapiju, ciljanu terapiju ili terapiju zračenjem. Kemoterapija najčešće uključuje doksorubicin i cisplatinu, uz eventualni dodatak metotreksata. Primjenjuje se prije glavnog tretmana, što je najčešće operacija, s ciljem smanjenja tumora i povećanja šanse za kompletno kirurško uklanjanje. Glavni mehanizam liječenja je resekcija osteosarkoma koja podrazumijeva kirurško uklanjanje primarnog tumora i svih zahvaćenih okolnih tkiva. Pri korištenju ove metode iznimno je bitno precizno odrediti margine resekcije kako bi se smanjila vjerojatnost povratka tumora (Abarrategi i sur. 2016). Kod približno 70% pacijenata bez dijagnosticiranih metastaza ovakav slijed liječenja rezultira dugoročnom remisijom bolesti, no za pacijente s prisutnim metastazama još ne postoji terapija koja garantira dugoročno izlječenje (Mutsaers i Walkley 2014). Komparativne analize primarnih osteosarkoma i njihovih plućnih metastaza pokazala su povećanu količinu mutacija i veću nestabilnost genoma metastaza, zbog čega je potrebno i prilagoditi terapiju pri njihovom liječenju (de Azevedo i sur. 2020).

1.4.1 Djelovanje kemoterapeutika

Principi djelovanja kemoterapeutika na stanice raka su različiti, a u ovom poglavlju opisat ću njihovo djelovanje na primjerima doksorubicina, cisplatine i metotreksata. Kao što je prethodno navedeno, doksorubicin (engl. *doxorubicin*, DOX) jedan je od najčešće korištenih kemoterapeutika u liječenju osteosarkoma. DOX djeluje citotoksično u različitim dijelovima stanice, no većinom u jezgri (Keizer i sur. 1990). Njegovo djelovanje započinje u citoplazmi kada se DOX veže na 26s proteosom te kroz jezgrine pore ulazi u jezgru stanice. U jezgri se interkalira u lanac DNA stvarajući vodikove veze s bazama DNA, što stvara torzijski stres i dovodi do destabilizacije nukleosoma. Također, interkalacija može ujetecati na aktivnost enzima topoizomeraze II (engl. *topoisomerases II*, TOP2), sprječavajući spajanje krajeva lanaca DNA nakon stvaranja lomova, zbog čega dolazi do inhibicije staničnog ciklusa i indukcije apoptoze. Jačina djelovanja DOX-a na tumorsku stanicu ovisi o fazi staničnog ciklusa u kojoj se nalazi, a one stanice koje se nalaze u S i M fazi staničnog ciklusa su najosjetljivije. U citoplazmi DOX uzrokuje stvaranje reaktivnih kisikovih radikala (engl. *reactive oxygen species*, ROS) što povećava oksidativni stres u stanici i uzrokuje oštećenja stanične membrane i DNA, procesi koji mogu uzrokovati ulazak tumorske stanice u apoptozu. Također, DOX može stimulirati određene stanice imunološkog sustava kao što

su dendritičke stanice kako bi olakšao prepoznavanje i uništavanje tumorskih stanica (Sritharan i Sivalingam 2021).

Uz DOX, najčešće korišteni terapeutici su cisplatina (engl. *cisplatin*, CIS) i metotreksat (engl. *methotrexate*, MET). CIS inducira ulazak stanice u apoptozu vezanjem za DNA čime nastaju unutarlančani adukti DNA koji inhibiraju sintezu DNA i rast stanice. Adukti DNA aktiviraju kinazu ATM koja fosforilira tumor supresorski protein p53 čime dolazi do aktivacije niza gena kao što su *Bax*, odgovoran za ulazak stanice u apoptozu, te *p21*, koji vodi do zaustavljanja staničnog ciklusa. Oprečno tome, p53 aktivira i transkripciju gena odgovornih za uklanjanje DNA oštećenja kao što je gen induciran oštećenjem DNA (engl. *DNA damage inducible gene 45*, GADD45) koji također sudjeluje u zaustavljanju staničnog ciklusa (Brown i sur. 2019, Fanelli i sur. 2020).

Nadalje, MET inhibira staničnu diobu tumorskih stanica tako što inhibira djelovanje različitih enzima odgovornih za sintezu purinskih dušičnih baza koje su neophodne za pravilnu DNA sintezu. Specifično, primarna funkcija MET-a inhibicija je enzima dihidrofolat reduktaze (engl. dihydrofolate reductase, DHFR) koji od dihidrofolata stvara tetrahidrofolat, spoj nužan u sintezi purina *de novo*. Unutar stanice MET prelazi u metotreksat poliglutammat koji ima još veći inhibicijski učinak na DHFR, kao i ostale enzime uključene u sintezu purina (Mikkelsen i sur. 2011).

Efikasnost kemoterapije, a time i ishod liječenja, ovisi o otpornosti tumorskih stanica na određeni kemoterapeutik. Tumorske stanice koriste se nizom mehanizama u izbjegavanju citotoksičnog djelovanja kemoterapeutika, primjerice smanjenom ekspresijom određenih transmembranskih transportera kao što je reducirani folatni nosač (engl. *reduced folate carrier*, RFC) u slučaju MET-a ili povećanim izbacivanjem kemoterapeutika iz stanice čime se smanjuje unutarstanična akumulacija kemoterapeutika, a samim time i njihovo djelovanje (Guo i sur. 1999, Garcia - Ortega i sur. 2022). Promjena ili povećana ekspresija ciljnih molekula određenog kemoterapeutika također utišava njegovo djelovanje. Primjer toga smanjeno je djelovanje DOX-a na uzorke osteosarkoma sa smanjenom ekspresijom TOP2B, jedne od dvije izoforme TOP2. S druge strane, amplifikacija ili delecija druge izoforme, to jest TOP2A, također je povezana s rezistencijom na DOX. S obzirom da mehanizam djelovanja mnogih kemoterapeutika leži u oštećivanju tumorske DNA, povećanje efikasnosti popravka DNA također sprječava citotoksično djelovanje kemoterapeutika. U

osteosarkomu najčešće je zabilježen popravak izrezivanjem nukleotida (engl. *nucleotide excision repair*, NER) povezan s rezistencijom na CIS.

Cilj oštećenja DNA u kontekstu terapije jest inducirati apoptozu tumorskih stanica; zbog toga tumorske stanice s aberantnim mehanizmom apoptoze izbjegavaju utjecaj kemoterapeutika. Nadalje, tumorske stanice imaju mogućnost recikliranja oštećenih proteina i staničnih organela kroz proces autofagije. Matične stanice raka (engl. *cancer stem cells*, CSC), o kojima ću više pričati u sljedećem poglavlju, također koriste navedene mehanizme zbog čega su upravo one jedan od glavnih uzročnika rezistencije osteosarkoma na kemoterapeutike (Garcia - Ortega i sur. 2022, Fanelli i sur. 2020).

1.5 Matične stanice raka

Matične stanice raka naziv su za populaciju tumorskih stanica koje imaju sposobnost samoobnove i diferencijacije u sve ostale tumorske stanice. Uloga CSC u osteosarkomu, kao i u ostalim tumorima, predmet je stalnih istraživanja, koja uz mnoga različita otkrića, kao najznačajnije karakteristike izdvajaju sposobnost samoobnove, što utječe na inicijaciju, kao i progresiju tumorske mase kroz određen vremenski period (Schiafone i sur. 2019). Ove stanice imaju sposobnost diferencijacije u cijeli spektar stanica unutar tumora te tako nastaju izrazito heterogene populacije tumorskih stanica. Također, CSC se smatraju glavnim uzrokom metastaziranja te povrata bolesti, a imaju značajan utjecaj i u stvaranju rezistencije tumora na kemoterapeutike. Zbog navedenih karakteristika ove stanice negativno utječu na uspješnost terapije te bi za postizanje dugotrajne remisije i sprječavanje povratka bolesti specifično terapijsko ciljanje upravo ovih stanica moglo biti značajno (Abarrategi i sur. 2016; Czarnecka i sur 2020).

Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se razjasnili specifični mehanizmi djelovanja i uloga CSC u progresiji tumora. Izolacija CSC osteosarkoma prvotno je postignuta zahvaljujući njihovoj sposobnosti formiranja sferoida, karakteristike koja je također povezana sa sposobnošću samoobnavljanja u suspenzijskim kulturama s manjkom seruma (Wang i sur. 2009). Također, moguće ih je izdvojiti iz skupine stanica na osnovi različitih karakteristika matičnosti, primjerice ciljanjem staničnih biljega kao što su Oct3/4 i Nanog s obzirom na povećanu ekspresiju te izdvajanjem na temelju povećane aktivnosti telomeraze (Abarrategi i sur. 2016). U svom istraživanju Wang i sur. dokazali su mogućnost formiranja sferoida u dvije tumorigene i dvije

netumorigene stanične linije osteosarkoma što upućuje na to da sposobnost formiranja sferoida nije u korelaciji s tumorigenosti te da unutar osteosarkoma mogu postojati i normalne, funkcionalne mezenhimske matične stanice (engl. *mesenchymal stem cells*, MSCs). CSC mogu regrutirati MSC i imunosne stanice lučenjem određenih faktora kao što su IL-1 i TGF- β unutar EV zbog kojih te stanice počinju djelovati pozitivno na rast i stvaranje metastaza (Wang i sur. 2009, Schiavone i sur. 2019).

Inhibicija signalnih puteva apoptoze, povećana sposobnost popravka DNA te povišena aktivnost lizosoma karakteristike su CSC koje doprinose povećanju rezistencije na kemoterapeutike. Nadalje, pretjerana ekspresija ABC transportera omogućuje ovim stanicama aktivno izbacivanje kemoterapeutika, zbog toga se inhibicijom ovih transportera može senzibilizirati tumor na tretman doksorubicinom (Abarrategi i sur. 2016, Czarnecka i sur. 2020).

CSC osteosarkoma mogu nastati iz MSC ili njihovih progenitorskih stanica zbog mutacija gena regulatora staničnog ciklusa kao što su p53 i RB ili pod utjecajem signala iz mikrookoliša kosti. Tijekom evolucije tumora nastaju različite subpopulacije CSC zbog daljnjeg nakupljanja genskih i epigenetskih promjena u tumorskim stanicama (Abarrategi i sur. 2016).

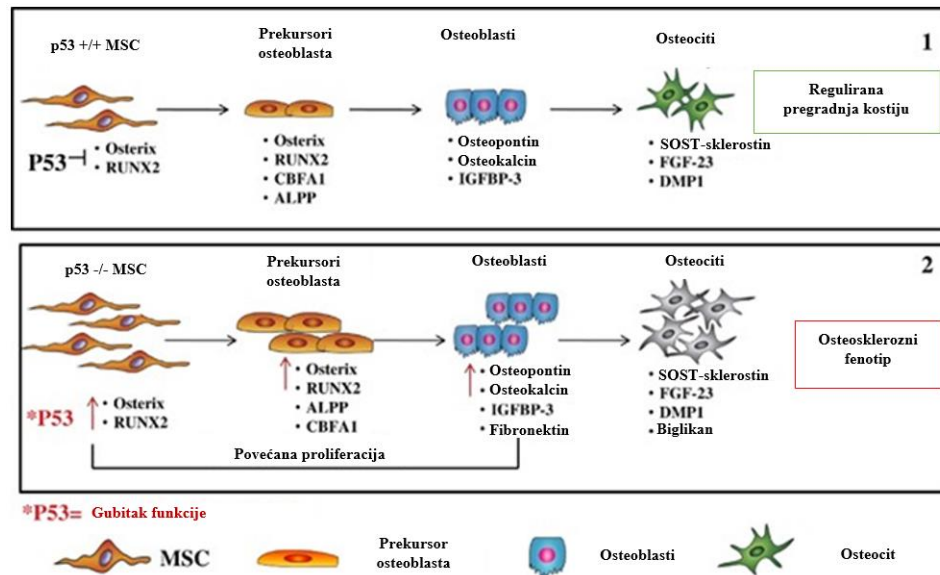
1.5.1 Porijeklo matičnih stanica raka

Glavne karakteristike matičnih stanica su sposobnost samoobnavljanja i mogućnost diferencijacije u stanice različitih tkiva (Roguljić 2016). Diferencijacija se odvija preko progenitorskih stanica s ograničenom mogućnosti proliferacije i diferencijacijom usmjerenom prema određenoj vrsti stanica. Proces diferencijacije pod kontrolom je vanjskih signala, kao što su kontakt s ostalim stanicama ili različiti topivi faktori, te unutarnjih signala koji su pod kontrolom različitih gena (Zakrzewski i sur. 2019). Kontinuirana ravnoteža matičnih stanica održava se asimetričnim diobama kojima nastaje jedna stanica kćerka koja zadržava sve karakteristike matičnosti dok druga biva predodređenom za diferencijaciju u određenu staničnu lozu (Han i sur. 2013; Watt i Hogan 2000).

U mnogim tkivima, pa tako i u koštanoj srži, nalaze se multipotentne MSC koje imaju sposobnost samoobnove, proliferacije te diferencijacije u stanice koje izgrađuju kosti, mišiće, tetive i masno tkivo (de Azevedo i sur. 2020). Glavna uloga MSC je rast, obnavljanje i održavanje homeostaze organizma. Kako bi kroz cijeli život organizma mogle obavljati tu funkciju moraju ostati

nediferencirane te zadržati mogućnost proliferacije, karakteristike zbog kojih takve stanice nazivamo besmrtnima (Zakrzewski i sur. 2019). Održavanje svojstva matičnosti postižu inhibicijom diferencijacije, apoptoze i stanične senescencije što su osobine koje dijele s maligno transformiranim stanicama. Nadalje, MSC djeluju na mikrookoliš u kojem se nalaze izlučivanjem različitih imunomodulatornih i protuupalnih faktora. Ove osobine MSC, iako nužne za njihovu normalnu funkciju, također su komplementarne osobinama tumorskih stanica, što ih čini bitnima u procesu inicijacije i progresije tumora (de Azevedo i sur. 2020).

Osim matičnih stanica, moguće je i da osteoblasti ili njihovi prekursori čine ishodišne stanice, a da su karakteristike CSC nastale uz mnogobrojne druge mutacije tijekom progresije tumora. U svom istraživanju Mutsaers i Walkley (2014.) predlažu da stupanj diferencijacije stanice osteoplastne stanične linije tijekom maligne transformacije određuje podtip osteosarkoma.



Slika 4 Mehanizam djelovanja funkcionalnog (1) i nefunkcionalnog (2) P53 na diferencijaciju mezenhimskih matičnih stanica. Gubitkom normalne funkcije p53 dolazi do promjene ekspresije niza transkripcijskih faktora, prvenstveno Osterix i RUNX2 što rezultira povećanom proliferacijom (preuzeto i prilagođeno iz Velletri i sur. 2016).

Tijekom osteogeneze MSC moraju diferencirati u osteoblaste. Diferencijacija MSC i progenitorskih stanica regulirana je različitim endokrinim, parakrinim i autokrinim faktorima kao što su peptid strukturno sličan paratiroidnom hormonu (PTHrP, engl. parathyroid hormone-related protein), faktor rasta fibroblasta (FGF, engl. fibroblast growth factor) te koštani morfogenetski proteini (BMP, engl. bone morphogenetic proteins) (Alfranca i sur. 2015). Nepravilnosti u ovom procesu ili izloženost novim, stranim signalima dovodi do neravnoteže u diferencijaciji i

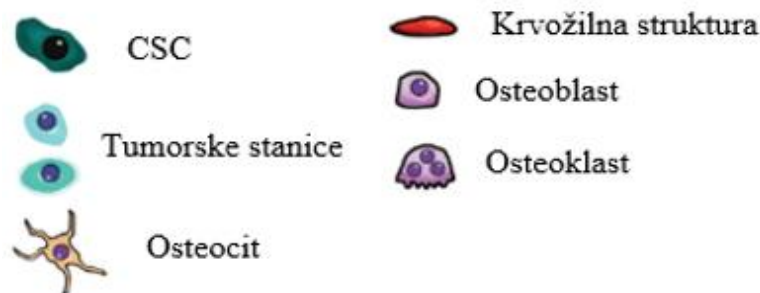
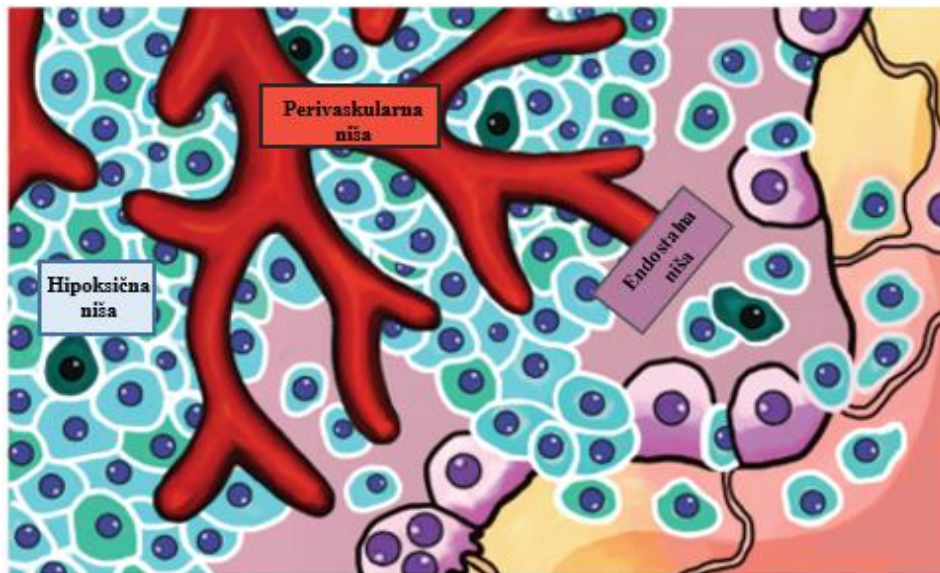
proliferaciji što može rezultirati malignim fenotipom ovih stanica (de Azevedo i sur. 2020). Jednu od ključnih uloga u diferencijaciji osteoblasta imaju proteini BMP. Oni spadaju u obitelj proteina transformirajućih faktora rasta (engl. *transforming growth factor*, TGF- β) te u ljudi postoji barem 15 multifunkcionalnih varijanti. Proteini BMP-2, BMP-6 i BMP-9 imaju najveći osteogeni potencijal u zdravom koštanom tkivu, no njihov učinak na osteosarkom je suprotan. Osteosarkomi izloženi ovim proteinima izbjegavaju diferencijaciju i ostaju u ranoj proliferativnoj fazi što pokazuje da postoji mehanizam kojim blokiraju njihov poticaj prema diferencijaciji. Tumori koji eksprimiraju ove proteine imaju lošiju kliničku prognozu, pokazuju agresivan rast kao i veću mogućnost metastaziranja. Blokiranje osteoblastne diferencijacije pokazalo se bitnom značajkom osteosarkoma te naglašava važnost interakcija osteosarkoma s koštanim mikrokolišem (Haydon i sur. 2007).

Pokazalo se da p53, osim uloge u regulaciji genomske stabilnosti, regulira i diferencijaciju MSC i progenitorskih stanica u osteoblaste i osteocite, kako bi osigurao uravnoteženo oblikovanje i pregradnju kosti (de Azevedo i sur. 2020). Funkcionalan p53 smanjuje ekspresiju transkripcijskih faktora koji potiču diferencijaciju kao što su Osterix i RUNX-2 te tako utišava osteoblastogenezu u fiziološkim uvjetima. Unatoč tome, RUNX-2 može djelovati inhibirajuće na proapoptotsku ulogu P53 inducirajući transkripciju onkogeno c-Myc. Stoga, aberantan protein p53 u MSC rezultira povećanjem ekspresije transkripcijskih faktora Osterix i RUNX-2 što dovodi do grešaka u pregradnji kostiju rezultirajući osteosklerozom. To je poremećaj karakteriziran povećanjem formacije koštanog tkiva u usporedbi s resorpcijom. Na Slici 4. vidljivo je kako gubitak funkcije P53 rezultira disbalansom ekspresije različitih faktora diferencijacije što dovodi do povećane proliferacije. Takav fenotip često je asociran s razvojem osteosarkoma (Velletri i sur. 2016).

1.6 Interakcija matičnih stanica s mikrokolišem kosti

Koštano tkivo složeno je vezivno tkivo koje se sastoji od mnogo različitih tipova stanica kao što su osteoblasti, osteoklasti, MSC, progenitorske stanice, hematopoetske te endotelne stanice. Očuvanje homeostaze kosti kroz procese formiranja i resorpcije kosti regulirano je brojnim topivim faktorima i komponentama izvanstaničnog matriksa. Ravnoteža između resorpcije i formiranja kosti ovisi o razini diferencijacije, proliferacije i apoptoze koštanih stanica, prvenstveno MSC, osteoblasta i osteoklasta (Alfranca i sur. 2015).

Mikrookoliš kosti bitna je stavka u promatranju problematike prevalencije osteosarkoma. Naime, prevalencija ove bolesti bimodalno je distribuirana s obzirom na starost pacijenata. Prvo povećanje prevalencije prisutno je kod adolescenata, dok je drugo povećanje vidljivo kod osoba starijih od 65 godina. Budući da tumori nastaju zbog nekontrolirane proliferacije stanica povećani broj slučajeva u adolescentnoj dobi upućuje na usku povezanost osteosarkoma s intenzivnim rastom kostiju koji počinje pubertetom, što potvrđuje i ranija pojavnost bolesti kod djevojčica u usporedbi s dječacima (Ottaviani i Jaffe 2009). Povećanje prevalencije u starijoj dobi povezano je s oštećenjima stanica izazvanih prethodnim zračenjem te Pagetovom bolesti (Xu 2009). Pagetova bolest karakterizirana je prekomjernim i nepravilnim preoblikovanjem jedne ili više kostiju. Povećana proliferacija koštanih stanica i u ovom slučaju može biti faktor koji utječe na stvaranje osteosarkoma (Ralston 2013).

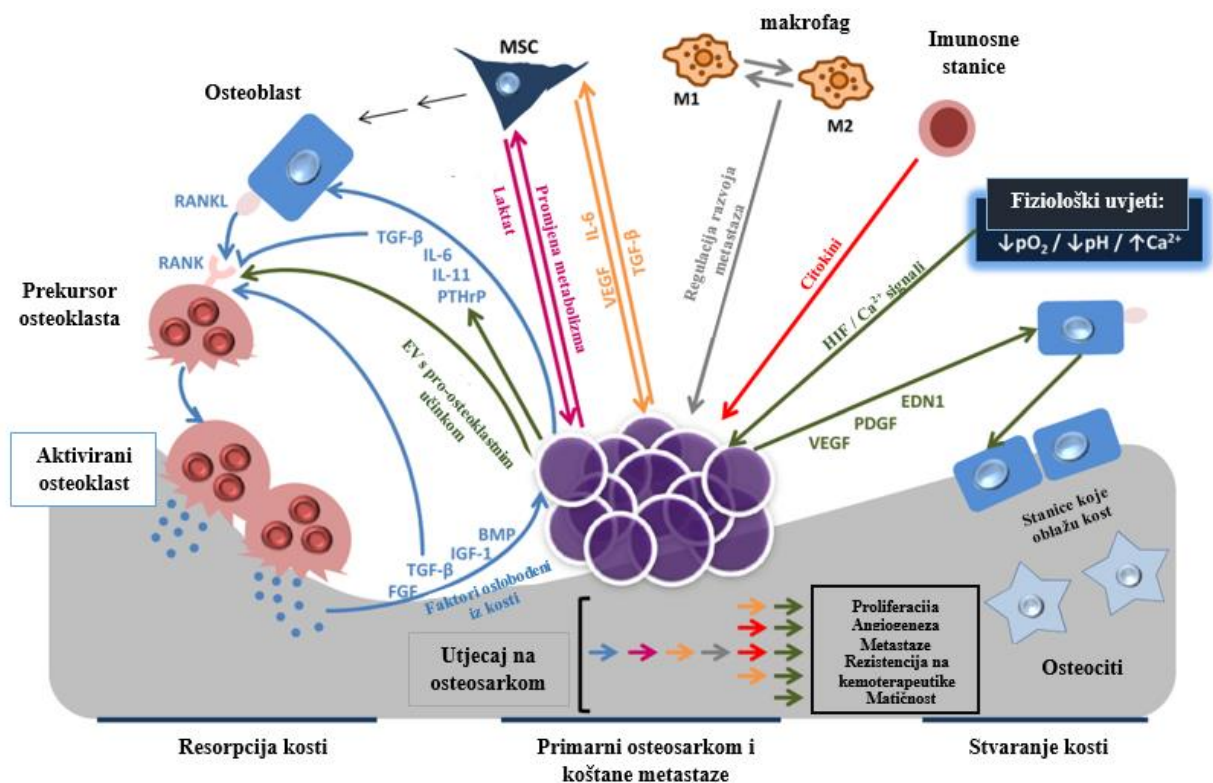


Slika 5. Moguće zone porijekla CSC (preuzeto i prilagođeno iz Abarrategi i sur. 2016).

Utjecaj topivih faktora te interakcija između stanica koje čine mikrookoliš koštanih stanica tema su sve većeg broja istraživanja zbog svojeg utjecaja na razvoj osteosarkoma i regulaciju ponašanja MSC. Transformirane MSC (p53^{-/-}, RB^{-/-}) induciraju formiranje osteosarkoma pri unutarčkoštanoj ili periostealnoj transplataciji, dok pri subkutanoj inokulaciji takvih stanica dolazi do razvoja leiomiosarkoma što upućuje na izrazitu ulogu koštanog mikrookoliša u formiranju osteosarkoma (Rubio i sur. 2014).

Mikrookoliš kosti sadržava tri niše u kojima su transformacijski signali posebno aktivni i kao takve moguće je da sadržavaju CSC (Slika 5), a te niše su perivaskularna, hipoksična i endostalna niša (Abarrategi i sur. 2016). Perivaskularna niša pruža okoliš bogat topivim faktorima koji u fiziološkim uvjetima održavaju matičnost MSC, no promjene u njihovoj regulaciji mogu inducirati nastanak CSC, a dobra prokrvljenost olakšava mogućnost migracije i metastaziranja (Kuhn i Tuan 2010).

Svi tumori čiji volumen premaši 1 mm³ moraju se prilagoditi na hipoksične uvjete zbog nemogućnosti difuzije kisika i hranjivih tvari kroz tumorsko tkivo. Ključnu ulogu u ovom procesu imaju hipoksijom inducirani faktori (HIF) građeni od alfa i beta podjedinice. U normalnim uvjetima, uz dostupnost kisika, dolazi do vezivanja hidroksilnih skupina za HIF-1 α i njegove ubikvitinizacije te posljedične razgradnje. U uvjetima manjka kisika tijekom hipoksije HIF-1 α se ne razgrađuje te ostaje aktivan i zajedno s HIF-1 β ima ulogu transkripcijskog faktora koji je zaslužan za aktivaciju niza gena odgovornih za prilagodbu na hipoksične uvjete, angiogenezu, regulaciju pH i preživljavanje stanica (Zeng i sur. 2011). Hipoksija tako promovira proliferaciju



Slika 6. Shema interakcije između koštanog mikrookoliša i osteosarkoma. Tumorske stanice u kosti započinju „začarani krug“ izlučivanjem faktora (PTHrP, TGF- β , IL-11) koji stimuliraju aktivaciju osteoklasta preko interakcije molekula RANK i RANKL na osteoblastima. Aktivacija osteoklasta rezultira povećanom razgradnjom kosti i oslobađanjem faktora rasta iz kosti (BMP, TGF- β , IGF1, FGF) koji promoviraju proliferaciju tumorskih stanica. Također, tumorske stanice mogu utjecati na ostale stanice koštanog mikrookoliša. Tumorske stanice mogu utjecati na promjenu metabolizma MSC zbog čega one počnu stvarati laktat te utjecajem TGF- β na MSC one počnu stvarati faktore koji utječu na angiogenezu (VEGF) i proliferaciju (IL-6) tumorskih stanica. Nadalje, imunostimulativni makrofagi (M1) i makrofagi pridruženi tumoru (M2) uz ostale imunosne stanice djeluju na osteosarkom pomoću različitih citokina. Fiziološki uvjeti kao što su hipoksija (HIF) i snižena pH vrijednost promoviraju angiogenezu, matičnost, stvaranje metastaza i faktora koji aktiviraju osteoblaste. Također, povišena količina kalcija doprinosi „začaranom krugu“ induciranjem stvaranja PTHrP ili EV koji sadrže faktore za aktivaciju osteoklasta. Boja strelica označava utjecaj interakcija između tumora i mikrookoliša na karakteristike osteosarkoma (preuzeto i prilagođeno iz Alfranca i sur. 2015).

stanica i povećava ekspresiju faktora matičnosti kao što su Oct3/4 i Nanog, zbog čega postoji velika mogućnost nastanka CSC unutar ove niše (Yoshida i sur. 2009).

Endostalna niša bogata je kalcijem i faktorima rasta koji se nekontrolirano oslobađaju pri utjecaju tumorskih stanica na pregradnju kostiju (Abarrategi i sur. 2016). Tijekom pregradnje kostiju aktivacija osteoklasta pod kontrolom je liganda za receptor aktivatora nuklearnog faktora kappa B (RANKL) na osteoblastima i njegovog receptora (RANK) na osteoklastima, prikazano na Slici 6. U tom procesu važnu ulogu ima osteoprotegerin, topivi glikoprotein koji inhibira resorpciju vezujući se na RANKL te tako sprječava interakciju između RANKL i RANK (Boyce i Xing 2008). CSC osteosarkoma mogu narušiti ovu ravnotežu lučenjem faktora kao što su interleukin (IL) 11 i peptid povezan s paratiroidnim hormonom (PTHrP) koji stimuliraju ekspresiju RANKL na osteoblastima. Tumorske stanice, ali i sama razgradnja kostiju, oslobađaju faktore koji induciraju ekspresiju RANK na osteoklastima kao primjerice IL1, IL6, TGF β te faktor nekroze tumora alfa (TNF α). Ovakvi uvjeti dovode do povećane aktivacije i diferencijacije osteoklasta što rezultira nekontroliranom razgradnjom kostiju i oslobađanjem različitih faktora rasta koštanog matriksa kao što su, TGF β , FGF ili BMP. Novooslobođeni faktori ponovno potiču razgradnju kosti te promiču proliferaciju tumorskih stanica čime se stvara „začarani krug“ interakcije tumorskih stanica i koštanog mikrokoliša. Ovaj fenomen prvotno je otkriven u koštanim metastazama, ali kasnije je dokazan i u primarnim tumorima (Alfranca i sur 2015).

Utjecaj osteoklasta na osteosarkom ovisi i o fazi razvoja tumora. Prilikom inicijacije i rane faze rasta velika količina faktora rasta dostupnih zbog osteoklastne razgradnje kosti promovira rast i razvoj tumora, ali također odgađa metastaziranje. U kasnijim fazama razvoja tumora, zbog nakupljanja različitih genetskih promjena nastaje populacija stanica s većim metastatskim potencijalom i sposobnošću inhibicije osteoklastogeneze (Endo-Munoz i sur. 2012).

1.7 Mehanizmi besmrtnosti

Telomere se sastoje od ponavljajućih sljedova nukleotida TTAGGG i proteinskog kompleksa na krajevima kromosoma. Imaju ključnu ulogu u održavanju kromosomske stabilnosti (Mirabello i sur. 2011). Zbog asimetrične replikacije DNA lanaca, svakom diobom gubi se dio sekvence DNA s krajeva kromosoma, a upravo telomere sprječavaju gubitak funkcionalnih gena. Prosječna duljina telomera u ljudi približno je 10 kb, no svakom diobom gubi se od 50 do 200 parova baza, zbog

nemogućnosti DNA polimeraze da u potpunosti replicira 3' kraj zaostalog DNA lanca. Upravo to ograničava broj dioba koje su somatske stanice u mogućnosti proći prije ulaska u senescenciju,. Kao odgovor na kritično skraćivanje telomera tumor supresor geni *p53* i *RB* zaustavljaju rast stanice (Robinson i Schiemann 2022, Sotillo - Piñeiro i sur. 2004). Također, telomere zajedno s proteinskim kompleksom šelterinom građenim od šest podjedinica sprječavaju razgradnju i spajanje nezaštićenih krajeva kromosoma (Mirabello i sur. 2011 i Robinson i Schiemann 2022).

Aktivno produljivanje telomera odvija se tijekom embrionalnog razvoja te postnatalno u spolnim stanicama i populacijama matičnih stanica. U većini somatskih stanica proces obnavljanja telomera nije aktivan, zbog čega je pri razvoju tumorskih stanica ponovna aktivacija tog procesa neophodna. Postoje dva mehanizma produljivanja telomera: pomoću proteina telomeraze i alternativno produljivanje telomera (engl. *alternative lengthening of telomeres*, ALT) (Robinson i Schiemann 2022).

1.7.1 Telomeraza

Telomeraza je holoenzim sastavljen od proteinske komponente, reverzne transkriptaze (TERT) te RNA dijela (TER) koji služi kao kalup za sintezu DNA ovisnu o RNA. Sinteza jednog ponavljanja telomere uključuje repetitivno dodavanje sekvence TTAGGG, a tijekom jednog vezanja enzima za DNA može se sintetizirati više telomernih ponavljanja (Ghanim i sur. 2021).

S obzirom da je aktivnost telomeraze povezana s nastankom tumora, TERT koji je nužan za njenu aktivnost nalazi se pod strogom transkripcijskom i posttranskripcijskom kontrolom. Specifični ligandi koji pokreću mnoštvo unutarstaničnih signalnih puteva uključuju različite faktore rasta i citokine, čije vezivanje za određeni receptor povećava ili smanjuje ekspresiju transkripcijskih faktora te pomoćnih proteina, kao što su enzimi koji modificiraju histone koji utječu na dostupnost TERT promotorske regije, međutim, uglavnom svi ti signali kod somatskih stanica ne mogu ponovno aktivirati telomerni promotor jer je reprimiran. Na povećanu ekspresiju TERT-a utječu onkogeni, od kojih su najbolje okarakterizirani c-Myc te NF-κB, dok tumor supresor geni imaju inhibicijski učinak na ekspresiju TERT-a (Robinson i Schiemann 2022).

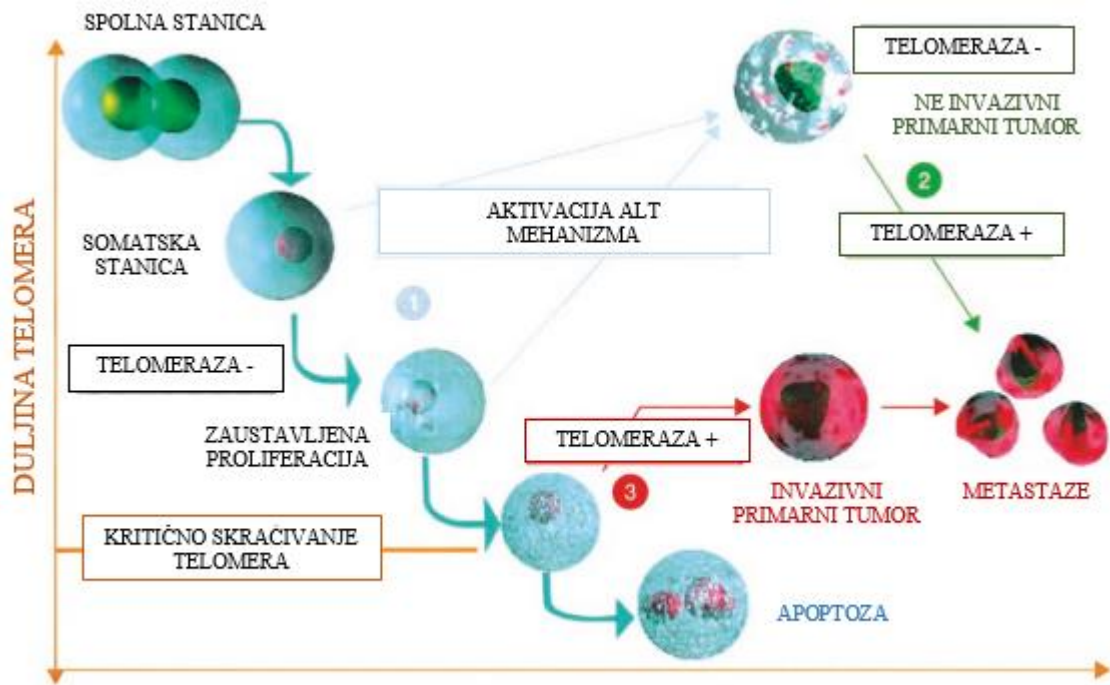
1.7.2 Alternativni mehanizam produljenja telomera

Kod tumora s inaktivnom telomerazom duljina telomera održava se mehanizmom ALT. ALT se češće pojavljuje kod tumora i staničnih linija mezenhinskog porijekla pa je tako zamijećen s povećanom učestalošću i u osteosarkomu (Reddel 2002). Način djelovanja mehanizma ALT nije u potpunosti razjašnjen, no poznato je da funkcionira tako što se za produljenje jedne telomere kao kalup koriste telomere drugih kromosoma ili vankromosomske telomerne sekvence. Proces je sličan mehanizmu homologne rekombinacije. Karakteristika mehanizma ALT koja podržava ovaj način funkcioniranja je iznadprosječna duljina telomera te izrazita heterogenost u duljini koja varira između kromosoma. Specifično za mehanizam ALT je prisustvo „tijela PML“ u jezgri, koja sadrže protein promijelocitne leukemije (engl. *the promyelocytic leukemia protein*, PML), telomerne sekvence DNA te niz faktora za koje se pretpostavlja da sudjeluju u procesu popravka. Zbog svoje specifičnosti ove strukture se koriste u određivanju prisutnosti mehanizma ALT (Mason-Osann i sur. 2018).

1.7.3 Utjecaj telomera i telomeraze na razvoj osteosarkoma

Zbog skraćivanja telomera dolazi do aktivacije popravka DNA i fuzije kromosoma. Kad takvi kromosomi uđu u mitozu, tijekom anafaze dolazi do nastanka kromatinskih mostova između tih kromosoma. Pucanjem tih mostova dolazi do nastanka kromosomskih aberacija i translokacija. Kromosomska nestabilnost česta je kod stanica osteosarkoma i utječe na nastanak tumora (Savage i sur. 2004, Ju i Rudolph 2006). S druge strane, tijekom progresije tumora, već kratke telomere nastavljaju se skraćivati zbog čega je stabilizacija telomera nužna za održavanje proliferacijske sposobnosti tumorskih stanica i nastavak progresije (Kyo i Inoue 2002, Ju i Rudolph 2006).

Kritično skraćivanje telomera rezultira genomskom nestabilnosti koja potiče inicijaciju tumora. (Kyo i Inoue 2002). U inicijalnim koracima karcinogeneze moguće je održavanje duljine telomera tumorskih stanica mehanizmom ALT, no takvi tumori nisu invazivni, malignost se u ovim tumorima može razviti nakon nakupljanja dodatnih mutacija u regulatornim genima. Isto tako, moguća je ranija aktivacija telomeraze kao rezultat kritičnog skraćivanja telomera, vidljivo na Slici 7. Razlika u postotku primarnih tumora u usporedbi s metastatskim lezijama s aktivnom telomerazom upućuje na to da je njena aktivacija neophodna za metastatsku sposobnost (Sotillo-Piñero i sur. 2004).



Slika 7. Mogući putevi progresije osteosarkoma. (1) Aktivacija ALT mehanizma rezultira nastankom ne invazivnog primarnog tumora. (2) Aktivacijom telomeraze tumor dobiva sposobnost metastaziranja (3) Aktivacija telomeraze rezultira nastankom malignog tumora. (preuzeto i prilagođeno iz Sotillo- Piñeiro i sur. 2004.)

Telomeraza također može djelovati kao transkripcijski faktor te tako djeluje na različite mehanizme u tumoru. Na primjer, TERT stvara kompleks s proteinom koji remodelira kromatin SMARCA4 te tako inducira ekspresiju gena signalnog puta Wnt, kao što su c-Myc i vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF). Nadalje, TERT ima ključnu ulogu u kontroli transkripcije mitohondrijske DNA (mtDNA) te tako utječe na promjene metabolizma tumora, od kojih je najčešća glikoliza i sekrecija laktata u prisustvu kisika, nazvana „Warbugov efekt“ (Robinson i Schiemann 2022, Faubert i sur. 2020). Također, TERT ima dvojnu ulogu u zaštiti mtDNA od reaktivnih kisikovih radikala (ROS). Prvotno vezujući se za mtDNA štiti je od oštećenja te smanjuje količinu ROS-a povećanjem ekspresije superoksid dismutaze, enzima koji katalizira razgradnju ROS-a na O_2 i H_2O_2 (Martens i sur. 2020, Robinson i Schiemann 2022).

2 Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je pratiti progresiju osteosarkoma praćenjem subpopulacije tumorskih matičnih stanica. Hipoteza istraživanja je da primjena kemoterapije utječe na evoluciju osteosarkoma koji postaje agresivniji i otporniji.

Stoga smo u populaciji tumorskih matičnih stanica porijeklom iz tri faze bolesti (pri uspostavi dijagnoze, nakon prvog ciklusa kemoterapije te nakon recidiva bolesti) jednog pacijenta usporedili sljedeće karakteristike stanica:

- indeks inicijacije tumora kao mjeru metastatskog potencijala tumorskih matičnih stanica, koristeći test formiranja sferoida
- duljinu telomera i aktivnost telomerase kako bismo odredili oslanjaju li se tumorske matične stanice na telomerazni mehanizam osiguravanja besmrtnosti, koristeći metodu lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu
- vijabilnost stanica u 2D i 3D kulturi nakon tretmana s cisplatinom, metotreksatom i doksorubicinom kao mjeru rezistencije na kemoterapeutike, koristeći test MTT

Rezultati ovog istraživanja proširit će znanje o karakteristikama i ulogama tumorskih matičnih stanica u osteosarkomu.

3 Materijali i metode

3.1 Uzgoj matičnih stanica osteosarkoma

U ovom istraživanju koristio sam uzorke stanica osteosarkoma dobivene iz Klinike za dječje bolesti Zagreb uz informirani pristanak i odobrenje Etičkog povjerenstva. Uzorci su dobiveni od pacijenta tijekom tri faze bolesti: biopsija pri uspostavi dijagnoze (uzorak P1), resekcija nakon prvog ciklusa kemoterapije (uzorak P2) te nakon recidiva bolesti (uzorak P3). Također, koristio sam stanične linije karcinoma vrata maternice HeLa i osteosarkoma U-2 OS kao kontrole. Za potrebe eksperimenata uzorci stanica pacijenata i kontrolnih staničnih linija uzgajani su na adherentnim površinama, formirajući jednosloj. Kulture su održavane u velikim Petrijevkama (Sarsedt, Njemačka) koristeći tekući medij DMEM/F12 (Capricorn Scientific, Njemačka) s dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS) (Capricorn Scientific, Njemačka) i 1% penicilina/streptomicina (Capricorn Scientific, Njemačka). Inkubacija je provedena u inkubatoru (Panasonic, Japan) pri 37 °C uz 5% CO₂. Prije tretmana stanice su pregledane pod invertnim mikroskopom *Zeiss Axiovert 40CFL* (Zeiss, Njemačka), a nakon postizanja konfluentnosti, izvršeno je pasažiranje. Proces je uključivao uklanjanje medija, dvostruko ispiranje PBS-om, dodavanje 1 mL tripsina te četverominutnu inkubaciju radi odvajanja stanica. Nakon resuspendiranja u svježem mediju, stanice su presađene. Ovim postupkom održavane su adherentne stanične kulture tijekom istraživanja. Matične stanice osteosarkoma ovih sarkoma dobivene su uzgojem sferoida u modificiranom Dullbeco Eagl mediju za uzgoj (DMEM) (Capricorn Scientific, Njemačka) i 2%-tnoj otopini metilceluloze (Sigma-Aldrich, SAD). Uzgojeni sferoidi izolirani su uz pomoć filtra za stanice (40 μm) te ispiranjem s PBS-om (Capricorn Scientific, Njemačka) kako bi se uklonila metilceluloza. Izolirani sferoidi nasađeni su u petrijevim zdjelicama kako bi formirali primarnu kulturu matičnih stanica osteosarkoma, koja se koristila za sljedeće eksperimente u rasponu pasaža 3-8.

3.2 Test formiranja sferoida

Pripremio sam medij za rast sferoida DMEM (2x) uz dodatak natrijevog bikarbonata, 20 nM progesterona, 100 μM putrescina i 2% ITS-a (Sigma-Aldrich, SAD) te 2%-tnu otopinu metilceluloze otapajući 10 g metilceluloze u 500 mL destilirane vode na 4 °C tri dana.

Kada su stanice dostigle 80-90% konfluentnosti nasadio sam ih na sljedeći način. Iz Petrijevke uklonio sam uzgojni medij pomoću sisaljke i vakuuma te sam isprao zaostali medij s 10 mL PBS-a. Uklonio sam PBS sisaljkom te odignuo stanice od površine sa 1 mL tripsina i inkubacijom od 4 minute pri 37 °C i 5% CO₂. Djelovanje tripsina blokirao sam dodavanjem 2 mL medija DMEM/F12. Stanice sam zatim prebacio u epruvetu te centrifugirao u centrifugi *ROTOFIX 32 A* (Hettich, Njemačka) 10 minuta na 1300 x g. Uklonio sam supernatant te resuspendirao talog u 1 mL medija DMEM. Stanice sam izbrojao pomoću tripanskog modrila i Bürker-Türk-ove komorice pod invertnim mikroskopom *Zeiss Axiovert 40CFL* (Zeiss, Njemačka). Stanice sam nasađivao u dvije koncentracije; 10 stanica/μL i 20 stanica/μL, u zasebne mikrotitarske pločice s 96 jažica s niskim afinitetom vezanja. Pripremio sam 10 mL stanične suspenzije u potrebnim razrjeđenjima uz dodatak 0.1 μL/mL EGF-a (Sigma-Aldrich, SAD) i 0.1 μL/mL FGF-a (Sigma-Aldrich, SAD). U svaku jažicu nasadio sam 100 μL stanične suspenzije u 100 μL metilceluloze. Pločice sam inkubirao 7 dana u inkubatoru pri 37 °C i 5% CO₂. Nakon inkubacije izbrojao sam nastale sferoide pod invertnim mikroskopom. Sferoidi su izbrojani te je udio u uzorku izračunat dijeljenjem tog broja s ukupnim brojem nasađenih stanica, prema formuli:

$$Udio\ CSC = \frac{Ukupan\ broj\ sferoida}{96 * 2000\ stanica}$$

3.3 Mjerenje relativne duljine telomera

3.3.1 Izolacija DNA

Kad su stanice dosegly konfluentnost od 80-90%, nakon tripsinizacije i centrifugiranja, stanice sam pripremio za izolaciju DNA.

Izolaciju DNA sam napravio pomoću kompleta *Quick DNA/RNA miniprep plus* (Zymo Research, SAD) prema protokolu proizvođača. Talog stanica sam resuspendirao u 200 μL DNA Shield-a i 100 μL PBS-a te 300 μL pufera za lizu. Stanice sam prebacio u žute kolonice *Spin-Away Filter*, koje se nalaze u epruveti za sakupljanje te ih centrifugirao 1 minutu na 16 000 x g u centrifugi *MIKRO 185* (Hettich, Njemačka). Filter *Spin-Away Filter* sam prebacio u novu epruvetu za sakupljanje. Sadržaj stare epruvete za sakupljanje se koristi paralelno za izolaciju RNA. Zatim sam prema protokolu dodavao pufer za pripremu te pufer za ispiranje te nakon svakog dodavanja kratko centrifugirao. Prebacio sam filter *Spin-Away Filter* u epruvetu te dodao 100 μL vode oslobođene

od DNaza i RNaza direktno na filter te centrifugirao 3 minute na 16 000 x g. Uzorke sam pohranio na - 20 °C.

3.3.2 Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

Odredio sam koncentraciju izolirane DNA eksperimentalnih uzoraka (P1, P2 i P3) te uzorcima stanica koje ću koristiti za normalizaciju (HeLa, U-2 OS) na uređaju *NanoDrop ND-1000* (Marshall Scientific, SAD). Protokol je baziran na metodi Cawthon 2002. relativne kvantifikacije duljine telomera koja koristi lančanu reakciju polimeraze u stvarnom vremenu za usporedbu količine umnoženog produkta ponavljajućih sljedova telomera sa količinom umnoženog produkta gena koji postoji u jednoj kopiji. Početnice za telomere vežu se na segmente bogate citozinom/gvaninom, dok sam za referentni gen koristio početnice specifične za interferon beta 1, a njihove sekvence su sljedeće:

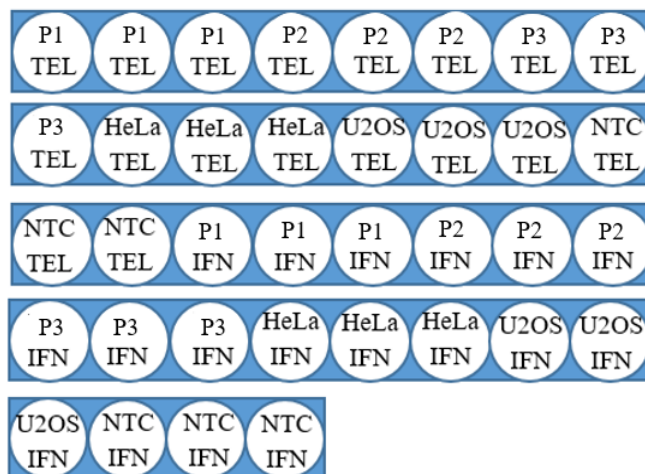
TEL – F 5'-CGGTTTGGTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT-3'

TEL – R 5'-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3'

IFNB1 – F 5'-GGTTACCTCCGAAACTGAAGA-3'

IFNB1 – R 5'-CCTTTCATATGCAGTACATTAGCC-3'

Prije samog eksperimenta proveo sam nekoliko reakcija q-PCR u svrhu optimizacije koncentracije početnica i koncentracije uzoraka u reakciji. Na temelju tih informacija odredio sam da je optimalna koncentracija početnica za telomere 0,35 μM, za IFNB1, 0,4 μM za TEL te koncentracija samih uzoraka u reakciji 0,01 ng/μL. Pripremio sam reakcijsku smjesu koja se sastoji od 5 μL boje



Slika 8. Shema nanošenja uzoraka i kontrola za PCR.

Syber Green (Biorad, SAD), 2 μL smjese uzvodnih i nizvodnih početnica te 1 μL autoklavirane *MiliQ* vode. Zatim sam dodao 8 μL reakcijske smjese u PCR epruvete te dodao po 2 μL DNA svakog od uzorka. U epruvete za negativnu kontrolu, umjesto uzorka, dodao sam 2 μL *MiliQ* vode prema shemi na Slici 8 (Slika 8). Reakciju lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu sam proveo na uređaju *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (Biorad, SAD) prema protokolu prikazanom u Tablici 2.

Tablica 2. Protokol za lančanu reakciju polimeraze u stvarnom vremenu.

	Aktivacija polimeraze	Denaturacija	Prijanjanje/sinteza	Analiza krivulje taljenja
		Ciklus x 40		
Temperatura	98 °C	98 °C	60 °C	65 °C – 95 °C
Vrijeme	2 minute	15 sekundi	1 minuta	0,5 °C svakih 5 sekundi

3.4 Detekcija ekspresije telomeraze

3.4.1 Izolacija RNA

Izolacija RNA provodila se pomoću kompleta *Quick DNA/RNA miniprep plus* (Zymo Research, SAD) paralelno s izolacijom DNA prema protokolu proizvođača.

Ukratko, talog stanica sam resuspendirao u 200 μL otopine *DNA Shield* i 100 μL PBS-a te 300 μL pufera za lizu. Stanice sam prebacio u žute kolonice *Spin-Away Filter*, koje se nalaze u epruveti za sakupljanje te ih centrifugirao 1 minutu na 16 000 x g. U eluat sam dodao 600 μL etanola te nakon resuspendiranja prebacio u zelene *Zymo-Spin IIICG Column* koje se nalaze u novoj epruveti za sakupljanje. Zatim sam dodao pufer za pripremu i pufer za ispiranje te nakon svakog dodavanja kratko centrifugirao. Prebacio sam eluat iz *Zymo-Spin IIICG Column* u epruvetu i dodao 100 μL vode oslobođene od DNaza i RNaza direktno na filter te centrifugirao 3 minute na 16 000 x g. Uzorke sam pohranio na – 20 °C.

3.4.2 Tretman uzoraka DNazom

Odredio sam koncentraciju izolirane RNA eksperimentalnih uzoraka te uzoraka stanica koje ću koristiti kao kontrole (HeLa, U-2 OS) na uređaju *NanoDrop ND-1000* (Marshall Scientific, SAD).

Kako bih iz uzoraka RNA uklonio prisutne jednolančane i dvolančane molekule DNA koristio sam endonukleazu *Dnase I, Rnase-free* (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača.

U reakcijsku smjesu stavio sam 1 µg RNA uzorka, 1 µL 10x pufera s MgCl₂, 1 µL DNaze I te *MiliQ* vode ovisno o uzorku kako bi ukupan volumen reakcijske smjese bio 10 µL. Nakon inkubacije od 30 min na 37 °C dodao sam 1 µL 50 mM EDTA i inkubirao 10 min na 65 °C. Pročišćene RNA uzorke dalje sam koristio u sintezi cDNA.

3.4.3 Sinteza cDNA

Sintezu cDNA radio sam pomoću kompleta *iScript™ cDNA Synthesis*, prema protokolu proizvođača (Biorad, SAD). Ukratko, pripremio sam reakcijsku smjesu ukupnog volumena 20 µL koja je sadržavala 4 µL smjese *5x iScript Reaction Mix*, 1 µL otopine *iScript* reverzne transkriptaze, 1 µg otopine uzorka RNA te vode bez nukleaza ovisno o uzorku. Također, kako bih tijekom reakcije PCR mogao provjeriti prisutnost DNA onečišćenja, za svaki sam uzorak proveo reakciju bez reverzne transkriptaze (NRT) kontrolu gdje je volumen 1 µL *iScript* reverzne transkriptaze zamijenjen 1 µL vode bez nukleaza. Reakcija se odvijala na termobloku *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* prema protokolu u Tablici 3. Nakon inkubacije uzorke sam pohranio na -20 °C.

Tablica 3. Protokol za inkubaciju reakcijske smjese za cDNA sintezu na termobloku

Prijanjanje	5 min na 25°C
Reverzna transkripcija	20 min na 46°C
Inaktivacija reverzne transkriptaze	1 min na 95°C

3.4.4 Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

Za detekciju ekspresije telomeraze proveo sam test lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (qRT-PCR). Koristio sam početnice za amplifikacijsku sekvencu gena za proteinsku komponentu telomeraze hTERT, a kao endogenu kontrolu amplifikacijsku sekvencu gena za beta-aktin. Njihove sekvence su sljedeće:

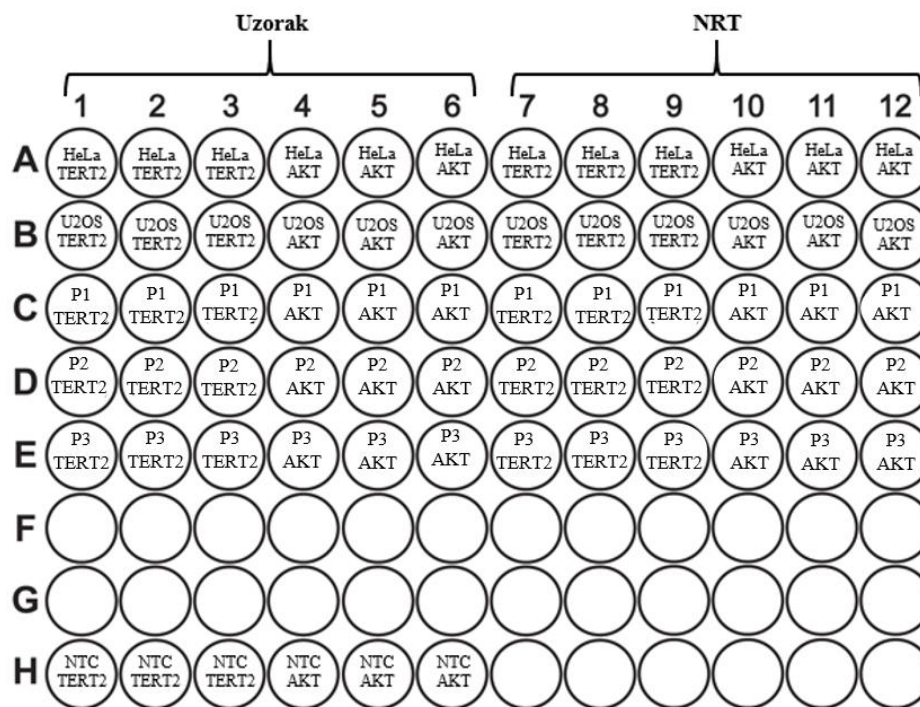
TERT 2 F - 5' GATCCCCCTTCTCCTTCAAAG 3'

TERT 2 R - 5' TGAGCTCCACTCTGTGTGTCTC 3'

β-AKT F - 5' GACGACATGGAGAAAATCTG 3'

β-AKT R - 5' ATGATCTGGGTCATCTTCTC 3'

Reakcijsku smjesu pripremio sam miješanjem 5 µL reakcijske smjese s polimerazom *Syber Green* (Biorad, SAD), 2 µL smjese odgovarajućih početnica te 2 µL *MiliQ* vode. Zatim sam na mikrotitarsku pločicu nanio po 9 µL reakcijske smjese u svaku jažicu označenu na Slici 9. U jažice s negativnom kontrolom (NTC) nanio sam 1 µL *MiliQ* vode, u svaku jažicu s uzorkom 1 µL cDNA odgovarajućeg uzorka te u jažice označene s NRT 1 µL odgovarajućeg uzorka koji je prošao korak cDNA sinteze bez dodatka reverzne transkriptaze. qRT-PCR reakcija odvila se u termobloku *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (Biorad, SAD) prema protokolu u Tablici 4.



Slika 9. Shema nanošenja uzoraka i kontrola za PCR.

Tablica 4. Protokol za lančanu reakciju polimeraze u stvarnom vremenu

	Aktivacija polimeraze	Denaturacija	Prijanjanje/sinteza	Analiza krivulje taljenja
		Ciklus x 40		
Temperatura	98 °C	98 °C	60 °C	65 °C – 95 °C
Vrijeme	2 minute	15 sekundi	1 minuta	0,5 °C svakih 5 sekundi

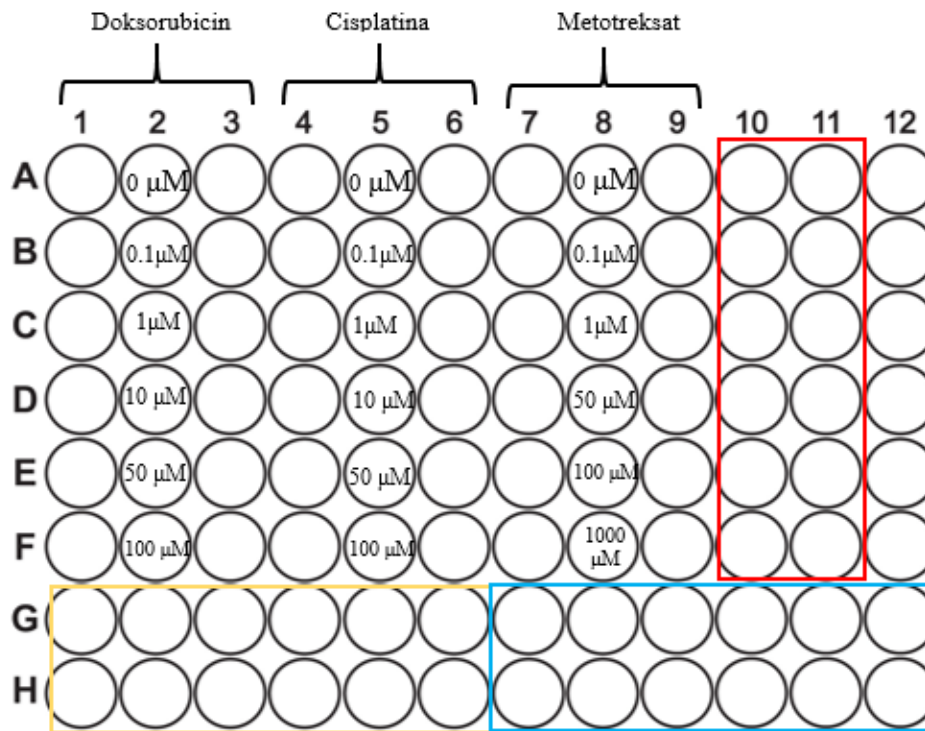
3.5 Određivanje vijabilnosti stanica nakon tretmana kemoterapeuticima

Nakon što su stanice dosegnule 80-90% konfluencije korištene su za eksperiment. Test rezistencije stanica na kemoterapeutike proveo sam na 3D (tumorski sferoidi) i 2D (adherentna kultura) staničnoj kulturi. Stanice uzoraka (P1, P2 i P3) nasadio sam na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica.

U svaku jažicu stavljeno je 100 μ L 2%-tne otopine metilceluloze te 100 μ L stanične suspenzije koncentracije 2500 stanica/100 μ L. Stanice su tretirane rastućim koncentracijama kemoterapeutika cisplatine, doksorubicina i metotreksata (Sigma-Aldrich, SAD) prema shemi na Slici 10. Za svaku koncentraciju pojedinačnog kemoterapeutika napravljena je i prazna kontrola gdje u jažice nisu nasadene stanice već tretmani kemoterapeutika. Prema shemi (Slika 10) to su jažice označene pravokutnicima: doksorubicin (žuto), cisplatina (plavo) i metotreksat (crveno). Također, nasadene su i tretirane adherentne stanice svakog uzorka na isti način, ali bez dodatka metilceluloze.

Nakon inkubacije od 72 sata na 37 °C i 5% CO₂ proveo sam test MTT u svrhu određivanja odgovora stanica na tretmane kemoterapeuticima. Prije mjerenja vijabilnosti stanica MTT testom sferoide sam snimio pod invertnim mikroskopom *Zeiss Axiovert 40CFL* (Zeiss, Njemačka) koristeći program za snimanje i uređivanje fotografija *Carl Zeiss™ AxioVision Rel. 4.8.2 Software*. Dijelovi pločice koji su fotografirani predstavljaju reprezentativan izgled i broj sferoida za određeni tretman. Uklonio sam medij te sam isprao stanice s 100 μ L PBS-a. Dodavanje MTT-a (Sigma-Aldrich, SAD) proveo sam u mraku u laminaru. U svaku jažicu dodao sam otopinu MTT-a koncentracije 5 mg/mL (razrijeđen u mediju), stanice sam inkubirao 3 sata. MTT spoj ulazi u stanicu, gdje ga dehidrogenaze reduciraju iz blijedo-žutog u tamnoplavi formazan. Ovaj test procjenjuje metaboličku aktivnost stanica, jer samo žive stanice mogu provesti tu redukciju. MTT je topiv u vodi, dok formazan formira netopljive ljubičaste kristale unutar stanica. Nakon inkubacije dodao sam 170 μ L DMSO-a (Sigma-Aldrich, SAD) promiješao i inkubirao 30 minuta

kako bih otopio nastale kristale formazana. (Kod uzorka sferoida P1 umjesto 40 μL dodao sam 170 μL MTT-a, zbog čega sam nakon inkubacije premjestio 150 μL volumena u novu mikrotitarsku pločicu te nastavio s dodavanjem 170 μL DMSO-a u obe pločice. Zbog dužine inkubacije sferoidnih uzoraka u DMSO-u mjerenje je napravljeno dva puta). Rezultate apsorbancije sam očitao kolorimetrijski na čitaču mikrotitarskih pločica *GloMax®-Multi Detection System* (Promega, SAD) pri valnoj duljini od 560 nm.



Slika 10. Shema nasađivanja stanica za tretman kemoterapeuticima.

3.6 Statistička obrada podataka

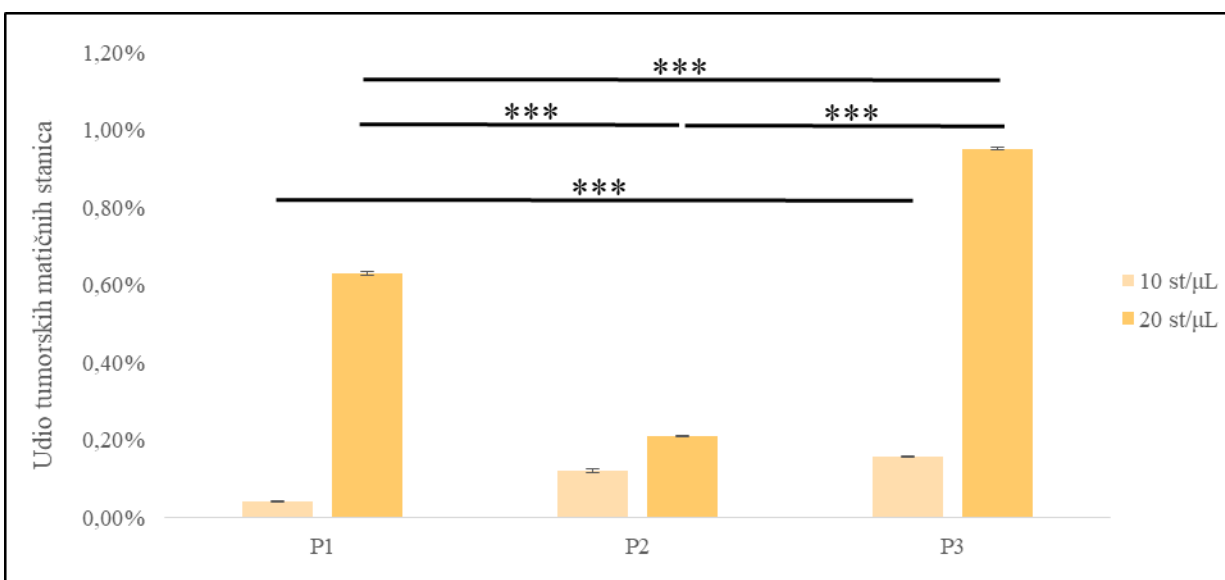
Dobiveni rezultati su statistički obrađeni pomoću programa jamovi (The jamovi project (2024). jamovi (Version 2.5) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>). Rezultati mjerenja duljine telomera i testa rezistencije na kemoterapeutike izraženi su kao srednje vrijednosti tripplikata te su promjene u vrijednostima podataka između uzoraka ispitane pomoću jednosmjernih analiza varijanci (ANOVA) i post-hoc testovima (Tukeyev test, Games-Howell test), uzimajući $p < 0,05$ kao značajnu razliku. Rezultati testa formiranja sferoida izraženi kao srednja vrijednost udjela sferoida za određenu mikrotitarsku pločicu (96 jažica) te su promjene u vrijednostima podataka između uzoraka ispitane korištenjem ANOVA i Welch testa uzimajući $p < 0,001$ kao značajnu razliku.

4 Rezultati

U sljedećim poglavljima prikazani su rezultati testa formiranja sferoida, mjerenja relativne duljine telomera i ekspresije telomerase te određivanje vijabilnosti stanica nakon tretmana kemoterapeuticima koji su provedeni na uzorcima stanica izoliranih iz različitih faza bolesti: biopsija pri uspostavi dijagnoze (uzorak P1), resekcija nakon prvog ciklusa kemoterapije (uzorak P2) te nakon recidiva bolesti (uzorak P3). Ova mjerenja su rađena kako bi se utvrdilo dolazili do povećanja rezistencije i agresivnosti osteosarkoma tijekom njegove evolucije.

4.1 Sposobnost formiranja sferoida kod stanica osteosarkoma

Test formiranja sferoida koristio sam za određivanje udjela matičnih stanica u uzorcima stanica osteosarkoma izoliranih iz različitih faza bolesti. Eksperiment se temelji na mogućnosti matičnih stanica da stvaraju sferoide u suspenzijskoj kulturi što je postignuto nasadivanjem stanica u metilcelulozi. Nakon inkubacije od 7 dana, pločice sam pregledao pod invertnim mikroskopom te izbrojio nastale sferoide. Udio tumorskih matičnih stanica u svakom uzorku, izražen u postotku prikazan je na Slici 11 (Slika 11). Tijekom brojanja, kod svih uzoraka primijetio sam izuzetno malu količinu formiranih sferoida pri koncentraciji od 1000 stanica po jažici te pri ovoj koncentraciji u



Slika 11. Udio matičnih stanica u uzorcima stanica osteosarkoma izoliranih: pri uspostavi dijagnoze (P1), nakon prvog ciklusa kemoterapije (P2) i nakon recidiva bolesti (P3) nakon testa formiranja sferoida. Stanice su uzgajane u otopini metilceluloze bez seruma. Rezultati su izraženi u postotku udjela izbrojenih sferoida s obzirom na nasadenu koncentraciju stanica. Podaci su statistički obrađeni s dva jednosmjerna ANOVA testa (***) $p < 0.001$.

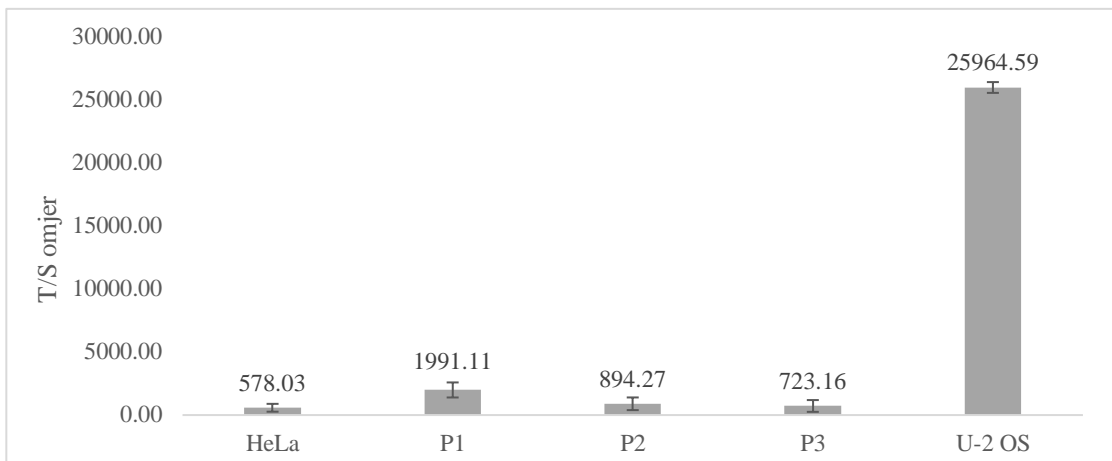
velikom broju nasadenih jažica uopće nije došlo do formiranja sferoida, dok je pri koncentraciji od 2000 stanica po jažici većina jažica sadržavala sferoide.

Kako bih provjerio postoje li statistički značajne razlike u udjelu matičnih stanica između uzoraka P1, P2 i P3 proveo sam dva jednosmjerna ANOVA testa. Utvrđene su statistički značajne razlike u udjelu matičnih stanica pri koncentraciji od 20 st/ μ L, na način da najveći udio matičnih stanica ima uzorak P3 zatim uzorak P1, dok najmanji udio matičnih stanica ima uzorak P2.

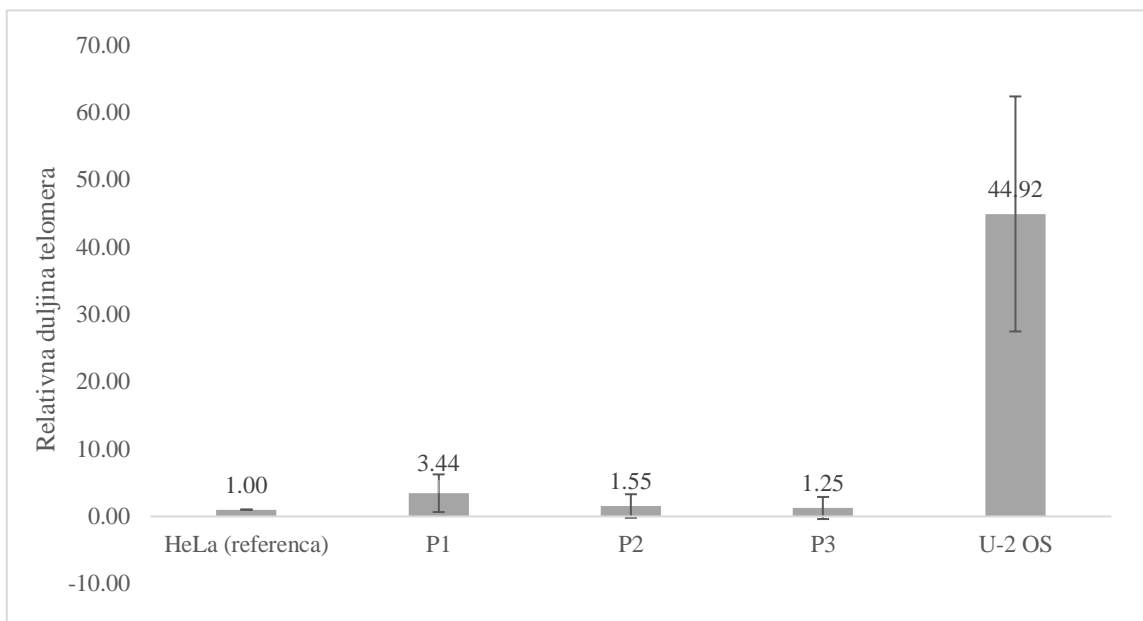
Također, s tri različita Welch testa ispitao sam razlike u udjelu matičnih stanica u pojedinom uzorku (P1, P2 i P3), ovisno o nasadenoj koncentraciji stanica (10 st/ μ L i 20 st/ μ L). Utvrđen je veći udio matičnih stanica pri koncentraciji od 20 st/ μ L kod uzoraka P1 i P3 ($t=-13.47$, $df=102.86$, $p<0.001$; $t=-20.82$, $df=165.86$, $p<0.001$). Nije utvrđena razlika u udjelu matičnih stanica između koncentracija 10 i 20 u uzorku P2 ($t=-1.94$, $df=148.83$, $p>0.05$). Ovi rezultati dokazuju prisutnost stanica koje mogu stvarati sferoide u svim fazama bolesti.

4.2 Analiza relativne duljine telomera u uzorcima stanica osteosarkoma

Iz uzoraka staničnih kultura stanica osteosarkoma izoliranih tijekom različitih faza bolesti izolirana je DNA te je provedena reakcija q-PCR za telomerne sekvence i amplifikacijsku sekvencu gena za interferon beta (IFNB1). Relativna duljina telomera svakog uzorka izolirane DNA izračunata je pomoću razlike između Ct vrijednosti telomera i IFNB1 dobivenih lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu. Omjer umnoženog genetskog materijala telomera naprema genu koji postoji u jednoj kopij prikazan je na Slici 12. Stanična linija HeLa bila je korištena kao kontrola s kratkim telomerama te su rezultati normalizirani s obzirom na nju dok je stanična linija U-2 OS bila korištena kao kontrola s dugim telomerama (Slika 13). Rezultati su normalizirani koristeći formulu $2^{-(\Delta Ct(\text{uzorka}) - \Delta Ct(\text{HeLa}))}$. Svi testirani uzorci (P1, P2, P3) imaju veću relativnu duljinu telomera od stanične linije HeLa, a manju od stanične linije U-2 OS. Rezultati su statistički obrađeni provedbom analize varijance u jednom smjeru te nisu utvrđene statistički značajne razlike u promjeni relativne duljine telomera među uzorcima P1, P2 i P3 ($F=1.196$; $df_1=2$, $df_2=6$; $p>0.05$).



Slika 12. Omjer umnoženog genetskog materijala telomera i gena koji postoji u jednoj kopiji (interferon beta) kod uzoraka stanica osteosarkoma izoliranih tijekom različitih faza bolesti: pri uspostavi dijagnoze (P1), nakon prvog ciklusa kemoterapije (P2) i nakon recidiva bolesti (P3), te iz stanične kulture staničnih linija HeLa i U-2 OS. Iz uzoraka izolirana je DNA te je provedena reakcija q-PCR za telomerne sekvence i amplifikacijsku sekvencu gena za interferon beta (IFNB1). Brojevi iznad uzoraka označavaju omjer umnoženog genetskog materijala telomera i IFNB1 u pojedinom uzorku.



Slika 13. Relativna duljina telomera uzoraka stanica osteosarkoma izoliranih tijekom različitih faza bolesti: pri uspostavi dijagnoze (P1), nakon prvog ciklusa kemoterapije (P2) i nakon recidiva bolesti (P3), te iz stanične kulture stanične linije U-2 OS. Iz uzoraka izolirana je DNA te je provedena reakcija q-PCR za telomerne sekvence i amplifikacijsku sekvencu gena za interferon beta (IFNB1). Rezultati su normalizirani prema gDNA izolirane iz stanične kulture stanične linije HeLa. Brojevi iznad uzoraka označavaju relativnu duljinu telomera u odnosu na referentnu staničnu liniju.

4.3 Analiza ekspresije telomeraze u uzorcima stanica osteosarkoma

Iz uzoraka staničnih kultura stanica osteosarkoma izoliranih tijekom različitih faza bolesti izolirana je RNA, koja je korištena za sintezu cDNA i provedbu qRT-PCR reakcije za amplifikacijsku sekvencu gena za proteinsku komponentu telomeraze hTERT, a kao endogena kontrola korištena je amplifikacija sekvencu gena za beta-aktin (β -AKT). U Tablici 5 prikazani su rezultati očitanih Ct vrijednosti tijekom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu. Kao kontrole korištene su stanične linije s već utvrđenim statusom ekspresije telomeraze: stanična linija HeLa s aktivnom telomerazom i stanična linija U-2 OS s inaktivnom telomerazom. Za sve testirane uzorke stanica izoliranih iz osteosarkoma pacijenta pri uspostavi dijagnoze (P1), nakon prvog ciklusa kemoterapije (P2) i nakon recidiva bolesti (P3) te kontrolni uzorak stanične linije U-2 OS, Ct vrijednosti za hTERT proteinsku regiju telomeraze iznose 0, dok se beta-aktin koji je korišten kao endogena kontrola umnožio u svim uzorcima. Glavni rezultat je da nije detektirana ekspresija telomeraze u uzorcima osteosarkoma, s toga u daljnjem eksperimentu nije mjerena ni njena aktivnost.

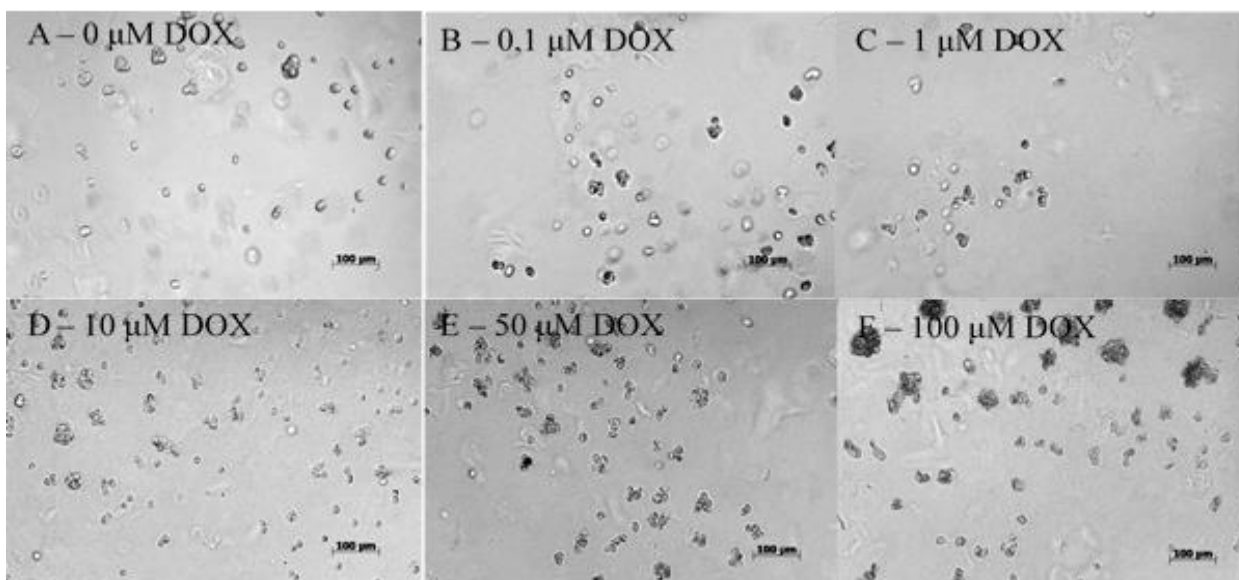
Tablica 5. Aritmetička sredina Ct vrijednosti dobivenih lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu.

Ct	hTERT	β -AKT
P1	0,00	17,23
P2	0,00	15,82
P3	0,00	16,54
HeLa	35,58	16,21
U-2 OS	0,00	15,90

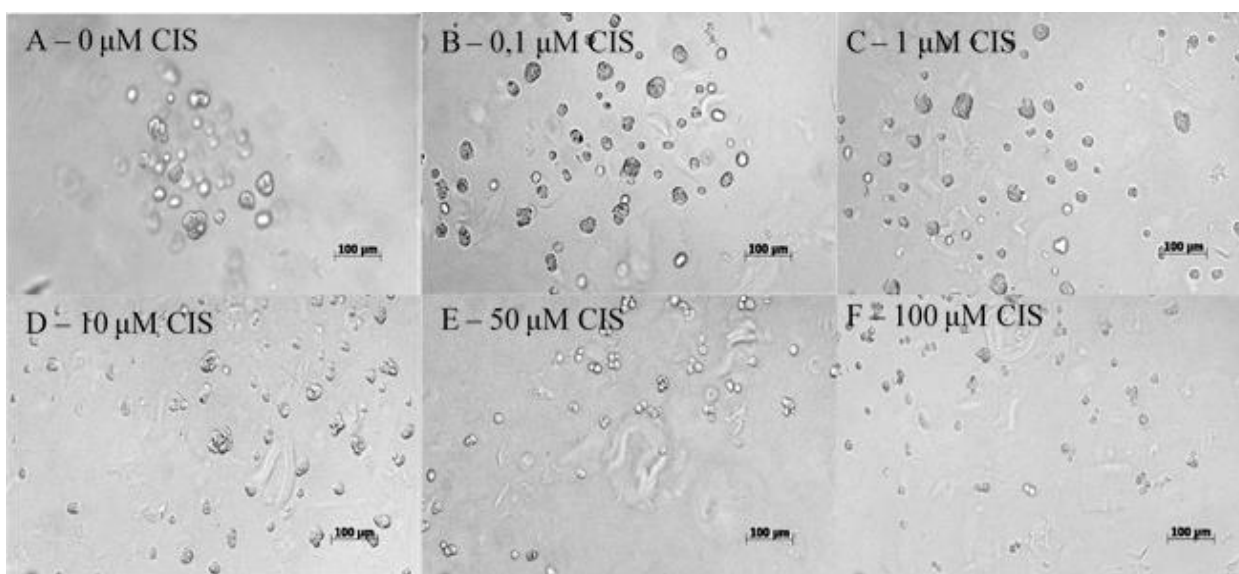
4.4 Analiza vijabilnosti stanica osteosarkoma nakon tretmana kemoterapeuticima

Određivanje vijabilnosti stanica osteosarkoma nakon tretmana kemoterapeuticima provedeno je nasadivanjem stanica u 2D (adherentna kultura) i 3D (tumorski sferoidi) staničnoj kulturi te tretiranjem istih kemoterapeuticima: doksorubicinom i cisplatinom (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M) te metotreksatom (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M). Nakon inkubacije od 72 sata na 37 °C i 5% CO₂ stanične kulture su pregledane i uslikane pod invertnim mikroskopom, nakon čega je provedeno određivanje stanične vijabilnosti pomoću testa MTT. Na slikama su prikazani rezultati tretmana tumorskih sferoida uzoraka stanica osteosarkoma izoliranih tijekom različitih faza bolesti: pri uspostavi dijagnoze (P1), nakon prvog ciklusa kemoterapije (P2) i nakon

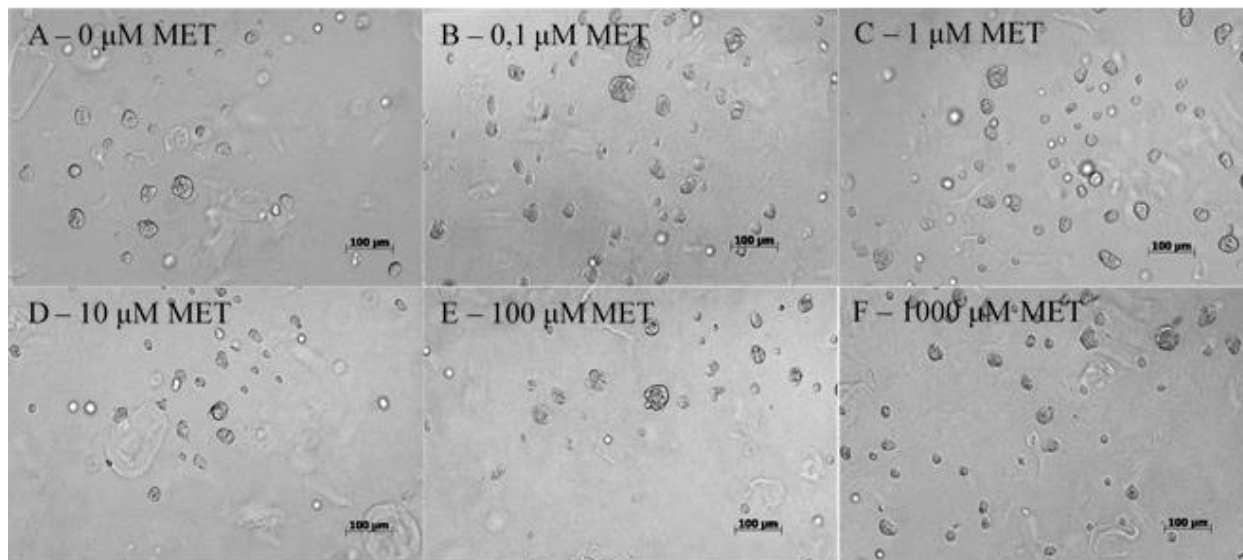
recidiva bolesti (P3), odvojeni prema rastućim tretmanima kemoterapeutika doksorubicina, cisplatine i metotreksata.



Slika 14. Sferoidi matičnih stanica osteosarkoma (P1) nakon tretmana doksorubicinom fotografirani pod invertnim mikroskopom *Zeiss Axiovert 40CFL* na povećanju 40x.



Slika 15. Sferoidi matičnih stanica osteosarkoma (P1) nakon tretmana cisplatinom fotografirani pod invertnim mikroskopom *Zeiss Axiovert 40CFL* na povećanju 40x.

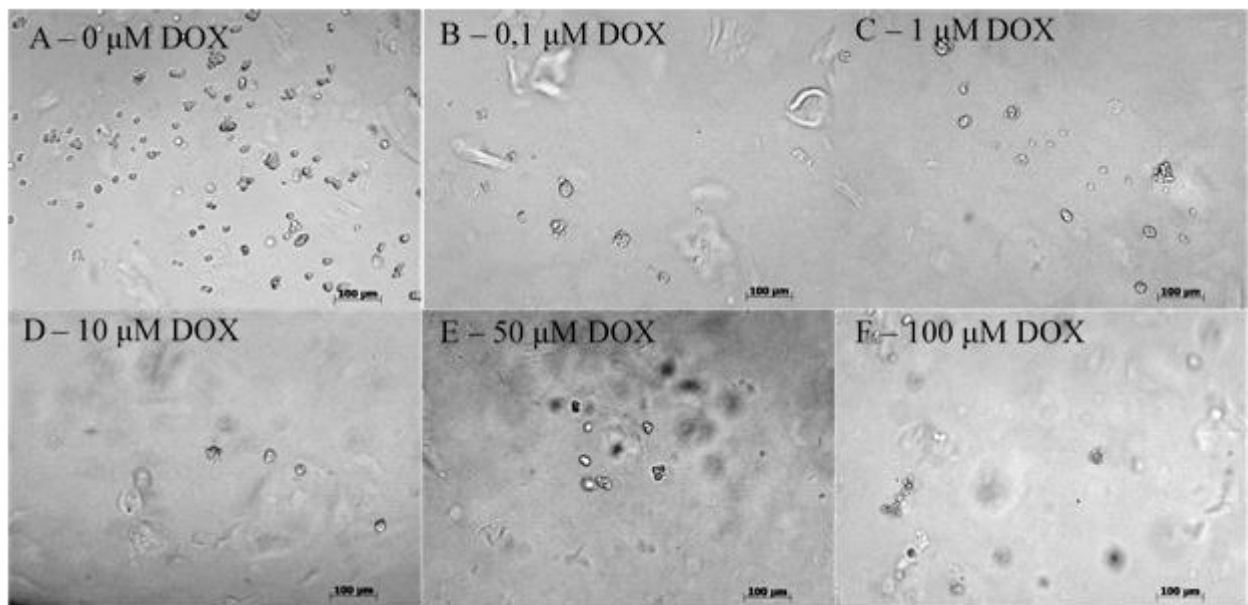


Slika 16. Sferoidi matičnih stanica osteosarkoma (P1) nakon tretmana metotreksatom fotografirani pod invertnim mikroskopom *Zeiss Axiovert 40CFL* na povećanju 40x.

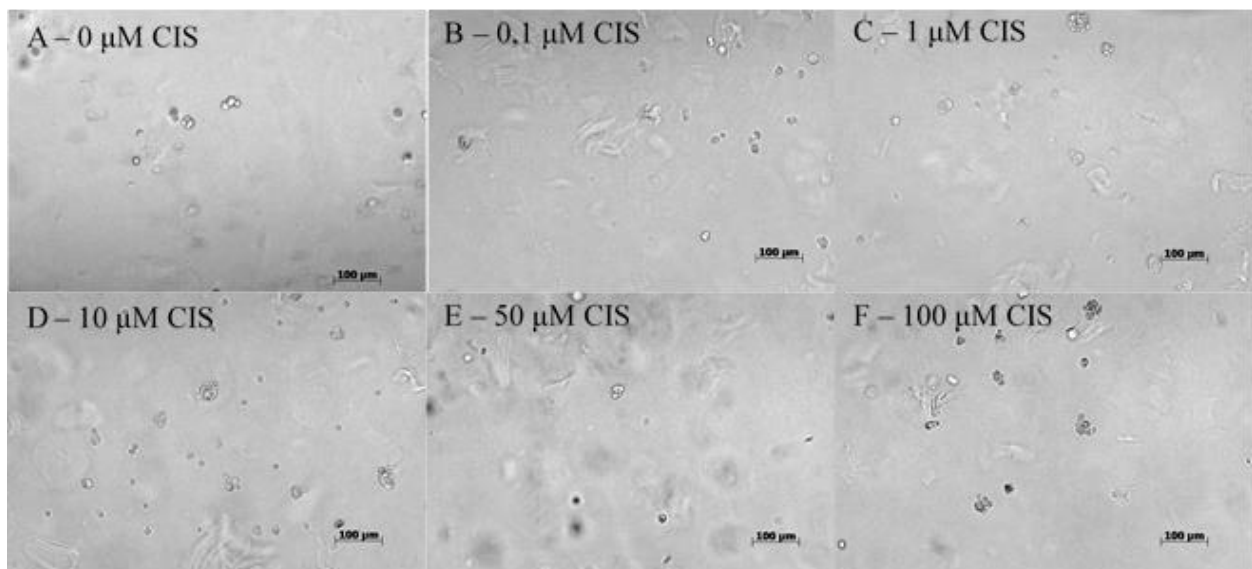
Na Slici 14 prikazani su sferoidi matičnih stanica osteosarkoma uzorka P1 nakon tretmana doksorubicinom. Kod tretmana bez kemoterapeutika i pri tretmanu od 0,1 μM može se primijetiti manji broj sferoida, manje veličine. Rastom koncentracija tretmana (10 μM , 50 μM) dolazi do porasta i broja i veličine sferoida. Pri najvišoj koncentraciji doksorubicina (100 μM) je ovaj fenomen najviše vidljiv, pogotovo u veličini sferoida.

Na Slici 15 prikazani su sferoidi matičnih stanica osteosarkoma uzorka P1 nakon tretmana cisplatinom. Kod tretmana bez kemoterapeutika vidljiv je mali broj malih sferoida. Porastom koncentracije cisplatine (0,1 μM , 1 μM) dolazi do porasta broja sferoida, a pri još višoj koncentraciji (10 μM) vidljiv je i rast u veličini koji se nastavlja pri još višim koncentracijama cisplatine (50 μM , 100 μM).

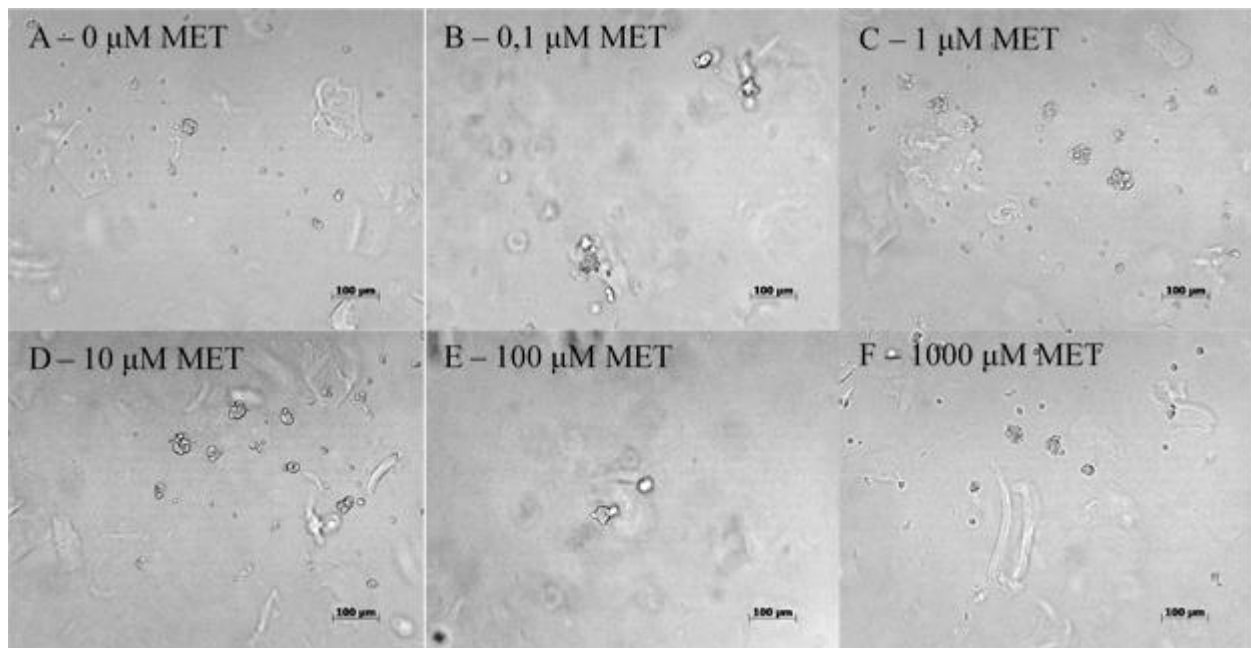
Na Slici 16 prikazani su sferoidi matičnih stanica osteosarkoma uzorka P1 nakon tretmana metotreksatom. Kod tretmana bez kemoterapeutika te pri nižim koncentracijama metotreksata (0 μM , 0,1 μM , 1 μM , 10 μM) vidljiv je veći broj sferoida, dok pri višoj koncentraciji (100 μM , 1000 μM) vidljiv je manji broj većih sferoida.



Slika 17. Sferoidi matičnih stanica osteosarkoma (P2) nakon tretmana doksorubicinom fotografirani pod invertnim mikroskopom *Zeiss Axiovert 40CFL* na povećanju 40x.



Slika 18. Sferoidi matičnih stanica osteosarkoma (P2) nakon tretmana cisplatinom fotografirani pod invertnim mikroskopom *Zeiss Axiovert 40CFL* na povećanju 40x.

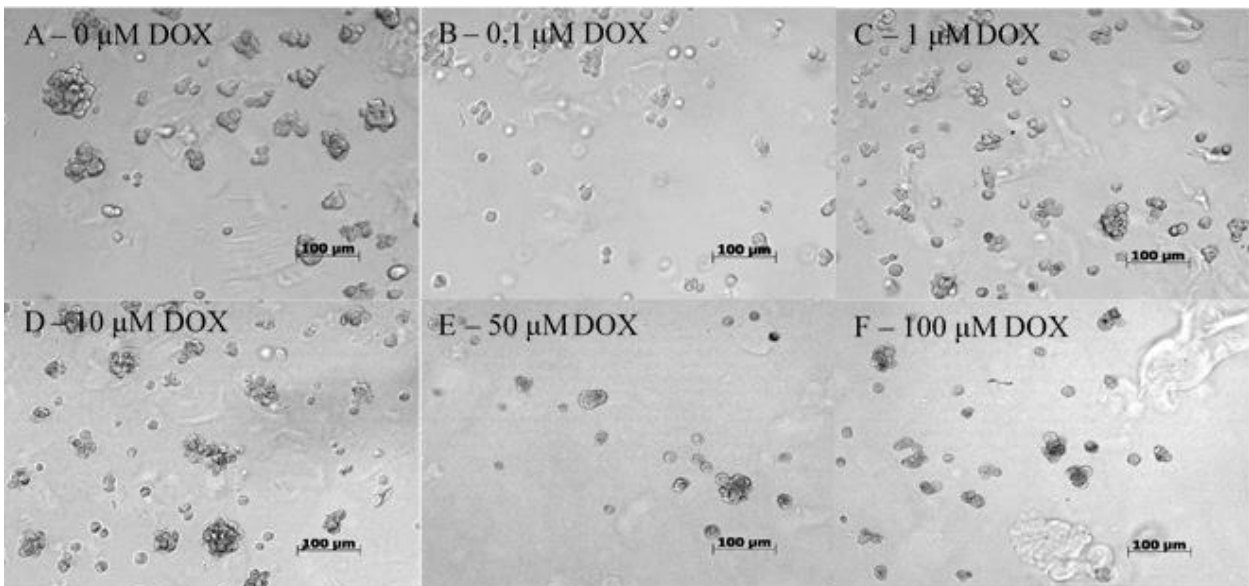


Slika 19. Sferoidi matičnih stanica osteosarkoma (P2) nakon tretmana metotreksatom fotografirani pod invertnim mikroskopom *Zeiss Axiovert 40CFL* na povećanju 40x.

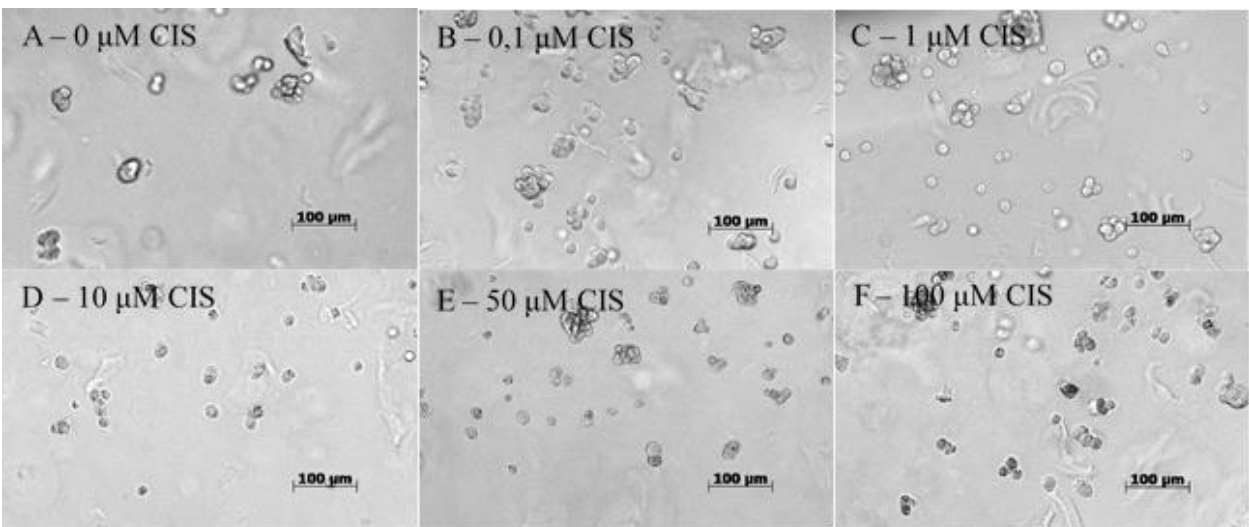
Na Slici 17 prikazani su sferoidi matičnih stanica osteosarkoma uzorka P2 nakon tretmana doksorubicinom. Kod tretmana bez kemoterapeutika vidljiv je veći broj sferoida, porastom koncentracije doksorubicina dolazi do drastičnog smanjenja broja sferoida.

Na Slici 18 prikazani su sferoidi matičnih stanica osteosarkoma uzorka P2 nakon tretmana cisplatinom. Kod tretmana bez kemoterapeutika vidljiva su samo dva sferoida. Rastom koncentracije cisplatine broj sferoida ostaje nizak no može se primijetiti porast u veličini određenih sferoida pri koncentracijama od 1 μM , 10 μM i 100 μM . Pri koncentraciji od 50 μM vidljiv je samo jedan sferoid minimalne veličine.

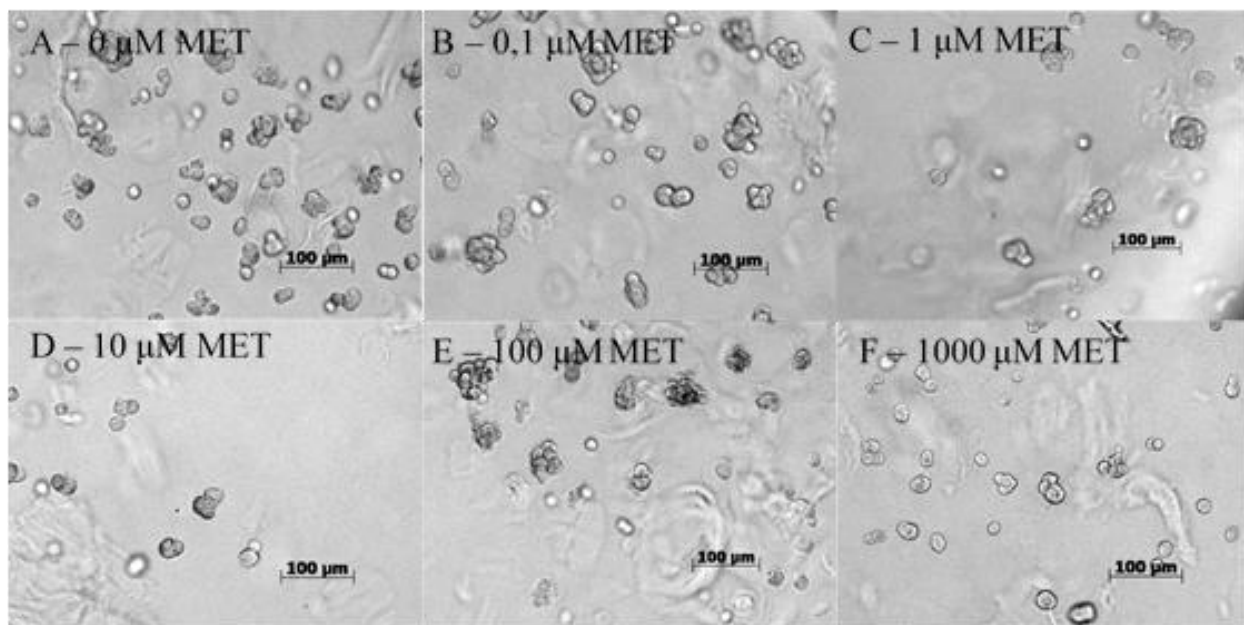
Na Slici 19 prikazani su sferoidi matičnih stanica osteosarkoma uzorka P2 nakon tretmana metotreksatom. Kod tretmana bez kemoterapeutika i pri koncentraciji metotreksata od 0,1 μM vidljiv je manji broj sferoida. Povećanjem koncentracije (1 μM , 10 μM) dolazi do porasta u veličini i broju sferoida, dok se pri najvišim koncentracijama (100 μM , 1000 μM) broj sferoida ponovno smanjuje.



Slika 20. Sferoidi matičnih stanica osteosarkoma (P3) nakon tretmana metotreksatom fotografirani pod invertnim mikroskopom *Zeiss Axiovert 40CFL* na povećanju 40x.



Slika 21. Sferoidi matičnih stanica osteosarkoma (P3) nakon tretmana cisplatinom fotografirani pod invertnim mikroskopom *Zeiss Axiovert 40CFL* na povećanju 40x.



Slika 22. Sferoidi matičnih stanica osteosarkoma (P3) nakon tretmana metotreksatom fotografirani pod invertnim mikroskopom *Zeiss Axiovert 40CFL* na povećanju 40x.

Na Slici 20 prikazani su sferoidi matičnih stanica osteosarkoma uzorka P3 nakon tretmana doksorubicinom. Kod tretmana bez kemoterapeutika te pri koncentracijama doksorubicina od 0,1 μM, 1 μM i 10 μM vidljiv je velik broj većih sferoida. Pri višoj koncentraciji (50 μM, 100 μM) dolazi do smanjenja broja i veličine sferoida.

Na Slici 21 prikazani su sferoidi matičnih stanica osteosarkoma uzorka P3 nakon tretmana cisplatinom. Kod tretmana bez kemoterapeutika te pri koncentraciji cisplatine od 10 μM vidljiv je manji broj sferoida. Pri ostalim koncentracijama vidljiv je porast broja i veličine sferoida, razlika u veličini je najbolje vidljiva pri koncentraciji od 1 μM.

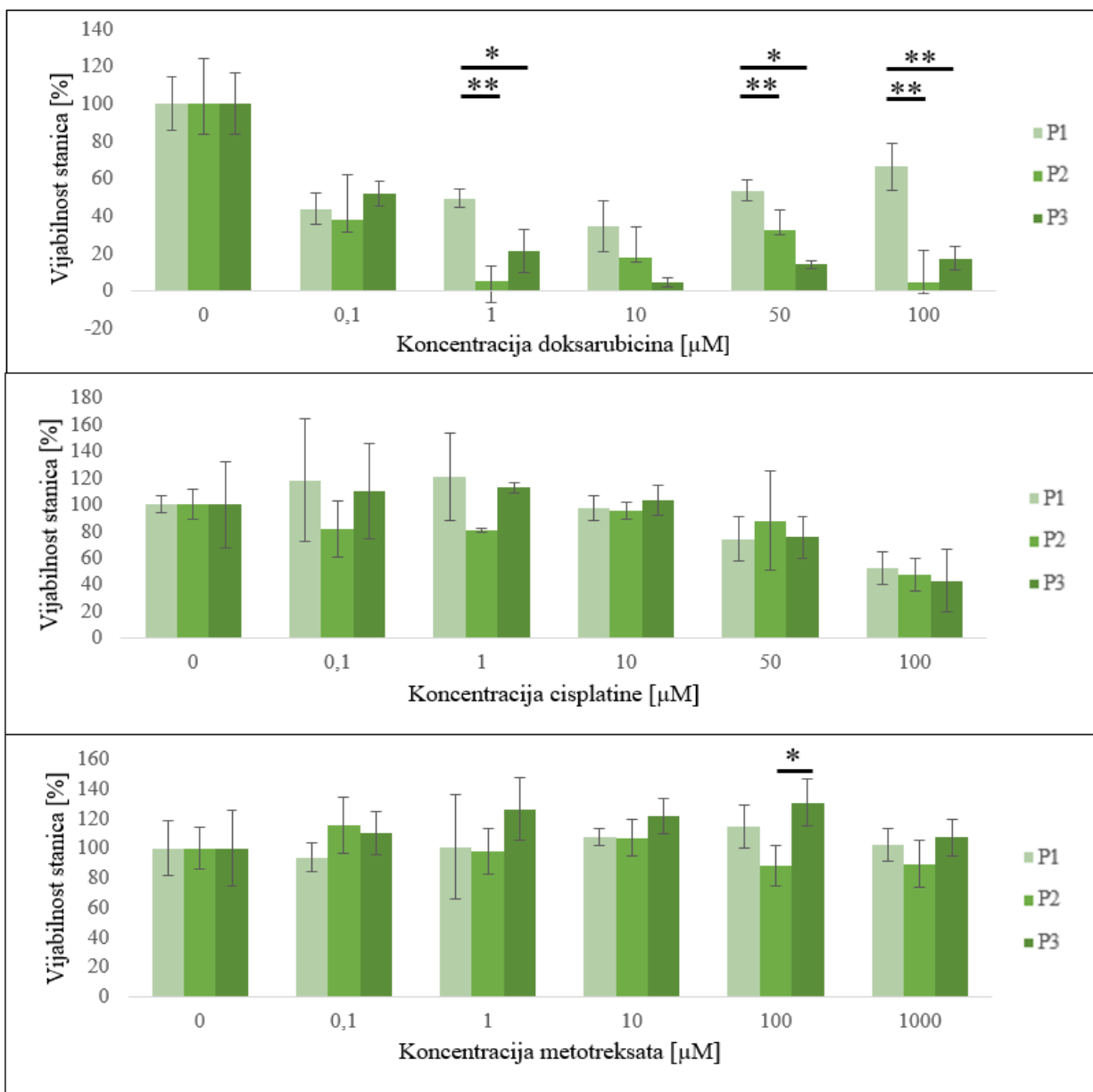
Na Slici 22 prikazani su sferoidi matičnih stanica osteosarkoma uzorka P3 nakon tretmana metotreksatom. Kod tretmana bez kemoterapeutika vidljiv je veći broj sferoida, povećanjem koncentracije metotreksata (0,1 μM) broj sferoida ostaje sličan, no povećava se udio većih sferoida. Pri još višim koncentracijama (1 μM, 10 μM, 1000 μM) dolazi do pada veličine sferoida dok pri svim višim koncentracijama (1 μM, 10 μM, 100 μM, 1000 μM) dolazi do pada broja sferoida.

Za procjenu vijabilnosti stanica nakon tretmana kemoterapeutičima koristio sam kolorimetrijski test redukcije tetrazolijeve MTT soli soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid). Vijabilnost stanica za pojedini uzorak izračunao sam uz pomoć očitanih apsorbancija za pojedini tretman na sljedeći način: od svake apsorbancije oduzeo sam aritmetičku sredinu očitanih praznih vrijednosti apsorbancije za pojedini tretman. Dobivene vrijednosti tretiranih uzoraka podijelio sam s dobivenim vrijednostima netretiranih uzoraka te izračunao aritmetičku sredinu za svaki tretman, a zatim sam dobivene vrijednosti pomnožio sa 100 kako bih dobio postotak vijabilnosti stanica. Rezultati prikazani na grafovima podijeljeni su prema korištenom kemoterapeutiku.

Rezultati MTT testa na adherentnim stanicama prikazani na Slici 23 pokazuju da doksorubicin ima najjače djelovanje na sve uzorke pri nižim koncentracijama. Pri višim koncentracijama doksorubicin zadržava snažan učinak na uzorke P2 i P3, dok kod uzorka P1 dolazi do smanjenja citotoksičnosti pri koncentracijama od 50 μM i 100 μM . Visoka koncentracija tretmana cisplatine (100 μM) ima najveći utjecaj na smanjenje vijabilnosti stanica P3 uzorka. Tretmani metotreksata pokazuju najslabiji utjecaj na vijabilnost stanica pri svim koncentracijama. Jednosmjernim analizama varijance i post-hoc testovima (Tukeyev test ili Games-Howell test) ispitane su razlike u vijabilnosti stanica uzoraka P1, P2 i P3 nakon primjene različitih koncentracija kemoterapeutika. Rezultati pokazuju da doksorubicin u koncentracijama od 1 μM , 50 μM i 100 μM značajno smanjuje vijabilnost stanica uzoraka P2 i P3 u odnosu na P1, što sugerira da stanice P1 imaju veću otpornost na doksorubicin. Kod tretmana cisplatinom, nije utvrđena značajna razlika u vijabilnosti između različitih uzoraka pri bilo kojoj koncentraciji. Međutim, tretman metotreksatom pri koncentraciji od 50 μM pokazao je statistički značajnu razliku između uzoraka P2 i P3, s većom vijabilnošću u uzorku P3.

Na Slici 24 prikazani su rezultati vijabilnosti matičnih stanica osteosarkoma tretiranih rastućim koncentracijama terapeutika nakon prvog od dva mjerenja. Rezultati vijabilnosti stanica za uzorke P1 pri većini koncentracija svih terapeutika prelaze u negativne vrijednosti, s obzirom da su tijekom računanja određene vrijednosti apsorbancije praznih tretmana bile veće od eksperimentalnih vrijednosti. Vijabilnost matičnih stanica uzorka P2 prelazi 100% pri višim koncentracijama tretmana doksorubicina i cisplatine te pri tretmanima metotreksata koncentracije 1 μM i 10 μM . Isto vrijedi i za matične stanice uzorka P3 pri koncentracijama cisplatine većima od 0,1 μM . Može

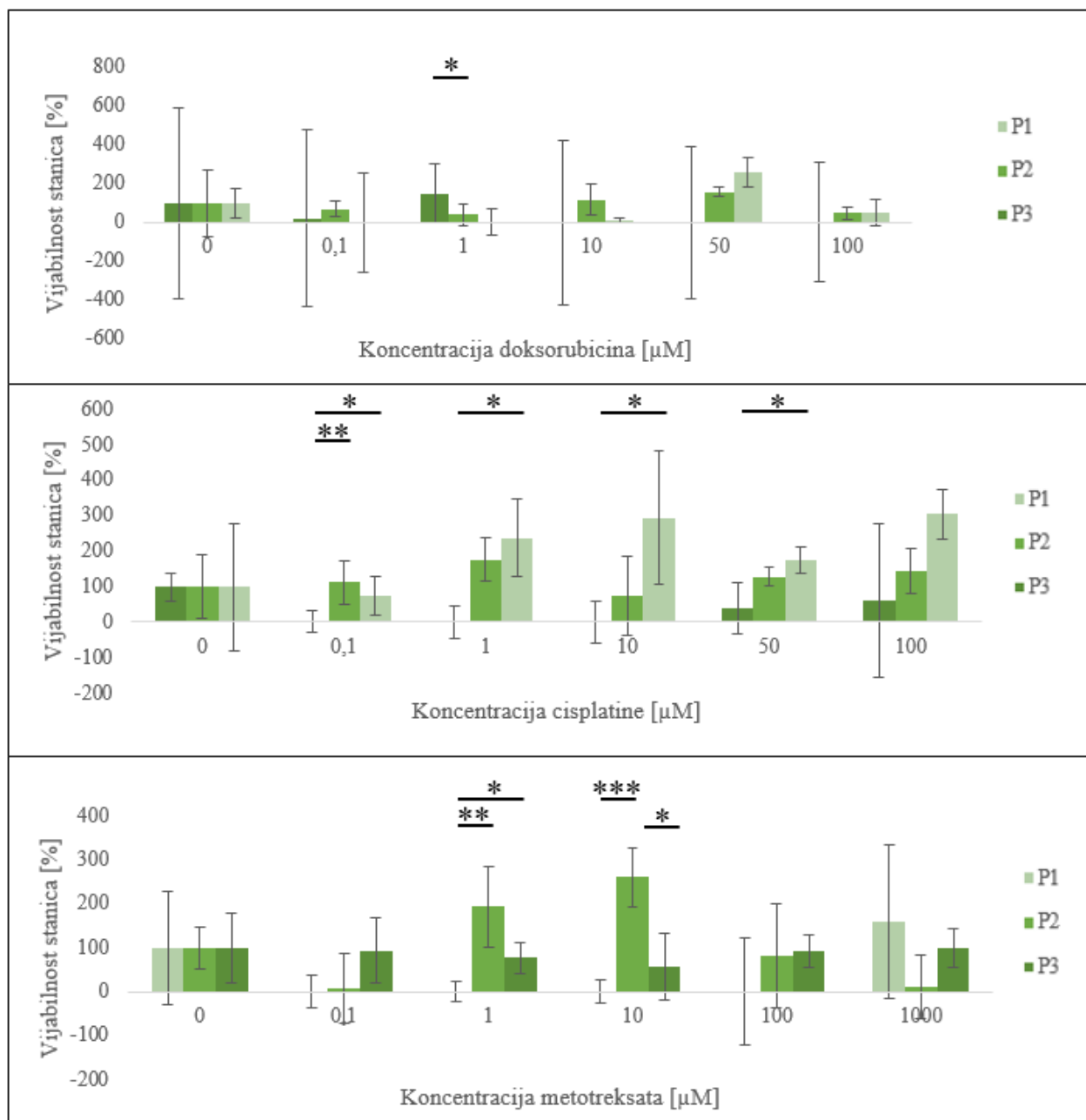
se primijetiti postepeni pad u vijabilnosti stanica uzorka P3 rastom koncentracije tretmana metotreksatom do 50 μM , više koncentracije pokazuju rast vijabilnosti stanica.



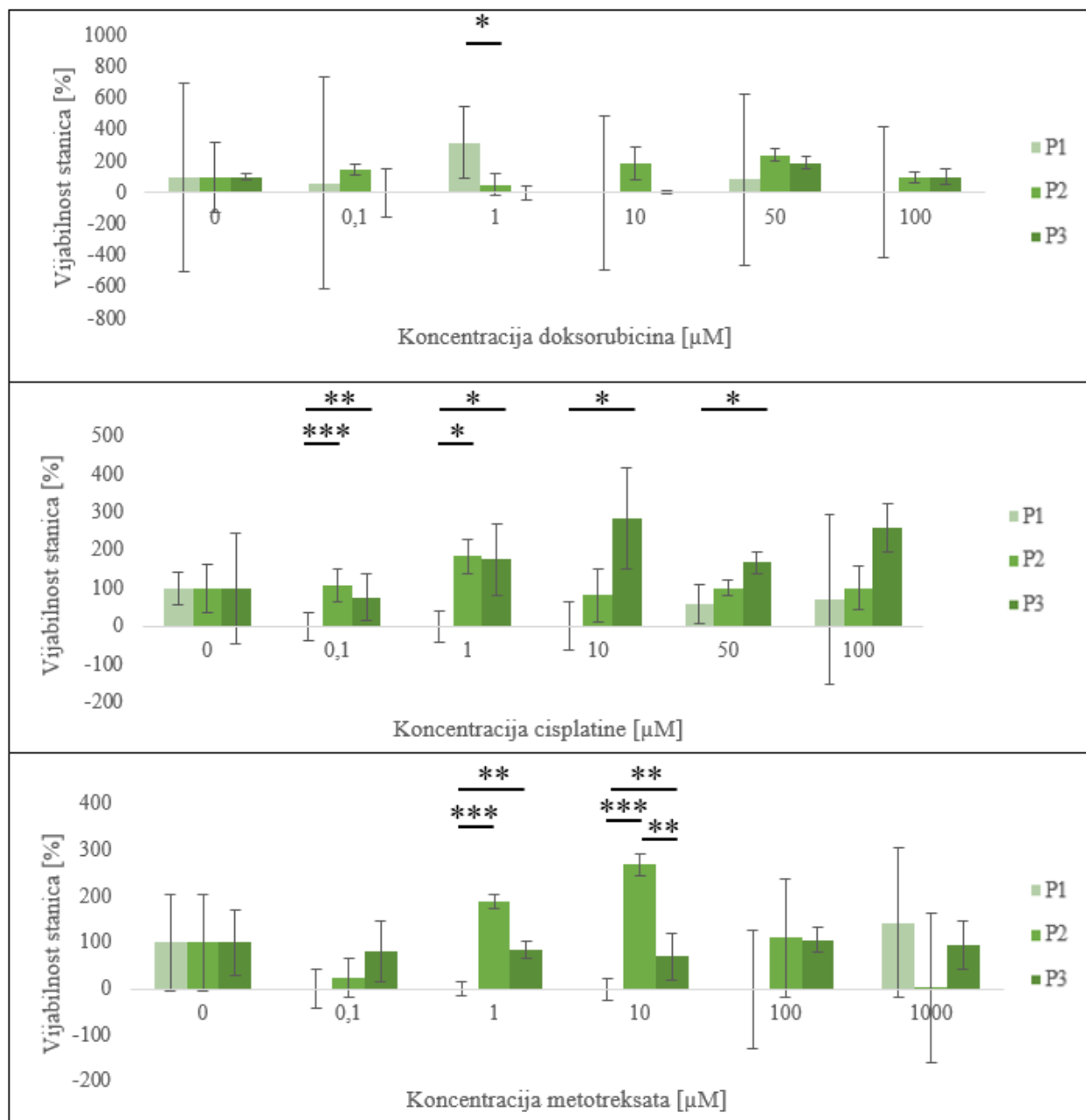
Slika 23. Grafički prikaz vijabilnosti adherentnih stanica uzorka P1, P2 i P3 tretiranih rastućim koncentracijama kemoterapeutika (doksorubicin, cisplatina, metotreksat). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

Jednosmjernim analizama varijance i kasnijim provedbama post-hoc testova (Tukeyev test) ispitane su razlike u vijabilnosti matičnih stanica osteosarkoma prilikom primjene kemoterapeutika između uzoraka P1, P2 i P3. Prilikom primjene doksorubicina u koncentraciji od 1 μM utvrđena je statistički značajna razlika između uzoraka P1 i P2. Navedeno ukazuje kako stanice uzorka P1 imaju veću vijabilnost u odnosu na one uzorka P2 nakon tretmana 1 μM doksorubicinom; isto se može primijetiti na fotografijama sferoida prikazanim na Slici 14 i Slici 17. Kod tretmana cisplatinom od 0,1 μM , 1 μM i 50 μM zamijećena je statistički značajna razlika između uzoraka P1 i P3 na način da stanice uzorka P3 imaju veću vijabilnost, gledajući fotografije sferoida na Slici 15 i Slici 21 može se primijetiti veći broj i veličina sferoida uzorka P3 pri ovim koncentracijama. Rezultati MTT testa upućuju i na statistički značajnu razliku između uzorka P1 i P2 pri koncentraciji cisplatine od 0,1 μM , no na fotografijama sferoida na Slici 15 i Slici 18 vidljiva je drastično veća količina sferoida kod uzorka P1. Ista situacije se može primijetiti gledajući tretman metotreksatom te fotografije sferoida na Slici 16, Slici 19 te Slici 22 na kojima je vidljiv veći broj sferoida kod uzoraka P1 i P3 u usporedbi s uzorkom P2. Također, rezultati MTT testa pokazuju statistički značajnu razliku između uzoraka P1 i P3 pri tretmanu metotreksatom od 1 μM , no gledajući fotografije sferoida na Slici 16 i Slici 19 ne može se primijetiti ta razlika.

Zbog duljine inkubacije u DMSO-u očitavanje je ponovljeno za CSC uzorke. Usporedbom utvrđenih rezultata prvog i drugog očitavanja utvrđeni su poprilično preklapajući rezultati, uz manje razlike prikazano na Slici 25.



Slika 24. Grafički prikaz vijabilnosti CSC osteosarkoma uzoraka P1, P2 i P3 tretiranih rastućim koncentracijama kemoterapeutika nakon prvog mjerenja (doxorubicin, cisplatin, metotreksat). (* $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .01$)



Slika 25. Grafički prikaz vijabilnosti CSC osteosarkoma uzoraka P1, P2 i P3 tretiranih rastućim koncentracijama kemoterapeutika nakon drugog mjerenja (doksorubicin, cisplatin, metotreksat). (* $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .01$)

5 Rasprava

Iz uzoraka biopsija osteosarkoma pri uspostavi dijagnoze (P1), iz uzorka uklonjenog tumora nakon prvog ciklusa kemoterapije (P2) te iz metastatskog uzorka nakon recidiva bolesti (P3) izolirali smo CSC, budući da su imale sposobnost rasta u ne-adherentnim uvjetima. Uzgojem stanica u ne-adherentnim uvjetima rezultati ovog istraživanja pokazali su prisutnost sferoida osteosarkoma u svim ispitivanim fazama bolesti, a time i prisutnost CSC. Rezultati se poklapaju s istraživanjima Fujii i sur. (2009) te Wang i sur. (2009) u kojima su koristeći istu metodu uspjeli izolirati CSC iz različitih uzoraka osteosarkoma. Nasađivanjem stanica u izrazito niskoj koncentraciji (10 st/ μ L) nije došlo do ravnomjernog razvoja sferoida zbog čega je za optimalnu koncentraciju nasađivanja odabrana koncentracija od 20 st/ μ L. Rezultati pokazuju najveću zastupljenost CSC kod uzorka P3 (0,95%), zatim kod uzorka P1 (0,63%) te naposljetku, CSC najmanji udio imaju u uzorku P2 (0,21%) (Slika 11). Rezultati pokazuju kako u svim fazama bolesti CSC čine malu populaciju stanica u usporedbi s ostatkom tumorske mase.

Uspoređujući rezultate ovoga istraživanja sa literaturnim podacima može se zabilježiti visoka stopa podudaranja u zastupljenosti CSC u uzorcima osteosarkoma. Primjerice, u istraživanju koje su proveli Gibbs i sur. (2005) u kojem su koristili 9 uzoraka osteosarkoma pacijenata starosti u rasponu od 11 do 34 godine (medijana starost, 12 godina) te staničnu liniju osteosarkoma MG 63, udio formiranih sferoida varirao je između 0,10 % i 1%.

Pad u udjelu CSC između uzorka P1 i P2 koji se pokazao statistički značajnim može biti uzrokovan djelovanjem prvog ciklusa terapije na udio CSC osjetljivih na terapiju. Nadalje, rast u udjelu CSC u uzorku P3 u usporedbi s uzorkom P2 koji se također pokazao statistički značajnim, ukazuje na ulogu CSC u povratku bolesti i stvaranja metastaza (Slika 11).

U drugom dijelu istraživanja za analizu rezultata mjerenja relativne duljine telomera koristili smo dvije stanične linije s dobro utvrđenim razlikama u duljini telomera, točnije staničnu liniju HeLa u kojoj su prisutne kratke telomere te staničnu liniju U-2 OS s prisutnim dugim telomerama. Dobiveni rezultati duljine telomera za ispitivane uzorke P1, P2 i P3 nalaze se u rasponu između dvije veličine telomera kod kontrolnih staničnih linija s tim da je za uzorak P1 zabilježena najveća, a za P3 najmanja duljina telomera (Slika 12). Usprkos tome, bitno je naglasiti da između ispitivanih uzoraka statističkom analizom nije pronađena statistički značajna razlika.

U svom istraživanju Kahl i sur. (2020) razvili su metodu apsolutne kvantifikacije duljine telomera te kroz istraživanje utvrdili pouzdanost metode s već ustaljenim metodama određivanja relativne duljine telomera uključujući i metodu relativne kvantifikacije pomoću qPCR-a s kojom je određena najveća korelacija ($R^2 = 0,93$), a koju smo također koristili u našem istraživanju. Odredili su da prosječna duljina telomera za staničnu liniju HeLa iznosi 4,55 kb (min: 0,96 kb; max: 14,29 kb) te 36,11 kb za staničnu liniju U-2 OS (min: 1,41 kb; max: 145,10 kb). Na temelju tih literaturnih podataka kao i rezultata našeg mjerenja normaliziranog prema staničnoj liniji HeLa, možemo procijeniti prosječne duljina telomera ispitivanih uzoraka. Na ovaj način dobivena je prosječna duljina telomera uzorka P1 koja iznosi 15,65 kb (min: 3,30 kb; max: 49,29 kb), uzorka P2 koja iznosi 7,05 kb (min: 1,49 ;max: 22,15 kb) te uzorka P3 koja iznosi 5,69 kb (min: 1,20 kb; max:17, 86 kb).

Nadalje, rezultati detekcije ekspresije telomeraze pokazali su se negativnima za sve ispitivane uzorke kao i za staničnu liniju U-2 OS, dok je za staničnu liniju HeLa detektirana ekspresija telomeraze (Tablica 5). Rezultati za kontrolne stanične linije se poklapaju s već utvrđenim literaturnim podacima prema kojima staničnu liniju HeLa karakteriziraju kratke telomere i aktivna telomeraza, a staničnu liniju U-2 OS duge telomere i manjak aktivnosti telomeraze, no aktivan mehanizam produljenja telomera ALT (Slika 13). Za razliku od većine karcinoma (85%) koji duljinu telomera održavaju uz pomoć telomeraze, kod osteosarkoma prevladavala mehanizam ALT (66%), utvrdili su Ulaner i sur. (2003) na temelju analize 61 uzorka osteosarkoma. Mogući uzrok toga manja je izmjena stanica u mezenhimskim tkivima što rezultira sporijim skraćivanjem telomera, a time i većom fiziološkom represijom ekspresije telomeraze, navode Henson i sur. (2002). Ovo upućuje na moguću aktivnost mehanizma ALT u našim uzorcima, no gledajući rezultate mjerenja duljine telomera možemo primijetiti da se ne poklapaju s uobičajenim fenotipom stanica u kojima je taj mehanizam zabilježen. Naime, takve stanice karakteriziraju izuzetno heterogene i produljene telomere što su utvrdili i Goncalves i sur. (2020) u svome istraživanju kada su kategorizirali 17 staničnih linija porijeklom iz osteosarkoma na temelju duljine telomera i prisutnosti određenog mehanizma produljivanja telomera, a utvrdili su kako sve stanične linije s prisutnim mehanizmom ALT imaju telomere koje sežu preko 24 kb u duljini, što je znatno dulje nego prosječna duljina telomera izmjerena u ovom istraživanju. Kako bismo sa sigurnošću mogli potvrditi prisutnost mehanizma ALT u našim uzorcima bilo bi potrebno daljnjim istraživanjima provesti test koji sa sigurnošću potvrđuje njegovu aktivnost kao što je primjerice tzv. test „C –

circle assay“, test koji provjerava prisutnost vankromosomskih kružnih DNA struktura koje nastaju kao nusprodukt mehanizma ALT.

Shodno tome, postavlja se pitanje je li moguće da u ispitivanim uzorcima nije prisutan aktivni mehanizam produljivanja telomera. Aktivacija jednog od mehanizama produljivanja telomera smatra se važnom, a često i nužnom, karakteristikom tumora koja omogućava neograničenu diobu, no Ulaner i sur. (2003) u svom istraživanju na 61 uzorku osteosarkoma pronašli su udio uzoraka (13%) u kojem nema aktivnog mehanizma produljenja telomera. Također, Barthel i sur. (2017) u analizi dostupnih genomskih podataka o preko 18 000 uzoraka tumora 31 vrste raka utvrdili su kako iznenađujuće visoki postotak (22%) tumora uključujući osteosarkome, nema aktivan mehanizam produljenja telomera. Moguće objašnjenje ovog fenomena jest da se telomeraza eksprimira, ali jednostavno u nedovoljnoj količini za detekciju, ili pak postojanje dodatnog mehanizma produljenja telomera koji bi mogao uključivati promjene u genima kao što su *RBI* i *TP53*, navode Barthel i sur. (2017). Također, Ulaner i sur. (2003) pretpostavljaju da je inicijacija tumora bez aktiviranih mehanizama produljenja telomera moguća, ali da je kroz progresiju tumorskim stanicama nužna za stvaranje metastaza. Postojanje uzorka primarnog osteosarkoma bez mehanizama produljenja telomera čiji metastatski uzorak se pokazao pozitivnim na prisustvo ALT mehanizma ide u korist ovoj tvrdnji. Ono što možemo sa sigurnošću ustanoviti je da su osteosarkomi s aktivnim mehanizmom produljivanja telomera agresivniji i dovode do lošije prognoze preživljenja pacijenta od osteosarkoma bez aktivne telomeraze ili mehanizma ALT, što potvrđuju Claude i Decittignies (2020) u pregledu dostupne literature na ovu temu za osteosarkome, kao i druge vrste raka.

U rezultatima analize vijabilnosti adherentnih stanica svih uzoraka možemo primijetiti kako je od svih korištenih kemoterapeutika najveći citotoksični učinak kod svih uzoraka (P1, P2 i P3) imao DOX. Nadalje, statistički značajne razlike u vijabilnosti stanica između uzoraka P1 i P2 te P1 i P3 ukazuju na manji citotoksični učinak DOXa pri dijagnozi bolesti u uzorku P1. Što se tiče CIS tretmana, svi uzorci pokazuju sličan odgovor te do značajnog pada u vijabilnosti stanica dolazi tek pri višim koncentracijama tretmana što ukazuje da tijekom progresije osteosarkoma tumorske stanice nisu poprimile mehanizam rezistencije na CIS. Smanjenje vijabilnosti svih uzoraka tretiranih kemoterapeutikom MET je nezamjetno što ukazuje na rezistenciju osteosarkoma na MET (Slika 23).

Na fotografijama sferoida primjećujemo najveći razvoj sferoida kod uzorka P3, a najmanji kod uzorka P2 (prikazano na slikama 17 – 23). Mogući razlog je odumiranje određenog udjela CSC osteosarkoma tijekom prvog ciklusa terapije, no ponovno povećanje udjela CSC u uzorku P3 upućuje na indukciju matičnosti u većem broju stanica kao odgovor na klasičnu kemoterapiju. Na tu osobinu osteosarkoma upozoravaju Martins-Neves i sur. (2016) u svom istraživanju u kojem predlažu aktivaciju signalnog puta Wnt/ β -katenin u odgovoru na kemoterapiju kao mehanizam aktivacije matičnosti te iz tog razloga naglašavaju nužnost ciljanih terapija za CSC uz konvencionalne kemoterapeutike. Na fotografijama sferoida uzorka P1 možemo primijetiti povećanje sferoida pri višim koncentracijama tretmana DOX (Slike 14 – 16), a zanimljivo je da je kod uzorka P3 upravo suprotna situacija (Slike 21 – 23). Također, DOX tretmani pokazali su se izuzetno učinkovitim na sferoide uzorka P2, a tretmani CIS i MET prikazali su značajan utjecaj samo na ovaj uzorak (Slike 17 – 19).

Uspoređujući rezultate testa MTT određenog tretmana s korelirajućom fotografijom ne možemo zamijetiti povezanost. Dok su oscilacije u vijabilnost stanica uzorka P1 koje sežu u negativne vrijednosti moguće uzrokovane citotoksičnim djelovanjem prevelike količine korištenog reagensa MTT, rezultati za uzorke P2 i P3 pri većini tretmana pokazuju razinu vijabilnosti stanica veću od kontrolnog tretmana (Slika 24 i Slika 25). U svom istraživanju Fujii i sur. (2009) pokazali su učinak tretmana DOX i CIS na adherentnim stanicama staničnih linija MG63 i HTB166 uspoređan našim dobivenim rezultatima uz iznimku povećanog učinka DOX tretmana na uzorke P2 i P3, također pokazali su kako učinak tih istih tretmana na sferoide ovih staničnih linija ima minimalan utjecaj.

Promjena karakteristika osteosarkoma povezana s rezistencijom na kemoterapeutike i metastatskim potencijalom tijekom progresije bolesti usko je povezana s osobinama i udjelom CSC u tumoru, zbog čega je tijekom liječenja bitno praćenje ovih parametara kako bi se terapija mogla primjereno prilagoditi. Najčešći prvi korak liječenja nakon dijagnoze osteosarkoma je konvencionalna kemoterapija s tri kemoterapeutika (doksorubicin, cisplatina, metotreksat). Trenutačno ovakva terapija još uvijek rezultira najvećom stopom preživljenja pacijenata, no ne smije se zanemariti utjecaj ovakve terapije na obogaćivanje tumorske mase s CSC što gledajući širu sliku može rezultirati agresivnijim tumorom te povećanjem šanse za njegov povratak u slučaju remisije bolesti. Rješenje za ovaj problem je korištenje ciljanih terapija za CSC u kombinaciji sa konvencionalnom terapijom, no sama detekcija prisustva CSC pri dijagnozi pacijenta nije dovoljna u otkrivanju

točnih mehanizama rezistencije koji su aktivni, ali je dovoljna za prognoziranje agresivnosti tumora, na temelju čega se može prilagoditi i agresivnost terapije. Detaljna analiza mehanizama rezistencije za pojedinog pacijenta zahtjeva veću količinu potrošenih resursa što ovakve terapije čini skupljima, a samim time i nedostupnima većem broju pacijenata. Kako bi ciljane terapije postale efikasnije i dostupnije većem broju pacijenata potreban je razvitak efikasnijih metoda detekcije mehanizama rezistencije na kemoterapeutike. Analiza mehanizama produljenja telomera relativno je brza i efikasna tehnika koja daje informaciju o prisutnosti određenog mehanizma produljenja telomera (aktivna telomeraza ili mehanizam ALT), te iako još nije dokazana razlika u utjecaju na slijed terapije između ova dva mehanizma, utvrđeno je kako manjak aktivacije ovih mehanizama ima pozitivan utjecaj na preživljenje pacijenata što čini inhibiciju ovih mehanizama dobrom metodom ciljane terapije.

6 Zaključak

Na uzorcima osteosarkom jednog pacijenta iz tri različite faze bolesti (dijagnoza, nakon terapije i nakon povrata bolesti) proučene su karakteristike tumora – metastatski potencijal, prisutnost telomeraze i osjetljivost na kemoterapeutike. Rezultati su pokazali kako su se ispitivane karakteristike CSC ovog osteosarkoma mijenjale tijekom progresije bolesti:

- došlo je do pada metastatskog potencijala nakon prvog ciklusa kemoterapije, no dogodio se ponovni porast nakon povratka bolesti
- relativna duljina telomera opada tijekom progresije bolesti, a aktivnost telomeraze nije detektirana u uzorcima što upućuje na moguću aktivnost mehanizma ALT
- najbolji citotoksični učinak na stanice ispitivanog osteosarkoma ima doksorubicin; cisplatina tek pri većim koncentracija dok metotreksat nema citotoksični učinak. Ne može se primijetiti zajednički obrazac razlike u učinku tijekom progresije bolesti.

Na temelju ovih rezultata možemo potvrditi dio hipoteze prema kojem primjena kemoterapije utječe na evoluciju osteosarkoma tako što postaje agresivniji, no ne možemo sa sigurnošću potvrditi je li postaje otporniji na kemoterapeutike.

7 Literatura

Abarrategi, A., Tornin, J., Martinez-Cruzado, L., Hamilton, A., Martinez-Campos, E., Rodrigo, J. P., González, M.V., Baldini, N., Garcia-Castro, J., & Rodriguez, R. (2016). Osteosarcoma: cells-of-origin, cancer stem cells, and targeted therapies. *Stem Cells International*, 2016(1), 3631764.

Alfranca, A., Martinez-Cruzado, L., Tornin, J., Abarrategi, A., Amaral, T., de Alava, E., Menendez, P., Garcia-Castro, J., & Rodriguez, R. (2015). Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72, 3097-3113.

Barthel, F. P., Wei, W., Tang, M., Martinez-Ledesma, E., Hu, X., Amin, S. B., Akdemir, K.C., Seth, S., Song, X., Wang, Q., Lichtenberg, T., Hu, J., Zhang, J., Zheng, S., & Verhaak, R. G. (2017). Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nature Genetics*, 49(3), 349-357.

Bieging, K. T., Mello, S. S., & Attardi, L. D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature Reviews Cancer*, 14(5), 359-370.

Boyce, B. F., & Xing, L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473(2), 139-146.

Brown, A., Kumar, S., & Tchounwou, P. B. (2019). Cisplatin-based chemotherapy of human cancers. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 11(4).

Broadhead, M. L., Clark, J. C., Myers, D. E., Dass, C. R., & Choong, P. F. (2011). The molecular pathogenesis of osteosarcoma: a review. *Sarcoma*, 2011(1), 959248.

Claude, E., & Decottignies, A. (2020). Telomere maintenance mechanisms in cancer: telomerase, ALT or lack thereof. *Current Opinion in Genetics & Development*, 60, 1-8.

Compton, C. (2020). *Cancer: The Enemy from Within: A Comprehensive Textbook of Cancer's Causes, Complexities and Consequences*. Springer Nature.

Czarnecka, A. M., Synoradzki, K., Firlej, W., Bartnik, E., Sobczuk, P., Fiedorowicz, M., M., Grieb, P., & Rutkowski, P. (2020). Molecular biology of osteosarcoma. *Cancers*, 12(8), 2130.

de Azevedo, J. W. V., Fernandes, T. A. A. D. M., Fernandes, J. V., de Azevedo, J. C. V., Lanza, D. C. F., Bezerra, C. M., Andrade, V.S., & de Araújo, J. M. G. (2020). Biology and pathogenesis of human osteosarcoma. *Oncology Letters*, 19(2), 1099-1116.

Endo-Munoz, L., Evdokiou, A., & Saunders, N. A. (2012). The role of osteoclasts and tumour-associated macrophages in osteosarcoma metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1826(2), 434-442.

Fanelli, M., Tavanti, E., Patrizio, M. P., Vella, S., Fernandez-Ramos, A., Magagnoli, F., Luppi, S., Hattinger, C.M. & Serra, M. (2020). Cisplatin resistance in osteosarcoma: in vitro validation of candidate DNA repair-related therapeutic targets and drugs for tailored treatments. *Frontiers in Oncology*, 10, 331.

Faubert, B., Solmonson, A., & DeBerardinis, R. J. (2020). Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science*, 368(6487), eaaw5473.

Fujii, H., Honoki, K., Tsujiuchi, T., Kido, A., Yoshitani, K., & Takakura, Y. (2009). Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. *International Journal of Oncology*, 34(5), 1381-1386.

Garcia-Ortega, D. Y., Cabrera-Nieto, S. A., Caro-Sánchez, H. S., & Cruz-Ramos, M. (2022). An overview of resistance to chemotherapy in osteosarcoma and future perspectives. *Cancer Drug Resistance*, 5(3), 762.

Ghanim, G. E., Fountain, A. J., Van Roon, A. M. M., Rangan, R., Das, R., Collins, K., & Nguyen, T. H. D. (2021). Structure of human telomerase holoenzyme with bound telomeric DNA. *Nature*, 593(7859), 449-453.

Gianferante, D. M., Mirabello, L., & Savage, S. A. (2017). Germline and somatic genetics of osteosarcoma—connecting aetiology, biology and therapy. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(8), 480-491.

Gibbs, C. P., Kukekov, V. G., Reith, J. D., Tchigrinova, O., Suslov, O. N., Scott, E. W., Ghivizzani, S.C., Ignatova, T.N., & Steindler, D. A. (2005). Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia*, 7(11), 967-976.

Goncalves, T., Zoumpoulidou, G., Alvarez-Mendoza, C., Mancusi, C., Collopy, L. C., Strauss, S. J., Mittnacht, S., & Tomita, K. (2020). Selective elimination of osteosarcoma cell lines with short telomeres by ataxia telangiectasia and Rad3-related inhibitors. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 3(6), 1253-1264.

Guo, Y. S., Zhao, R., Ma, J., Cui, W., Sun, Z., Gao, B., He, S., Han, Y. H., Fan, J., Yang, L., Tang, J., & Luo, Z. J. (2014). β ig-h3 promotes human osteosarcoma cells metastasis by interacting with integrin $\alpha 2\beta 1$ and activating PI3K signaling pathway. *PLoS One*, 9(3), e90220.

Guo, W., Healey, J. H., Meyers, P. A., Ladanyi, M., Huvos, A. G., Bertino, J. R., & Gorlick, R. (1999). Mechanisms of methotrexate resistance in osteosarcoma. *Clinical Cancer Research*, 5(3), 621-627.

Han, J., Menicanin, D., Gronthos, S., & Bartold, P. M. (2014). Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Australian Dental Journal*, 59, 117-130.

Haydon, R. C., Luu, H. H., & He, T. C. (2007). Osteosarcoma and osteoblastic differentiation: a new perspective on oncogenesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 454, 237-246.

Henson, J. D., Neumann, A. A., Yeager, T. R., & Reddel, R. R. (2002). Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene*, 21(4), 598-610.

Hill, B. T. (2019). Etiology of cancer. *Clinical Ophthalmic Oncology: Basic Principles*, 11-17.

Jones, K. B. (2011). Osteosarcomagenesis: modeling cancer initiation in the mouse. *Sarcoma*, 2011(1), 694136.

Ju, Z., & Rudolph, K. L. (2006). Telomeres and telomerase in cancer stem cells. *European Journal of Cancer*, 42(9), 1197-1203.

Kahl, V. F., Allen, J. A., Nelson, C. B., Sobinoff, A. P., Lee, M., Kilo, T., T., Vasireddy, R. S., & Pickett, H. A. (2020). Telomere length measurement by molecular combing. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 493.

- Keizer, H. G., Pinedo, H. M., Schuurhuis, G. J., & Joenje, H. (1990). Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 47(2), 219-231.
- Kuhn, N. Z., & Tuan, R. S. (2010). Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *Journal of Cellular Physiology*, 222(2), 268-277.
- Kundu, Z. S. (2014). Classification, imaging, biopsy and staging of osteosarcoma. *Indian Journal of Orthopaedics*, 48(3), 238-246.
- Kyo, S., & Inoue, M. (2002). Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: how can we apply them for cancer therapy?. *Oncogene*, 21(4), 688-697.
- Lindsey, B. A., Markel, J. E., & Kleinerman, E. S. (2017). Osteosarcoma overview. *Rheumatology and Therapy*, 4, 25-43.
- Martens, A., Schmid, B., Akintola, O., & Saretzki, G. (2019). Telomerase does not improve DNA repair in mitochondria upon stress but increases MnSOD protein under serum-free conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 27.
- Martins-Neves, S. R., Lopes, Á. O., Do Carmo, A., 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, 1-16.
- Mason-Osann, E., Dai, A., Floro, J., Lock, Y. J., Reiss, M., Gali, H., Matschulat, A., Labadorf, A., & Flynn, R. L. (2018). Identification of a novel gene fusion in ALT positive osteosarcoma. *Oncotarget*, 9(67), 32868.
- Meng, Z., Moroishi, T., & Guan, K. L. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & Development*, 30(1), 1-17.
- Mikkelsen, T. S., Thorn, C. F., Yang, J. J., Ulrich, C. M., French, D., Zaza, G., Dunnenberger, H. M., Marsh, S., McLeod, H. L., Giacomini, K., Becker, M. L., Gaedigk, R., Leeder, J. S., Kager, L., Relling, M. V., Evans, W., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). PharmGKB summary: methotrexate pathway. *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(10), 679-686.

Mutsaers, A. J., & Walkley, C. R. (2014). Cells of origin in osteosarcoma: mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells?. *Bone*, 62, 56-63.

Odri, G. A., Tchicaya-Bouanga, J., Yoon, D. J. Y., & Modrowski, D. (2022). Metastatic progression of osteosarcomas: a review of current knowledge of environmental versus oncogenic drivers. *Cancers*, 14(2), 360.

Ottaviani, G., & Jaffe, N. (2010). The etiology of osteosarcoma. *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*, 15-32.

Ragland, B. D., Bell, W. C., Lopez, R. R., & Siegal, G. P. (2002). Cytogenetics and molecular biology of osteosarcoma. *Laboratory Investigation*, 82(4), 365-373.

Ralston, S. H. (2013). Paget's disease of bone. *New England Journal of Medicine*, 368(7), 644-650.

Reddel, R. R. (2003). Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer. *Cancer Letters*, 194(2), 155-162.

Rickel, K., Fang, F., & Tao, J. (2017). Molecular genetics of osteosarcoma. *Bone*, 102, 69-79.

Robinson, N. J., & Schiemann, W. P. (2022). Telomerase in cancer: function, regulation, and clinical translation. *Cancers*, 14(3), 808.

Roguljić, H. (2016). ODREĐIVANJE PROGENITORNOG SVOJSTVA PERIVASKULARNIH STANICA KARAKTERIZIRANIH IN VIVO IZRAŽAJEM ALFA-GLATKOMIŠIĆNOG AKTINSKOG PROMOTORA-CRE REKOMBINAZE (Doctoral dissertation, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. Faculty of Medicine).

Rubio, R., Abarrategi, A., Garcia-Castro, J., Martinez-Cruzado, L., Suarez, C., Tornin, J., J., Santos, L., Astudillo, A., Colmenero, I., Mulero, F., Rosu-Myles, M., Menendez, P., & Rodriguez, R. (2014). Bone environment is essential for osteosarcoma development from transformed mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 32(5), 1136-1148.

Savage, S. A., Stewart, B. J., Liao, J. S., Helman, L. J., & Chanock, S. J. (2005). Telomere stability genes are not mutated in osteosarcoma cell lines. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 160(1), 79-81.

Schiavone, K., Garnier, D., Heymann, M. F., & Heymann, D. (2019). The heterogeneity of osteosarcoma: the role played by cancer stem cells. *Stem Cells Heterogeneity in Cancer*, 187-200.

Sotillo-Piñeiro, E., Sierrasesúmaga, L., & Patiño-García, A. (2004). Telomerase activity and telomere length in primary and metastatic tumors from pediatric bone cancer patients. *Pediatric Research*, 55(2), 231-235.

Sritharan, S., & Sivalingam, N. (2021). A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. *Life Sciences*, 278, 119527.

Tomasetti, C., Li, L., & Vogelstein, B. (2017). Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*, 355(6331), 1330-1334.

Ulaner, G. A., Huang, H. Y., Otero, J., Zhao, Z., Ben-Porat, L., Satagopan, J. M., J. M., Gorlick, R., Meyers, P., Healey, J. H., Huvos, A. G., Hoffman, A. R., & Ladanyi, M. (2003). Absence of a telomere maintenance mechanism as a favorable prognostic factor in patients with osteosarcoma. *Cancer Research*, 63(8), 1759-1763.

Velletri, T., Xie, N., Wang, Y., Huang, Y., Yang, Q., Chen, X., Q., Shou, P., Gan, Y., Cao, G., Melino, G., & Shi, Y. (2016). P53 functional abnormality in mesenchymal stem cells promotes osteosarcoma development. *Cell Death & Disease*, 7(1), e2015-e2015.

Wang, L., Park, P., & Lin, C. Y. (2009). Characterization of stem cell attributes in human osteosarcoma cell lines. *Cancer Biology & Therapy*, 8(6), 543-552.

Watt, F. M., & Hogan, A. B. L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*, 287(5457), 1427-1430.

Xu, Q., Gao, T., Zhang, B., Zeng, J., & Dai, M. (2019). Primary osteosarcoma in elderly patients: a report of three cases. *Oncology Letters*, 18(2), 990-996.

Yang, G., Yuan, J., & Li, K. (2013). EMT transcription factors: implication in osteosarcoma. *Medical Oncology*, 30, 1-5.

Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2009). Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 5(3), 237-241.

Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 1-22.

Zeng, W., Wan, R., Zheng, Y., Singh, S. R., & Wei, Y. (2011). Hypoxia, stem cells and bone tumor. *Cancer Letters*, 313(2), 129-136.

Životopis

Rođen sam 2000. godine u Zadru gdje sam i završio Prirodoslovno-matematičku gimnaziju Jurja Barakovića. Upisao sam preddiplomski sveučilišni studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu 2018. godine i završio ga 2021. kada sam na istom fakultetu upisao Sveučilišni diplomski studij Eksperimentalne biologije modul Fiziologija i imunobiologija koji završavam ovim diplomskim radom. Tijekom studiranja bio sam član Udruge studenata biologije BIUS. Za vrijeme prve godine studiranja primao sam državnu stipendiju u STEM područjima znanosti, dok sam za vrijeme ostalih godina studiranja primao stipendiju grada Zadra. Tečno pričam i razumijem engleski jezik, a za vrijeme srednjoškolskog obrazovanja stekao sam i osnovno poznavanje talijanskog jezika. Kroz izradu ovog diplomskog rada stekao sam korisno znanje rada u laboratoriju.