

Učinci askorbinske kiseline na metabolizam matičnih stanica osteosarkoma uzgojenih iz uzoraka tumorskih tkiva bolesnika

Šimić Jovičić, Marijana

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:450279>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-28**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Marijana Šimić Jovičić

**Učinci askorbinske kiseline na
metabolizam matičnih stanica
osteosarkoma uzgojenih iz uzoraka
tumorskih tkiva bolesnika**

DISERTACIJA



Zagreb, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Marijana Šimić Jovičić

**Učinci askorbinske kiseline na
metabolizam matičnih stanica
osteosarkoma uzgojenih iz uzoraka
tumorskih tkiva bolesnika**

DISERTACIJA

Zagreb, 2024.

Eksperimentalni dio ovog rada je izrađen u Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Institutu Ruđer Bošković i Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci.

Uzorci su prikupljeni u Klinici za dječje bolesti Zagreb.

Voditelji rada su prof. dr. sc. Vladimir Trkulja, dr. med. (Zavod za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu) i izv. prof. dr. sc. Inga Urlić, mag. mol. biol. (Zavod za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu).

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja znanstvenog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva.

Zahvaljujem mentoru profesoru Vladimiru Trkulji i sumentorici profesorici Ingi Urlić na vođenju i pomoći prilikom izrade disertacije.

Zahvaljujem djelatnicima Zavoda za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu na velikoj pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela istraživanja: Maji Antunović, Maji Ledinski, Maji Pušić, Katarini Caput Mihalić, Luciji Librenjak i Karli Ostojić.

Zahvaljujem svim djelatnicima Odjela za dječju ortopediju Klinike za dječje bolesti Zagreb.

Zahvaljujem svojoj obitelji na stalnoj potpori.

Zahvaljujem Bogu na svima gore navedenima.

SADRŽAJ

I POPIS KRATICA

1. UVOD.....	1
1.1. Osteosarkom.....	1
1.2. Matične stanice osteosarkoma.....	7
1.2.1. Stanična teorija tumorigeneze osteosarkoma.....	7
1.2.2. Fenotipska obilježja matičnih stanica osteosarkoma.....	10
1.2.3. Niša tumorskih matičnih stanica.....	13
1.3. Metabolizam osteosarkoma.....	16
1.3.1. Oksidacijska fosforilacija.....	16
1.3.2. Glikoliza.....	18
1.3.3. Warburgov učinak.....	20
1.3.4. Metabolizam matičnih stanica osteosarkoma.....	20
1.4. Askorbinska kiselina i tumorske stanice.....	22
1.4.1. Vitamin C.....	22
1.4.2. Askorbinska kiselina kao antioksidacijsko sredstvo.....	23
1.4.3. Askorbinska kiselina kao protutumorsko sredstvo.....	24
1.4.4. Utjecaj askorbinske kiseline na matične stanice osteosarkoma.....	26
2. HIPOTEZA.....	27
3. CILJEVI RADA.....	28
4. MATERIJALI I METODE.....	29
4.1. Opći aspekti istraživanja.....	29
4.2. Uzorkovanje tumorskih tkiva za istraživanje	29
4.3. Izolacija parentalnih stanica osteosarkoma.....	30
4.4. Uzgoj sarkosfera	31
4.5. Izolacija sarkosfera i uzgoj dviju generacija matičnih stanica osteosarkoma.....	32

4.6. Test izbacivanja boje Hoechst 33342.....	33
4.7. MTT test vijabilnosti stanica.....	35
4.8. Mjerenje razine reaktivnih kisikovih vrsta.....	36
4.9. Western blot analiza prisutnosti gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH)	37
4.9.1. Citoliza i izolacija proteina.....	37
4.9.2. Određivanje koncentracije proteina korištenjem bicinkoninične kiseline.....	38
4.9.3. Razdvajanje proteina natrij dodecil sulfat - poliamidakril gel elektroforezom (SDS-PAGE).....	39
4.9.4. Prijenos proteina na membranu.....	40
4.10. Određivanje vrste stanične smrti uzrokovane askorbinskom kiselinom pomoću protočnog citometra.....	42
4.11. Određivanje metaboličkog profila stanica pomoću uređaja Seahorse XF.....	44
4.11.1. Određivanje vrste staničnog metabolizma.....	47
4.11.2. Ispitivanje učinka askorbinske kiseline na stanični metabolizam	49
5. REZULTATI.....	50
5.1. Procjena matičnosti stanica izoliranih iz uzoraka tumorskih tkiva	50
5.1.1. Formiranje sarkosfera.....	50
5.1.2. Formiranje jednog sloja tumorskih matičnih stanica	51
5.1.3. Izbacivanje boje Hoechst 33342.....	52
5.2. Učinak askorbinske kiseline na vijabilnost stanica.....	53
5.3. Učinak askorbinske kiseline na redoks stanje matičnih stanica osteosarkoma	57
5.4. Prisutnost gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) u matičnim stanicama osteosarkoma.....	58
5.5. Vrsta stanične smrti uzrokovana askorbinskom kiselinom.....	59

5.6. Metabolički profil stanica i učinak askorbinske kiseline na stanični metabolizam	61
6. RASPRAVA.....	70
7. ZAKLJUČAK.....	78
8. SAŽETAK	79
9. SUMMARY.....	80
10. POPIS LITERATURE.....	81
11. KRATKA BIOGRAFIJA.....	93

PRILOG I

PRILOG II

PRILOG III

PRILOG IV

I POPIS KRATICA

2-DG	2-deoksi-D-glukoza
ABCG2	ABC transporter 2 iz obitelji transportera G (engl. <i>ATP-binding cassette super-family G member 2</i>)
ADP	adenozin difosfat
aFGF	kiseli čimbenik rasta fibroblasta (engl. <i>acidic fibroblast growth factor</i>)
AK	askorbinska kiselina
ALDH-1	aldehid dehidrogenaza-1
ALP	alkalna fosfataza
Asc-2P	2-fosfat L-askorbinske kiseline
ATP	adenozin trifosfat
BCA	bicinkoninična kiselina
bFGF	bazični čimbenik rasta fibroblasta (engl. <i>basic fibroblast growth factor</i>)
CAF	tumoru pridruženi fibroblasti (engl. <i>cancer associated fibroblasts</i>)
CD44	biljeg mezenhimskih matičnih stanica i regulator njihovog metastaziranja
CD105	dio receptora za TGF- β , uglavnom izražen na endotelnim stanicama
CD117	receptor čimbenika rasta matičnih stanica
CD133	biljeg tumorskih matičnih stanica
CD271	receptor niskog afiniteta za čimbenik rasta neuralnog grebena i biljeg matičnih stanica mozga
CM	kolagenazni medij (engl. <i>collagenase medium</i>)
CSCs	mezenhimske matične stanice (engl. <i>cancer stem cells</i>)
DCFH-DA	2', 7'-diklorofluorescein – diacetat
DHA	dehidroaskorbinska kiselina

DMSO	dimetil-sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
ECAR	stopa ekstracelularnog zakiseljavanja (engl. <i>extracellular acidification rate</i>)
EGF	epidermalni čimbenik rasta (engl. <i>epidermal growth factor</i>)
EMS	embrionalne matične stanice
engl.	engleski jezik
FBS	goveđi fetalni serum (engl. <i>fetal bovine serum</i>)
FCCP	karbonil cijanid-4-trifluorometoksi-fenilhidrazon
FGF	čimbenik rasta fibroblasta (engl. <i>fibroblast growth factor</i>)
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GLUT	transporter za glukozu
GM	hranjivi medij (engl. <i>growth medium</i>)
GSH	reducirani oblik glutationa
GSSG	oksidirani oblik glutationa (glutation disulfid)
G292	stanična linija osteosarkoma G292
HE	hemalaun i eozin
HEK 293	stanična linija HEK 293 (engl. <i>human embryonic kidney 293 cells</i>)
HGF	čimbenik rasta hepatocita (engl. <i>hepatocyte growth factor</i>)
HIF	čimbenik induciran hipoksijom (engl. <i>hypoxia inducible factor</i>)
KS-MMS	mezenhimske matične stanice iz koštane srži
LDH	laktat dehidrogenaza
MAPK	proteinska kinaza aktivirana mitogenom (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MC	metil celuloza

MDR/ABC	ABC transporteri za višestruku otpornost na lijekove (engl. <i>multidrug resistance transporters / ATP-binding cassette</i>)
MG-63	stanična linija osteosarkoma MG-63
MHC	glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MMS	mezenhimske matične stanice
MNNG/HOS	stanična linija osteosarkoma MNNG/HOS
MSCs	mezenhimske matične stanice (engl. <i>mesenchymal stem cells</i>)
MTT	tetrazolijeva sol
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
OCR	stopa potrošnje kisika (engl. <i>oxygen consumption rate</i>)
Oct-3	čimbenik transkripcije koji veže oktamer 3
Oct-4	čimbenik transkripcije koji veže oktamer 4
OS	osteosarkom
OST-1-PF	stanična linija osteosarkoma OST-1-PF
OS-TMS	matična stanica osteosarkoma
PAGE	poliamidakril gel elektroforeza
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffer saline</i>)
PD-1	čimbenik programirane smrti 1 (engl. <i>programmed death 1</i>)
PD-L1	ligand za čimbenik programirane smrti 1 (engl. <i>programmed death ligand 1</i>)
Pen/Strep	penicilin/streptomycin
RFU	relativne jedinice fluorescencije (engl. <i>relative fluorescence units</i>)
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
Saos-2	stanična linija osteosarkoma Saos-2
SATB2	DNA vezujući protein (engl. <i>special AT-rich sequence-binding protein 2</i>)

Sca-1	antigen 1 matičnih stanica (engl. <i>stem cell antigen 1</i>)
SCF	čimbenik matičnih stanica (engl. <i>stem cell factor</i>)
SDS	natrij dodecil sulfat
SGM	medij za uzgoj sarkosfera (engl. <i>sarcosphere growth medium</i>)
Sox2	transkripcijski čimbenik Sox2 (engl. <i>SRY-box transcription factor 2</i>)
SP	tzv. „ <i>side population</i> “ stanice
Stro-1	biljeg mezenhimskih matičnih stanica Stro-1
SVCT	transporter za vitamin C ovisan o natriju (engl. <i>sodium-dependent vitamin C transporter</i>)
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TAM	tumoru pridruženi makrofazi (engl. <i>tumor-associated macrophages</i>)
TGF-α	transformirajući čimbenik rasta alfa (engl. <i>transforming growth factor alfa</i>)
TGF-β	transformirajući čimbenik rasta beta (engl. <i>transforming growth factor beta</i>)
TMS	tumorske matične stanice
U2OS	stanična linija ostesarkoma U2OS
VEGF	čimbenik rasta vaskularnog endotela (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)

1. UVOD

1.1. OSTEOSARKOM

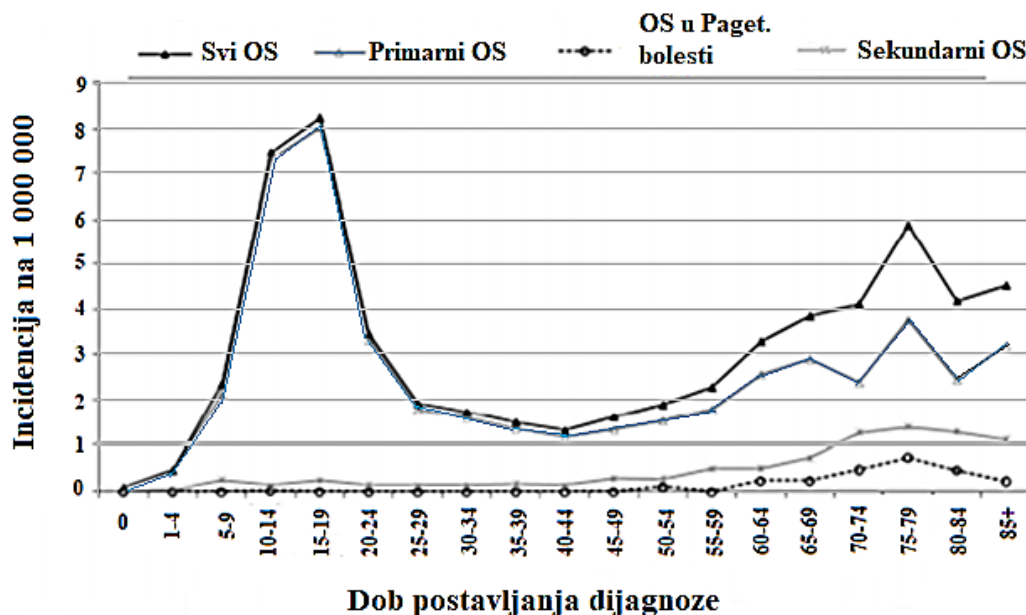
Osteosarkom je maligni mezenhimski tumor čije stanice proizvode osteoid – nemineralizirani koštani matriks. Prema klasifikaciji tumora mekih tkiva i kostiju koju izdaje Svjetska zdravstvena organizacija (SZO), postoji više vrsta osteosarkoma različitog stupnja malignosti (tablica 1).

Tablica 1. Klasifikacija osteosarkoma prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji. *Prilagođeno prema Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn P, Mertens F. WHO Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. Lyon: IARC press; 2013.*

NAZIV TUMORA	PORIJEKLO	STUPANJ MALIGNOSTI
KONVENCIONALNI OSTEOSARKOM	Kost	Visoki
TELEANGIEKTATSKI OSTEOSARKOM	Kost	Visoki
OSTEOSARKOM MALIH STANICA	Kost	Visoki
CENTRALNI OSTEOSARKOM NISKOGRADUSA	Kost	Niski
PAROSALNI OSTEOSARKOM	Kost	Niski
PERIOSTALNI OSTEOSARKOM	Kost	Srednji
POVRŠINSKI OSTEOSARKOM VISOKOG STUPNJA MALIGNOSTI	Kost	Visoki
EKSTRAOSALNI OSTEOSARKOM	Meka tkiva	Visoki

Predmet ovog istraživanja je konvencionalni (klasični) osteosarkom (OS) koji, prema SZO, obuhvaća i sekundarne osteosarkome. Sekundarni osteosarkomi mogu nastati u kostima zahvaćenima Pagetovom ili nekom drugom bolešću, primjerice fibroznom displazijom (osteosarkomi povezani s drugim bolestima i stanjima), te u kostima koje su prethodno bile uredne ili su imale neku benignu promjenu, ali su bile izložene radioterapiji zbog nekog drugog malignog tumora u tijelu (postradijacijski osteosarkom) (1).

Epidemiologija: OS je najčešći primarni nehematopoetski maligni tumor kostiju s incidencijom 4 - 5 : 1 000 000, na kojega otpada oko 35% svih primarnih malignih tumora kostiju. Ima bimodalnu dobnu raspodjelu (slika 1). Najčešći je primarni maligni mezenhimski tumor djece i adolescenata te u toj dobnoj skupini čini oko 80% svih malignih tumora kostiju. Iznad pedesete godine života, OS čini oko 50% svih primarnih malignih tumora kostiju, s većim udjelom sekundarnog OS, te je na drugom mjestu u ukupnom udjelu primarnih malignih tumora kostiju u ovoj dobnoj skupini (1, 2).



Slika 1. Bimodalna dobna raspodjela osteosarkoma. Prilagođeno prema Mirabello L, Troisi JR, Savage AS. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: Data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer*. 2009;115(7):1531–43. Slika 1, Osteosarcoma (OS) incidence by disease sequence based on the Surveillance, Epidemiology, and End Results 9 data-base, 1973 to 2004; str. 1533.

Etiologija: OS se najčešće javlja bez nekog jasnog uzroka te kao i ostali maligni mezenhimski tumori, uglavnom nastaje *de novo*. Za mali udio OS se zna da mogu nastati na osnovi prekursorskih lezija. Primjeri prekursorskih lezija za nastanak OS su Pagetova bolest, fibrozna displazija, kronični osteomijelitis te oštećenja kosti uzrokovana ionizacijskim zračenjem i dugotrajnom prisutnošću metalnih implantata. Nadalje, OS se češće javlja kod osoba sa sindromima koje obilježava sklonost razvoju tumora već u mlađoj životnoj dobi kao što su obiteljska pojava retinoblastoma i Li-Fraumenijev sindrom (3). Genska podloga ovih sindroma je poznata, ali to tek manjim dijelom rasvjetljava gensku etiologiju OS. U većini slučajeva, genska i epigenetska podloga OS nisu poznate.

Genom: Za razliku od nekih tumora koji imaju specifične promjene genoma, sekvenciranje genoma OS pokazuje njegov složeni kariotip s izraženom genomskom varijabilnošću (4).

Predilekcijska mjesta: Konvencionalni OS se svrstava u centralne osteosarkome jer započinje rast iz medule kosti, pa oko 91% njih raste iz metafize, a oko 9% iz dijafize i epifize. U mlađoj životnoj dobi najčešće su zahvaćene duge kosti, obično distalni okrajak femura te proksimalni okrajak tibije i humerusa, a u starijoj životnoj dobi najčešće su zahvaćene kosti aksijalnog skeleta. Jedna kost može imati u isto vrijeme više primarnih lezija koje nisu međusobno povezane, što je odraz ili multicentričnosti (tumor nastao u isto vrijeme na različitim mjestima u kosti) ili metastaza (engl. *skip metastasis*) (5).

Klinička slika: U ranoj fazi bolesti klinička slika je nespecifična. Simptomi traju od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci, a sumnju na tumorsku bolest mogu pobuditi sljedeći simptomi: bol, oteklina, deformacija i smanjena funkcija zahvaćenog dijela tijela, ograničena pokretljivost zgloba u blizini tumora, subfebrilitet, opća slabost i gubitak tjelesne težine. Bol je duboka i probadajuća, u početku se javlja povremeno, može biti prisutna u mirovanju i / ili aktivnosti, a intenzitet joj se s vremenom pojačava. Znak koji najviše pobuđuje sumnju na tumor je noćna bol koja ometa san i uvijek je prisutna na istom mjestu, a doživljava se intenzivnije noću vjerojatno jer nema dnevnih aktivnosti koje bi odvlačile pažnju. Jedan od mogućih razloga pojave noćne boli kod djece s OS je pojačano lučenje hormona rasta noću koji utječe na rast tumorskih stanica. Noćna bol je važan, ali nespecifičan klinički znak. Tumorska masa smještena u kralježnici može pritiskati korijen živca i oponašati radikulopatije uzrokovane degenerativnim promjenama, a tumor područja kuka može uzrokovati bol koja se projicira u koljeno. Naglo pojačanje boli može upućivati na krvarenje u tumoru ili na patološki prijelom. Oteklina kod OS se brzo povećava, a ako je tumorska masa veća, venski crtež kože postaje izraženiji zbog sprječavanja otjecanja venske krvi. U uznapredovalim slučajevima tumorska masa može egzulcerirati. Asimetrični deformiteti osovine ekstremiteta kod djece nastaju ako tumor zahvati ploču rasta kosti (5, 6).

Laboratorijska dijagnostika: Alkalna fosfataza (ALP) i laktat dehidrogenaza (LDH) mogu biti povišene u serumu i upućivati da je razgradnja kosti mogući razlog tih povišenih vrijednosti. Navedeni laboratorijski pokazatelji se ne koriste u probiru koštanih tumora jer su nespecifični, ali mogu biti korisni u praćenju već otkrivenog tumora. Tumorski biljezi za sada nisu u kliničkoj uporabi kad je riječ o OS (5, 6).

Makroskopski izgled: Osim intraosalne sastavnice, može se uočiti i mekotkivna tumorska masa koja odiže periost i okolna meka tkiva, ali ona uglavnom ostaje dugo unutar periosta. Periost reagira po tipovima koji ukazuju na agresivno biološko ponašanje podležeće tvorbe. Veća tumorska masa može probiti periost. Ponekad tumor može prijeći kroz ploču rasta u epifizu. Tumorska masa je mjestimično mekše konzistencije, sastavljena od područja nekrotičnog i vijabilnog tumorskog tkiva, degenerativnih cisti ispunjenih bistrim ili krvavim sadržajem te ugrušcima krvi, a mjestimično je tvrđe konzistencije zbog skleroze, hrskavičnog ili koštanog matriksa i kalcifikata (slika 2). Veličina i konzistencija tumorske mase u vrijeme otkrivanja tumora i nakon provedene neoadjuvantne kemoterapije uglavnom se razlikuju (5, 6).

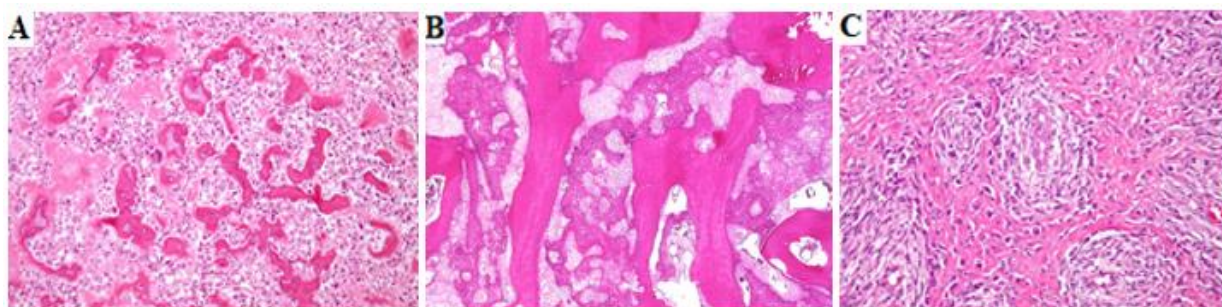


Slika 2. Intraoperativno snimljena fotografija u bloku reseciranoga osteosarkoma nadlaktične kosti djeteta nakon provedene neoadjuvantne kemoterapije. Klinika za dječje bolesti Zagreb.

Patohistološka i citološka dijagnostika: Biopsija tumora ima ključnu ulogu u postavljanju dijagnoze OS i treba se planirati obzirom na budući zahvat resekcije tumora. Imajući na umu heterogenu građu tumora, cilj je dobiti reprezentativan uzorak tumorskog tkiva iz kojega će biti moguće postaviti patohistološku dijagnozu, a sve uz što manji rasap tumorskih stanica.

Proizvodnja osteoida od strane tumorskih stanica mikroskopski određuje ovu vrstu tumora. Na preparatima obojenima hemalaunom i eozinom (HE), osteoid je gust, ružičast materijal, poput razgranatih krivulja različite debljine koje oblikuju lakune, a koji se može odlagati na normalne koštane gredice. U njega su uklopljene maligne pleomorfne stanice. Osim područja osteoida, koje je nužno naći da bi se postavila dijagnoza OS, tumor može imati i histološke sastavnice koje odgovaraju hrskavici i vezivu, te se na osnovi prevladavajuće sastavnice OS najčešće opisuje kao osteoblastični, hondroblastični ili fibroblastični (5, 6).

U oko 50% slučajeva se radi o osteoblastičnom OS (7) (slika 3A), u oko 20% o hondroblastičnom (8) (slika 3B) i u oko 25% slučajeva o fibroblastičnom OS (9) (slika 3C).



Slika 3. Primjeri histološkog izgleda konvencionalnog osteosarkoma (HE bojenje).

A: Osteoblastični tip. Prilagođeno prema Ramnani D, WebPathology. Osteoblastic osteosarcoma [slika s interneta]. 2022 Mar 31 [pristupljeno 19.4.2022.].

Dostupno na: <https://www.webpathology.com/image.asp?case=335&n=35>

B: Hondroblastični tip. Prilagođeno prema Ramnani D, WebPathology. Chondroblastic osteosarcoma [slika s interneta]. 2022 Mar 31 [pristupljeno 19.4.2022.].

Dostupno na: <https://www.webpathology.com/image.asp?case=335&n=32>

C: Fibroblastični tip. Prilagođeno prema Ramnani D, WebPathology. Fibroblastic osteosarcoma [slika s interneta]. 2022 Mar 31 [pristupljeno 19.4.2022.].

Dostupno na: <https://www.webpathology.com/image.asp?case=335&n=27>

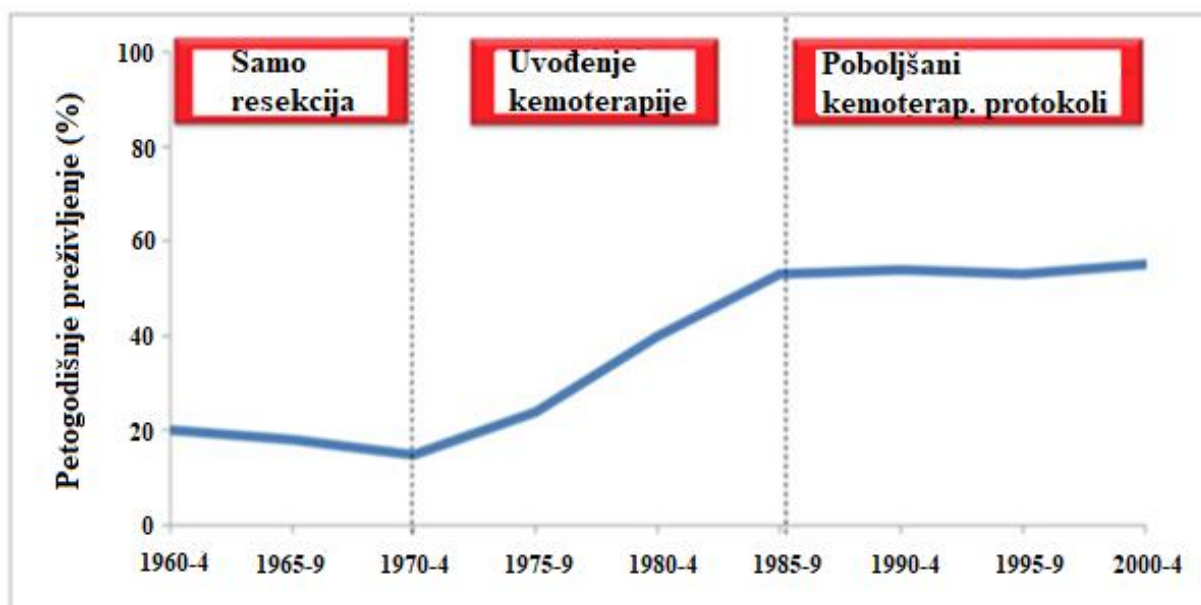
Imunohistokemijski, protein SATB2 (engl. *special AT-rich sequence-binding protein 2*) obično je izražen u OS. Iako je vrijedan dijagnostički biljeg za razlikovanje OS malih stanica od drugih tumora koji se javljaju u kostima morfološkog izgleda „malih okruglih stanica“, primjerice Ewingovog sarkoma, za dijagnozu OS nijedno protutijelo nema takvu dijagnostičku vrijednost kao što je prepoznavanje glavnog morfološkog obilježja područja osteoida s malignim stanicama (10).

Jedna biopsija može biti nedovoljna za pružanje reprezentativne informacije o ukupnoj genskoj i molekularnoj varijabilnosti primarnog tumora. Opći pristup vođen pretpostavkom sličnosti primarnog tumora i metastaza je analiza primarnog tumora i izbjegavanje više invazivnih biopsija na metastatskim mjestima, ali taj pristup je ograničio procjenu koliko različitih klonova može tvoriti tumor.

Citološka analiza OS još uvijek se nije pokazala osjetljivijom niti specifičnijom u odnosu na patohistološku u kontekstu samostalnog dijagnostičkog postupaka pri postavljanju dijagnoze OS. Ipak, analiza otiska uzorka tumora (engl. *imprint*) uzetog za vrijeme operativnog zahvata i punktata tkiva (primjerice metastatski promijenjenog limfnog čvora) obično je prije gotova od patohistološke, pa može dati preliminarne informacije o postojanju malignih stanica u uzorku (6).

Prognoza: Prirodni tijek bolesti završava smrtnim ishodom unutar oko godinu dana. Plućne metastaze su najčešći razlog nepovoljnog ishoda. Čimbenici koji utječu na prognozu su: odgovor tumora na kemoterapiju, izražaj gena koji se povezuju s lošijim ishodom, postojanje ostatnog tumorskog tkiva nakon resekcije, pojava lokalnog recidiva, postojanje radiološki vidljivih metastaza prije započetog liječenja, postojanje metastaza nakon provedenog liječenja, životna dob iznad 40 godina i primarno sjelo tumora. Aksijalni skelet predstavlja nepovoljnu lokalizaciju (6).

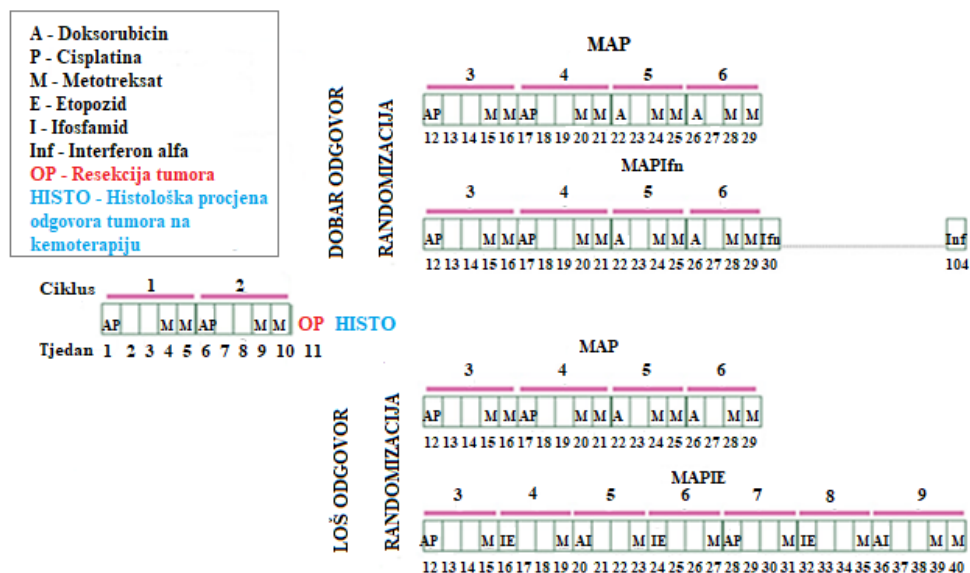
Liječenje: Ishodi liječenja bolesnika s OS su poboljšani krajem 1970-ih godina uvođenjem protutumorskih lijekova (kemoterapije). Prije toga bolesnici su bili liječeni samo operativno i petogodišnje preživljenje je bilo oko 20%. Rezultati su se 1980-ih godina dodatno poboljšali uvođenjem kombinacija boljih protutumorskih lijekova uz resekciju tumora, s ili bez očuvanja ekstremiteta, no od tada stagniraju pa je i danas prosječno petogodišnje preživljenje bolesnika s OS oko 60-70% (11) (slika 4).



Slika 4. Stagnacija u petogodišnjem preživljenju oboljelih od osteosarkoma nakon 1980-ih. Prilagođeno prema Anninga JK, Gelderblom H, Fiocco M, Kroep JR, Taminiau AH, Hogendoorn PC i sur. *Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand?*. *Eur J Cancer*. 2011;47(16):2431-45. Slika 1, Reported 5y-overall survival (% OAS) during subsequent periods; str 2432.

OS može biti primarno otporan na protutumorske lijekove, ali najčešće su oni na početku primjene učinkoviti. Otpornost je uglavnom stečena i razvija se kao odgovor tumora na

lijekove, primjerice uslijed prekomjernog izražaja gena koji kodiraju stanične crpke za izbacivanje lijekova ili promjene u apoptotskim mehanizmima stanice, pa lijek više ne izaziva apoptozu. Liječenje OS danas se provodi prema protokolu EURAMOS-1 (12) (slika 5).



Slika 5. Terapijska shema protokola EURAMOS-1. Prilagođeno prema Whelan JS, Bielack SS, Marina N, Smeland S, Jovic G, Hook JM i sur. EURAMOS-1, an international randomised study for osteosarcoma: results from pre-randomisation treatment. *Ann Oncol.* 2015;26(2):407-14. Slika 2, EURAMOS-1 treatment schedule; str. 406.

1.2. MATIČNE STANICE OSTEOSARKOMA

1.2.1. Stanična teorija tumorigeneze osteosarkoma

OS su vrlo složeni jer sadrže heterogen skup stanica koje se razlikuju po morfologiji, fenotipu, izražaju gena, metabolizmu, imunogenosti te proliferacijskom i metastatskom potencijalu. Tumorigeneza OS nije u cijelosti objašnjena nego se, kao i kod drugih malignih tumora, upotpunjuje različitim teorijama, a najnovija je teorija o tumorskim matičnim stanicama. Prema toj teoriji, u evolucijskom napredovanju malignog tumora ili njegovom recidivu nakon terapije, glavna jedinica odabira je stanica i to ona koja ima velik potencijal samoobnavljanja. Ona predstavlja tumorsku matičnu stanicu (TMS, engl. *cancer stem cell*, CSC). Ne postoji jednoznačan odgovor jesu li TMS rijetko ili često zastupljena vrsta stanica u nekoj tumorskoj masi te imaju li ista ili promjenjiva fenotipska svojstva. Jedina obvezna značajka im je velik potencijal samoobnove, a ostalo su hipotetska predviđanja. Prema tim

predviđanjima, tijekom napredovanja tumora može postojati selektivni pritisak mikrookoliša na stanice s najvećom sposobnošću samoobnavljanja, tj. udio TMS se može mijenjati kako bolest napreduje. Primjena protutumorskih lijekova može biti snažan poticaj za odabir, preživljenje i širenje TMS, a uz odabir putem djelovanja mikrookolišnog ili terapijskog pritiska, treba postojati istodobna genska varijabilnost TMS. Prema tome, ako samoobnavljajuće TMS pokreću i održavaju klonalni razvoj, one su spremište svih mutacijskih događaja koji podupiru klonalni odabir prije i poslije terapije. To podržava mišljenje da bi njihova supresija ili uklanjanje trebali biti cilj svake terapije. Ali ako su TMS genski raznolike, pojavljuje se i osnova za terapijski neuspjeh. Ekspanzija otpornih klonova pod terapijom pokazuje da je terapija sposobna različito eliminirati TMS, preciznije rečeno one kojima nedostaje sposobnost otpornosti. Prilagodljivost ostalih TMS združena je s njihovom intrinzično smanjenom osjetljivošću na protutumorske lijekove i radioterapiju zbog mogućnosti pojačanog popravljavanja DNA te povećanog broja staničnih crpki za izbacivanje lijekova, koje inače postoje za zaštitu normalnih matičnih stanica. Prijelaz s diferencijacije na samoobnovu, podržan tzv. tumorskom nišom, može omogućiti postojanje odjeljaka u kojima će TMS biti podvrgnute neovisnoj evoluciji. Tako TMS mogu biti ključ pri pokretanju i održavanju tumora. Prema tome, tumori su hijerarhijski organizirani sa subpopulacijom samoobnavljajućih stanica koje čine osnovu održavanja tumora. Inače, hipoteza o postojanju TMS je nastala u sklopu pokusa transplantacije leukemijskih stanica i premda je objavljena kao opće obilježje svih malignih tumora, treba naglasiti da je u tom smislu još uvijek sporna (13, 14, 15).

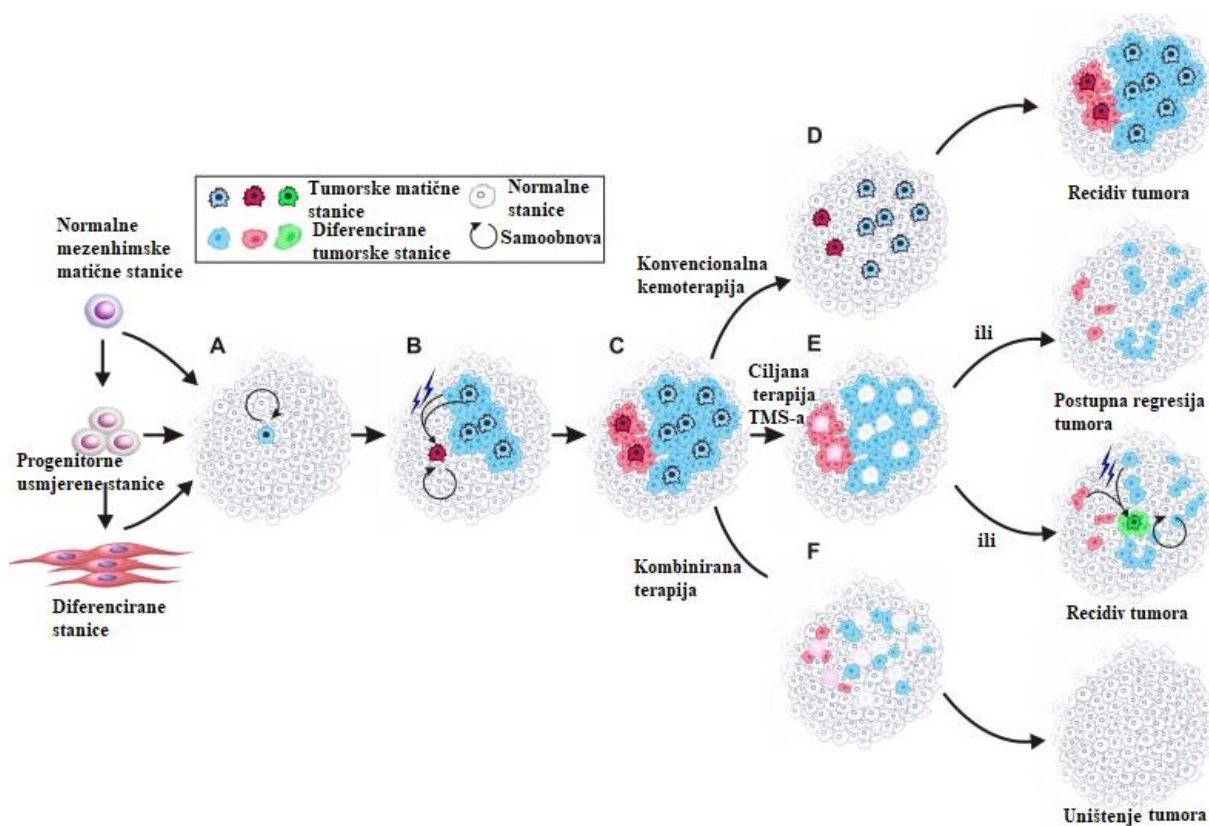
Jedna od pretpostavki o porijeklu matičnih stanica OS (OS-TMS) je maligna transformacija mezenhimskih matičnih stanica (MMS, engl. *mesenchymal stem cell*, MSC). MMS su nehematopoetske prekursorske stanice koje nalazimo u brojnim tkivima, primjerice koštanoj srži, perifernoj krvi, posteljici, pupčanoj vrpci i masnom tkivu, a koje pokazuju sposobnost samoobnavljanja i diferencijacije u razne mezenhimske stanične linije, poput osteocita, hondrocita, miocita i adipocita, te imaju ulogu u cijeljenju rana (16). MMS se mogu regrutirati iz koštane srži (KS-MMS) kao odgovor na genske i epigenske promjene te na mikrookolišne signale (17). Histološki tip mezenhimskog tumora može, osim s porijeklom MMS, biti povezan s vrstom onkogenog stresa u MMS. Tako je, primjerice, nađeno da su KS-MMS diferencirane u osteogenu lozu s gubitkom izražaja gena *Rb* i *p53* (*Rb*^{-/-} *p53*^{-/-}) razvile tumore histoloških značajki koje odgovaraju OS. Gubitak izražaja gena *p53* (*p53*^{-/-}) i kombinacija gubitka izražaja gena *Rb* i *p53* (*Rb*^{-/-} *p53*^{-/-}) su doveli do stvaranja leiomiosarkoma *in vivo*, bez obzira na izvor MMS (18, 19).

Promjena regulatora staničnog ciklusa se može dogoditi i u prekursorima osteoblasta što upućuje na to da bi i oni mogli biti izvor OS, uz uvjet orkestracije signalima iz mikrookoliša tumora te odgovora na genske i epigenske promjene unutar tih stanica (20).

Prema gore navedenom, prvi onkogeni događaj se može zbiti u stanicama koje se razlikuju od glavnine stanične populacije koja originalno čini neko tkivo po tome što pokazuju svojstva matičnosti i mogu se identificirati izbacivanjem boje Hoechst (engl. *side population*, *SP*), ili se on može zbiti u bilo kojoj stanici iz glavnine stanične populacije koja originalno čini neko tkivo (engl. *non-side population*, *non-SP*). OS-TMS teoretski je nastala ili transformacijom nediferenciranih MMS ili transformacijom već usmjerene, progenitorne stanice osteoblastične loze. Termin TMS još uvijek je predmet rasprave jer nije sa sigurnošću dokazano da se radi o matičnim stanicama u užem smislu, a naziv su dobile kroz analogiju s embrionalnim matičnim stanicama. Njihova imunotolerantna svojstva, niska mitotska aktivnost i otpornost na lijekove su doveli do toga da se ova populacija naziva i mirujućim, tolerantnim i postojećim stanicama koje predstavljaju jedinstvenu subpopulaciju unutar tumora, odgovornu za njegov napredak, otpornost na protutumorske lijekove, metastaziranje i recidiv (21). Ovaj opis vrijedi i za OS-TMS (22).

OS-TMS su u interakciji s lokalnim stanicama. Cirkulirajuće normalne MMS koje uđu u tumor mogu podržavati njegov rast, pojačavati invazivnost i sudjelovati u stvaranju metastatskih niša u suradnji s tumorskim stanicama. Pod utjecajem MMS može doći do dediferencijacije stanica OS tako da one pokazuju svojstva matičnosti (23, 24). Ta međustanična komunikacija se, međuostalim, odvija putem vezikula. U istraživanjima o utjecaju navedenih vezikula izlučenih iz stanica OS, nađeno je da MMS mogu internalizirati vezikule nakon čega takve, tzv. MMS instruirane od strane tumora, imaju ulogu u promociji rasta i metastaziranju OS. Vezikule izlučene iz stanica OS sadrže TGF- β (engl. *transforming growth factor beta*) koji je važan za razvoj fenotipa TMS (25).

Zaključno, TMS igraju značajnu ulogu u ostvarenju heterogenosti tumora stalnim obogaćivanjem tumorske mase novim mutiranim stanicama i dominantnim subklonovima te reguliranjem mikrookoliša tumorskih stanica (26). Stoga OS-TMS mogu predstavljati zaseban terapijski cilj koji dopunjava konvencionalno liječenje, pa bi rasvjetljavanje obilježja i uloge OS-TMS u OS moglo poboljšati njegovo liječenje (27, 28) (slika 6).

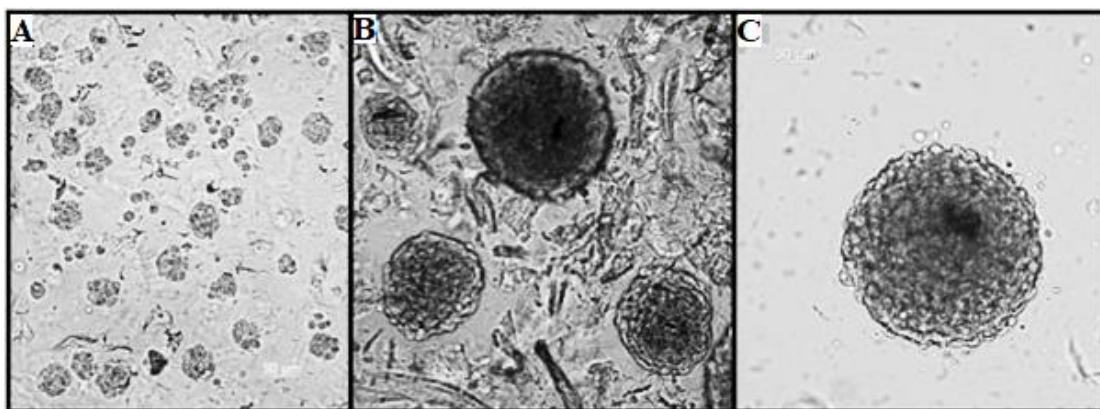


Slika 6. Shematski prikaz teorije matičnih stanica osteosarkoma. A. Zbog određenih mutacija normalne mezenhimske matične stanice, progenitorne stanice usmjerene osteoblastične loze i / ili diferencirane stanice osteoblastične loze se mogu transformirati u tumorske matične stanice (TMS). B. TMS daje kćeri TMS i diferencirane tumorske stanice. C. Više klonova TMS može postojati i doprinijeti heterogenosti tumora. D. Kemoterapija ubija diferencirane stanice tumora i osjetljive TMS, ali ne i otporne TMS, što dovodi do recidiva tumora. E. Ciljana terapija TMS može dovesti do regresije ili do recidiva tumora. F. Kombinirana terapija bi mogla eliminirati TMS i diferencirane tumorske stanice te rezultirati uništenjem tumora. Prilagođeno prema Wang T, Shigdar S, Gantier MP, Hou Y, Wang L, Li Y i sur. Cancer stem cell targeted therapy: progress amid controversies. *Oncotarget*. 29;6(42):44191-206. Slika 2, Schematic of current cancer stem cell theory; str. 44195.

1.2.2. Fenotipska obilježja matičnih stanica osteosarkoma

Apoptozu izazvanu neadekvatnom ili neprimjerenom vezom između stanice i njezinog matriksa nazivamo anoikis. Vezanje stanica s ekstracelularnim matriksom uglavnom je posredovano integrinima koji predstavljaju obitelj heterodimernih transmembranskih receptora (29). Stanice tumora koje su otporne na anoikis zaobilaze signale stanične smrti potaknute nedostatkom vezanosti, omogućujući im produženo vrijeme preživljavanja tijekom migracije na druga mjesta. Stoga se otpor prema anoikisu smatra važnim u metastaziranju. Stanice OS su osjetljive na anoikis, ali otpornost na njega se može potaknuti u izvorno osjetljivim klonovima

naizmjeničnim ciklusima kultura stanica pod prijanjajućim i neprijanjajućim (resuspendirajućim) uvjetima. Ovaj otporni fenotip je stabilan te ukazuje na to da uklanjanje mogućnosti prijanjanja stanica, odnosno izlaganje neprijanjajućem okruženju, djeluju kao pokretačka snaga prema otpornosti na anoikis (30). Gibbs i sur. prvi su dokazali postojanje OS-TMS tako da su u uzorcima tkiva OS izuzetih od bolesnika identificirali subpopulaciju stanica koje su bile sposobne formirati sarkofere u uvjetima bez seruma (31), (slika 7) (32).



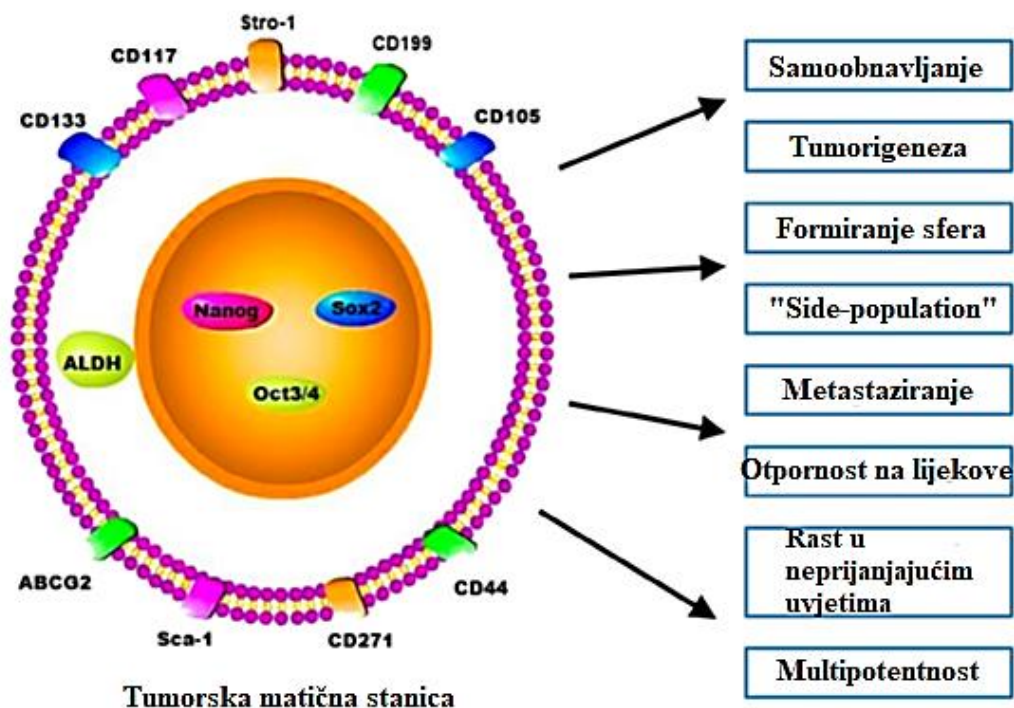
Slika 7. Rast sarkosfera. A. Sedmoga dana sarkosfere dosegnu promjer od oko 50 μm . B i C. Između četrnaestoga i trideset prvoga dana promjer im je od 150 do 300 μm . Preuzeto s dozvolom i prilagođeno iz Skube K. *The Effects of ascorbic acid on osteosarcoma stem cells* [diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2018. Slika 4, Sarkosphere growth in the period of 31 days; str. 16.

Otpornost na lijekove TMS vjerojatno postižu kroz povećanje razine i aktivnosti transportera zaduženih za izbacivanje lijekova iz stanice kao što su MDR/ABC (engl. *multidrug resistance transporters / ATP-binding cassette*). Ova osobina se koristi za identifikaciju TMS mjerenjem sposobnosti stanica da izbace boju koja se veže na DNA (primjerice Hoechst 33342 ili Rhodamin 123) te sortiranjem stanica mjerenjem intenziteta fluorescencije (33). Stanice koje imaju visoku razinu navedenih transportera izbacuju boju i u literaturi su označene kao SP (34, 35). Prisutnost populacije stanica koja izbacuje boju Hoechst 33342 je dokazana u staničnim linijama OS i u ljudskom primarnom OS (36). Martins-Neves i sur. su identificirali subpopulaciju stanica u tumorskoj liniji MNNG/HOS koje su pokazale otpornost na protutumorske lijekove i radioterapiju (37).

OS-TMS fenotipski su slične matičnim stanicama zahvaljujući izražaju gena za proteine Oct-3 i Oct-4 (čimbenik transkripcije koji veže oktamer 3 odnosno oktamer 4), koji imaju ulogu u samoobnavljanju nediferenciranih embrionalnih matičnih stanica i često se koriste kao biljezi za nediferencirane stanice. Osim njih, OS-TMS sadrže protein Nanog kodiran istoimenim

genom, a radi se o transkripcijskom čimbeniku koji pomaže da embrionalne matične stanice (EMS) održavaju pluripotenciju suzbijanjem čimbenika diferencijacije stanica. Stoga delecija gena *Nanog* pokreće diferencijaciju EMS. Basu Roy i sur. su našli da stanice koje imaju povećanu sposobnost rasta u neprijanjajućim uvjetima i oblikovanja sfera izražavaju biljege matičnih stanica Sox2 (engl. *SRY-box transcription factor 2*) i Sca-1 (engl. *stem cell antigen 1*) u linijskim i nelinijskim uzorcima OS (38). Ispad funkcije gena Sox2 je rezultirao pojačanom diferencijacijom stanica OS i smanjenjem klonalnosti, migracije i invazivnosti. Suprotno tome, stanice OS s pojačanim izražajem Sox2 se nisu uspjele diferencirati u zrelije osteoblaste (39).

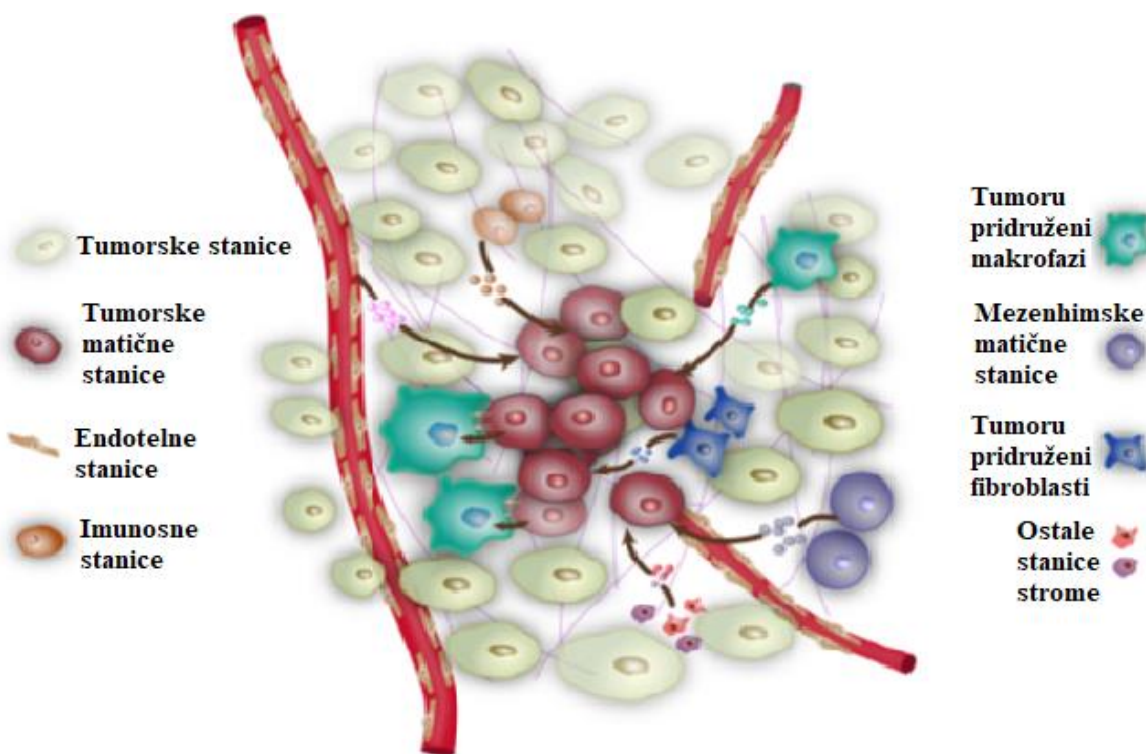
U posljednjih nekoliko desetljeća brojna istraživanja su pokušala identificirati specifične biljege i svojstva OS-TMS (40). Pored prisustva biljega matičnih stanica koje dijele s EMS, OS-TMS imaju sposobnost stvaranja staničnih sfera *in vitro*, koje su *in vivo* visoko tumorigene te imaju visoku razinu aldehid dehidrogenaze-1 (ALDH-1) (41). ALDH-1 je povezana s otpornošću na protutumorske lijekove i pojačanim metastatskim potencijalom tumorskih stanica (42, 43). Adhikari i sur. su u staničnim linijama mišjeg i ljudskog OS pokazali prisutnost stanica koje sadrže CD117 (protein koji se veže na čimbenik matičnih stanica, engl. *stem cell factor, SCF*) i Stro-1 (biljeg MMS). Dvostruko pozitivna frakcija stanica na navedene proteine u usporedbi s dvostruko negativnom frakcijom stanica je pokazala veću sposobnost formiranja sfera, povećanu otpornost na liječenje doksorubicinom, viši metastatski potencijal te pojačanu prisutnost transportera za izbacivanje lijekova ABCG2 (engl. *ATP-binding cassette super-family G member 2*) (44). CD44 je još jedan biljeg MMS te ima ulogu u njihovoj migraciji i metastaziranju OS-TMS (45, 46). CD133 se koristi kao biljeg za TMS različitih tipova tumora, pa tako i OS, te je pojačano prisutan u tumorima bolesnika s metastazama u plućima i lošom prognozom (47, 48). Oct4+ stanice OS koje su bile i CD105+ su imale veću sklonost metastaziranju u pluća. CD105 je glikoprotein stanične membrane endotelnih stanica i prekomjerno je prisutan u endotelu tumora te predstavlja pomoćnu sastavnicu receptora za TGF- β (49). OS-TMS pokazuju i CD271, receptor niskog afiniteta za čimbenik rasta neuralnog grebena i biljeg matičnih stanica mozga. CD271+ stanice su pokazale otpornost na protutumorske lijekove, velik potencijal oblikovanja sfera te velik tumorigeni potencijal nakon ubrizgavanja u gole miševe (50) (slika 8).



Slika 8. Molekularni biljezi koji se koriste za izolaciju matičnih stanica osteosarkoma. Shematski dijagram prikazuje uloge Oct3 / 4, Sox2 i Nanog te pridruženih biljega koji se obično koriste za identifikaciju OS-TMS. Prilagođeno prema Yan GN, Lv YF, Guo QN. *Advances in osteosarcoma stem cell research and opportunities for novel therapeutic targets. Cancer Lett.* 2016;370(2):268-74. Slika 1, Molecular markers used to isolate CSCs in tumors; str. 269.

1.2.3. Niša tumorskih matičnih stanica

Niša matičnih stanica definira mikrookoliš u kojem one prebivaju. Ona se općenito sastoji od TMS, potpornih stanica, upalnih stanica, kapilara, ekstracelularnog matriksa te kemokina i citokina (51). Taj mikrookoliš olakšava ulazak TMS u stanje mirovanja, zadržavanje svojstava matičnosti, samoobnavljanje te im pruža fizičku potporu. Ona jača otpornost TMS na stres kao što su hipoksija, djelovanje citotoksičnih T limfocita te protutumorskih lijekova i radioterapije. Drugim riječima, stanice iz niše su u prednosti kad je riječ o preživljenju pred onima koje nisu u njoj. Tumor može lokalno i udaljeno kolonizirati odgovarajuća mjesta, a TMS igraju ključnu ulogu u tim procesima jer pridonose stvaranju i održavanju tumorske niše.



Slika 9. Niša tumorskih matičnih stanica (TMS). Niša se sastoji od tumorskih stanica, raznih stanica koje nisu maligne te fizikalnih i biokemijskih čimbenika koji održavaju TMS. Žile osiguravaju prehranu i kisik, a TMS i same stimuliraju angiogenezu. Prilagođeno prema He J, Xiong L, Li Q, Lin L, Miao X, Yan S i sur. 3D modeling of cancer stem cell niche. *Oncotarget*. 2017;9(1):1326-45. Slika 1, Niche contributes to the maintenance of CSCs; str. 1327.

Tumorske stanice otkrivene u cirkulaciji pokazuju nisku aktivnost što pridonosi njihovoj otpornosti na protutumorske lijekove i boljem preživljenju u odnosu na aktivne stanice. TMS sudjeluju u procesu angiogeneze poticanjem proliferacije i diferencijacije endotelних stanica da bi se stvorila bogata vaskularna niša. Ti su učinci uglavnom posredovani pomoću angioreaktivnih čimbenika oslobođenih iz TMS, a čimbenici koji potječu iz endotelnih stanica, primjerice VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) i HIF (engl. *hypoxia inducible factor*), doprinose preživljavanju, širenju i samoobnavljanju TMS (52) (slika 9).

TMS koje dođu s primarnog mjesta, cirkuliraju i lociraju se u metastatskim regijama. Samo mali dio diseminiranih stanica tumora može preživjeti i pokrenuti metastatski rast. Izraz "metastatska niša" se koristi za označavanje specifične lokacije, kompleksa stromalnih stanica, međustaničnih molekularnih signala i sastavnica ekstracelularnog matriksa, koji imaju ulogu u preživljavanju, samoobnavljanju i tumorigenezi metastatskih TMS (53).

Hipoksija je uobičajena karakteristika solidnih tumora. Krvne žile tumora su slabo organizirane te kao takve mogu uzrokovati prolazni ili trajni nedostatak kisika. Dakle, tumori po mogućnosti moraju pribjeći anaerobnoj glikolizi što rezultira povećanjem količine laktata i

snižavanju pH. Stanice tumora se nalaze u kiseloj niši koja je rezultat variranja koncentracije laktata. Kiselost mikrokoliša daje stanicama tumora prednost pri progresiji i metastaziranju, što uključuje pregradnju ekstracelularnog matriksa, aktiviranje proteaza kao što su katepsini i gelatinaze te stimuliranje angiogeneze i limfangiogeneze kroz pojačano oslobađanje VEGF (54). Geni povezani s matičnošću (primjerice *Oct4*) značajno su izraženi u stanicama tumora u hipoksiji, što upućuje na to da hipoksija potiče matična svojstva. Hipoksična niša je vrlo važna za širenje i održavanje TMS (55).

Dio tumorske niše čine i imunosne stanice. Kad je riječ o imunologiji tumora, sastavnice imunskog sustava mogu imati u organizmu dvojaku ulogu: mogu uništiti tumorske stanice ili mogu promovirati tumorski rast. Solidni tumori i metastaze su prožeti heterogenom populacijom leukocita kao što su makrofazi, limfociti T, limfociti B i NK stanice (56). Među prvim stanicama koje pristižu na mjesto nekog patološkog procesa u organizmu su makrofazi. Iz koštane srži u cirkulaciju ulaze kao nezreli monociti koji migriraju u tkiva i organe gdje se diferenciraju u lokalne makrofage, primjerice osteoklaste (57). Tumorske stanice luče kemokine i kemoatraktante koji dovode do novačenja cirkulirajućih monocitnih prekursora u tumorsku masu. Ti tumoru pridruženi makrofazi (engl. *tumor-associated macrophages*, TAM) u tumoru induciraju imunosupresiju, neovaskularizaciju, stvaranje tumorske strome i metastaziranje. OS može biti infiltriran heterogenom populacijom TAM (58). OS mogu biti „imunosno hladni“ što znači da u takvim tumorima nema imunosnih stanica ili da u tumoru mogu postojati imunosne stanice, ali je njihova obrambena reakcija na tumor inhibirana. Same tumorske stanice slabo izražavaju antigene koji bi potaknuli imunosni sustav tj. smanjena im je prisutnost MHC (engl. *major histocompatibility complex*). Imunosuprimirajući učinak tumora na glavne nosioce kontrole tumorskog rasta NK stanice te CD8⁺ i CD4⁺ T limfocite se ostvaruje i preko tzv. imunosnih kontrolnih točaka (engl. *immune checkpoints*). Naime, navedene stanice imunskog sustava na svojoj površini sadrže receptor za programiranu smrt PD-1 (engl. *programmed death 1*). Kad se na njega veže odgovarajući ligand PD-L1 (engl. *programmed death ligand 1*) dolazi do supresije imunskog sustava preko inhibitornog signala temeljenog na međudjelovanju s fosfatazama. Ista supresija imunskog sustava se događa kad se na PD-1 veže tumorski ligand PD-L1 (59).

Fibroblasti povezani s tumorom, (engl. *cancer associated fibroblast*, CAF) su aktivirani fibroblasti koji dijele sličnosti s normalnim fibroblastima, a potiču ih upalna stanja povezana s razvojem tumora. Oni u tumorskom tkivu predstavljaju značajan sastojak strome, okružuju tumorske stanice i imaju važnu ulogu u mehaničkoj potpori, proliferaciji, preživljenju, angiogenezi, metastaziranju i imunogenosti (60). Svojstva matičnosti se mogu pojačati

kondicioniranim medijem iz CAF, što upućuje na prisutnost parakrino izlučenih molekula koje suprimiraju diferencijaciju tumora, pri čemu, primjerice, važnu ulogu ima čimbenik rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor*, *FGF*) (61). Bodo i sur. su pokazali da bi slaba diferencijacija stanične linije ljudskog OS-a MG-63 mogla biti povezana s prekomjernom proizvodnjom bazičnog čimbenika rasta fibroblasta (engl. *basic fibroblast growth factor*, *bFGF*) i receptora za bFGF (62).

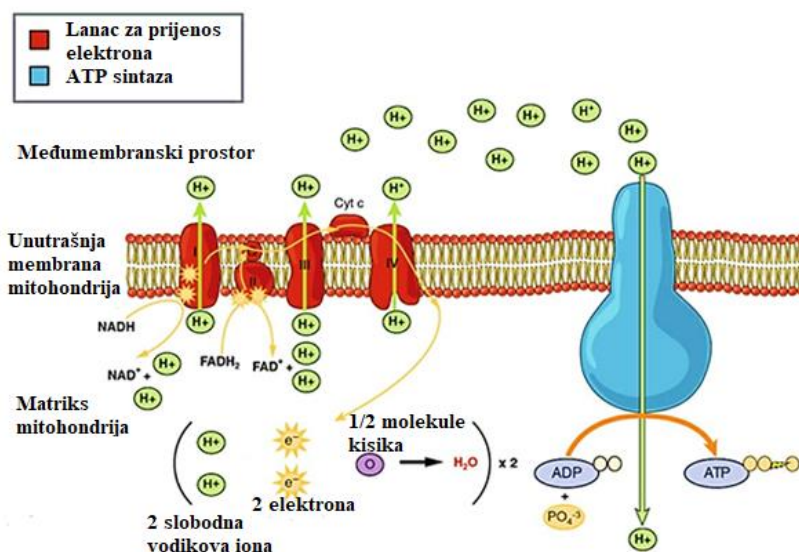
1.3. METABOLIZAM OSTEOSARKOMA

Metabolizam ili izmjena tvari je skup kemijskih procesa koji se odvijaju u živom organizmu kako bi se održao život (63). Stanična heterogenost tumora rezultira različitim metaboličkim profilima među subpopulacijama stanica unutar istog tumora. Metabolizam tumorskih stanica je potencijalna meta terapijskog djelovanja.

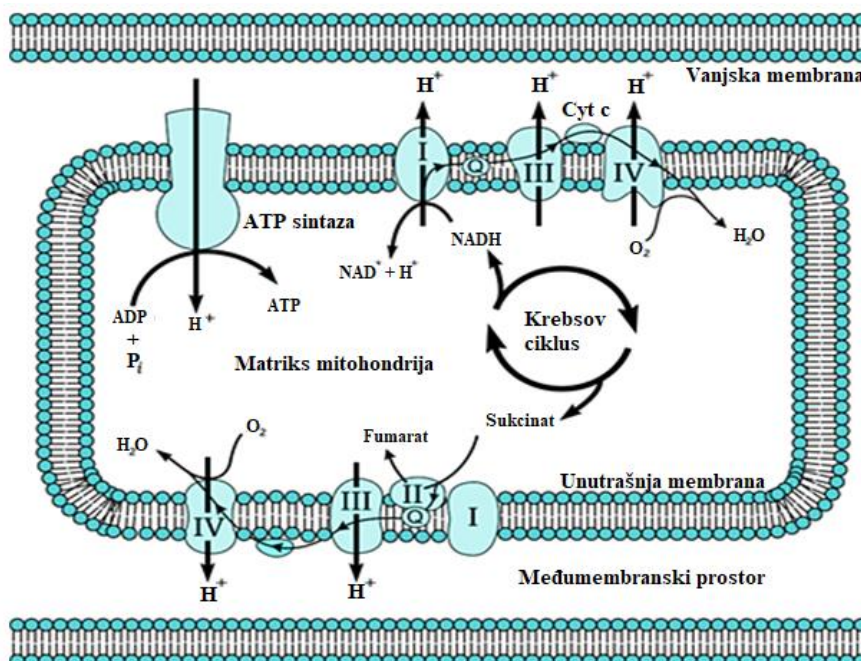
1.3.1. Oksidacijska fosforilacija

Oksidacijska fosforilacija (engl. *oxidative phosphorylation*, *OXPHOS*) je metabolički put u kojem stanice koriste enzime za oksidaciju hranjivih tvari, oslobađajući kemijsku energiju molekularnog kisika koja se koristi za proizvodnju ATP (adenozin trifosfat). Taj put je učinkovit jer je energija dvostruke veze kisika (O_2) mnogo veća od energije dvostruke veze u ugljičnom dioksidu (CO_2) ili u parovima jednostrukih veza u organskim molekulama iz fermentacijskih procesa kao što je anaerobna glikoliza (64). Tijekom oksidacijske fosforilacije, elektroni se prenose s davaoca elektrona poput NADH (reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotida) na primaoca elektrona, poput kisika i vodika u redoks reakcijama. Ove redoks reakcije oslobađaju energiju pohranjenu u relativno slaboj dvostrukoj vezi kisika koja se koristi za stvaranje ATP, a katalizira ih niz proteinskih kompleksa smještenih u unutrašnjoj membrani mitohondrija koji se nazivaju lanac za prijenos elektrona. Energija koju elektroni prenose kroz lanac za prijenos elektrona se koristi za prijenos protona kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu, što stvara potencijalnu energiju u obliku pH gradijenta i električnog potencijala kroz membranu. Ta zaliha energije se iskorištava kad se protoni vraćaju natrag kroz membranu niz gradijent potencijalne energije pomoću enzima nazvanog ATP sintaza. ATP sintaza u reakciji fosforilacije koristi navedenu energiju za pretvorbu ADP (adenozin difosfat) u ATP. Struja protona usmjerena je s negativne strane membrane na pozitivnu stranu pomoću enzima protonske crpke u lancu za prijenos elektrona. Citosolni protoni koji su se nakupili

hidrolizom ATP i stvaranjem laktata mogu slobodno difundirati kroz vanjsku membranu mitohondrija i zakiseliti međumembranski prostor, čime izravno doprinose pokretanju ATP sintaze (65, 66) (slike 10 i 11).



Slika 10. Lanac za prijenos elektrona u oksidacijskoj fosforilaciji. Prilagođeno prema Biologydictionary.net Editors, Biology dictionary. Electron Transport Chain and Oxidative Phosphorylation [slika s interneta]. 2018 Aug 21 [pristupljeno 20.04.2022.]. Dostupno na: <https://biologydictionary.net/electron-transport-chain-and-oxidative-phosphorylation/>



Slika 11. Oksidacijska fosforilacija. Prilagođeno prema Wikipedia: the free encyclopedia. Mitochondrial electron transport chain [slika s interneta]. 2007 Nov 9 [pristupljeno 20.04.2022.]. Dostupno na: https://en.wikipedia.org/wiki/Oxidative_phosphorylation

Mnogi katabolički biokemijski procesi poput glikolize, ciklusa limunske kiseline i beta oksidacije proizvode NADH. Normalno proliferirajuće stanice u normoksičnim uvjetima dobivaju energiju za održavanje homeostaze pretvarajući uzastopno glukozu u glukoza-6-fosfat, fruktoza-6-fosfat, fruktoza-bisfosfat i acetil koenzim A (CoA). U mitohondrijima acetil CoA ulazi u Krebsov ciklus za proizvodnju NADH. NADH sadrži elektrone koji imaju visok prijenosni potencijal i koji će nakon oksidacije osloboditi veliku količinu energije. Međutim, stanica ne oslobađa tu energiju odjednom jer bi to bila nekontrolirana reakcija. Umjesto toga, elektroni se uklanjaju iz NADH i prelaze u kisik kroz niz spomenutih enzima koji se nalaze u unutrašnjoj membrani mitohondrija. Količina energije koja se oslobađa oksidacijskom fosforilacijom je velika u usporedbi s količinom energije proizvedene anaerobnom glikolizom u citoplazmi. Glikolizom nastaju 2 molekule ATP, a oksidacijskom fosforilacijom nastaje između 30 i 38 molekula ATP (67).

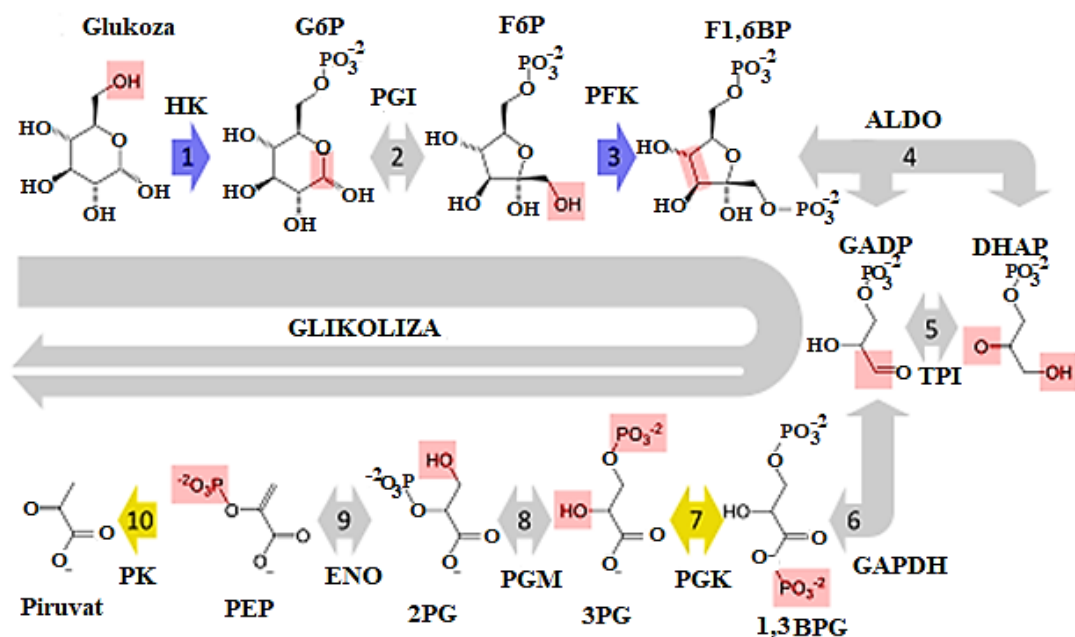
Molekularni kisik je idealan krajnji primalac elektrona jer je snažno oksidacijsko sredstvo. Proces redukcije kisika uključuje potencijalno štetne međuprodukte. Iako prijenos četiriju elektrona i četiriju protona smanjuje razinu kisika, što je bezopasno, prijenos jednoga ili dvaju elektrona stvara anione superoksida ili peroksida koji su reaktivni. Reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i njihovi reakcijski proizvodi, primjerice, hidroksilni radikal su štetni za stanice jer oksidiraju proteine i uzrokuju mutacije DNA. Ovo stanično oštećenje može doprinijeti raznim bolestima i predlaže se kao jedan od uzroka starenja (68). Da bi suzbile djelovanje ROS, stanice sadrže brojne antioksidacijske sustave, uključujući vitamine poput vitamina C i E te enzime poput superoksidne dismutaze, katalaze i peroksidaze, koji ograničavaju štetu na stanicama.

1.3.2. Glikoliza

Metabolički put razgradnje glukoze ($C_6H_{12}O_6$) u piruvat (CH_3COCOO^-) i H^+ je glikoliza. Ona se događa u citosolu. Slobodna energija oslobođena u tom procesu se koristi za sintezu ATP i NADH.

Ukupna jednažba glikolize glasi:

glukoza + 2 ADP + 2 P_i → 2 laktat + 2 ATP + 2 H_2O , a odvija se u 10 koraka, katalizirana određenim enzimima (69) (slika 12). P_i predstavlja anorganski fosfat, važan intracelularni čimbenik u kontroli glikolize.



Slika 12. Glikoliza. HK heksokinaza, G6P glukoza-6-fosfat, PGI glukoza-6-fosfat izomeraza, F6P fruktoza-6-fosfat, PFK fosfofruktokinaza 1, F1,6BP fruktoza-1,6-difosfat, ALDO fruktoza difosfat aldolaza, GADP gliceralhid-3-fosfat, TPI fosfotrioza izomeraza, DHAP dihidroksiaceton fosfat, GAPDH gliceralhid-3-fosfat dehidrogenaza, 1,3BPG 1,3-difosfoglicerat, PGK fosfoglicerat kinaza, 3PG 3-fosfoglicerat, PGM fosfoglicerat mutaza, 2PG 2-fosfoglicerat, ENO fosfopiruvat elonaza, PEP fosfoenolpiruvat, PK piruvat kinaza. Prilagođeno prema Shafe T, Wikipedia: the free encyclopedia. Glycolysis metabolic pathway [slika s interneta]. 2015 Apr 1 [pristupljeno 21.04.2022.]. Dostupno na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Glycolysis>

Glikoliza se može odvijati aerobno ili anaerobno ovisno o dostupnosti kisika i lancu za prijenos elektrona. Osim glukoze, glikoliza je glavni metabolički put fruktoze, galaktoze i drugih ugljikohidrata iz hrane. Ovo je način pomoću kojega većina tkiva može preživjeti u uvjetima nedostataka kisika. U brzo proliferirajućim tumorskim stanicama kojima manjka kisika povećan je metabolizam glukoze, pri čemu nastaju velike količine piruvata koji se reducira u laktat i izlučuje iz stanica. Na ovaj način nastaje kiseli okoliš u tumoru (70).

EMS, matične stanice hematopoeze i MMS imaju smanjenu oksidacijsku sposobnost te je glikolitički put u njima vrlo aktivan što stvara nisku razinu ROS. Zanimljivo je da su niže razine ROS ključne za nediferencirani fenotip matičnih stanica. Hipoksija, prema tome, potiče glikolizu u pluripotentnim matičnim stanicama, a inhibicija oksidacijske fosforilacije u mitohondrijima podržava matičnost. Inhibicija glikolize ometa proliferaciju matičnih stanica i dovodi do stanične smrti (71).

1.3.3. Warburgov učinak

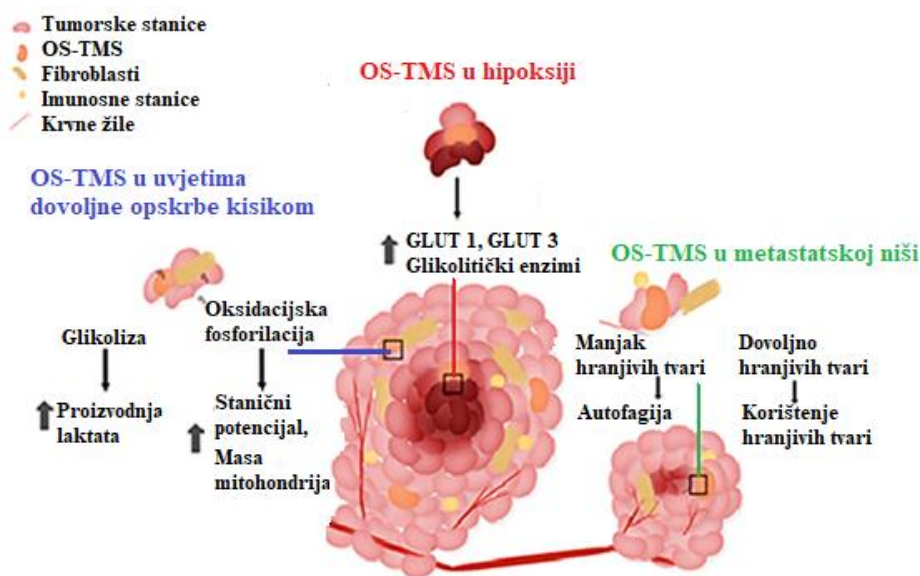
Brzo umnažanje tumorskih stanica nadmašuje angiogenezu što rezultira područjima s niskom razinom kisika, ali se smatra da tumorske stanice koriste glikolizu čak i u prisutnosti kisika. Otto Warburg prvi je opisao ovaj fenomen aerobne glikolize, sada poznat kao Warburgov učinak, prema kojemu se reprogramiranje metabolizma u tumoru očituje trajnom aerobnom glikolizom i koji pridonosi napredovanju malignog tumora (72). Pojačano korištenje glikolize tad je bilo pripisano oštećenju mitohondrija u tumorskim stanicama, no kasnije studije su pokazale da većina tumora ne pokazuje oštećenje mitohondrija, te da se aerobna glikoliza (energetski manje učinkovita od oksidacijske fosforilacije) odvija istovremeno bi se hranjive tvari unijele i ugradile u staničnu biomasu (npr. lipide, aminokiseline i nukleotide) potrebnu za proliferaciju stanica, a ne za učinkovitiju proizvodnju ATP. Naime, pretvorba sve dostupne glukoze u CO₂ putem oksidacijske fosforilacije u mitohondrijima s ciljem maksimalnog pojačanja proizvodnje ATP u suprotnosti je s potrebama stanice koja se dijeli. Dio glukoze se mora usmjeriti prema prekursorima makromolekula kao što su, primjerice, acetil-CoA za masne kiseline, zatim intermedijeri za neesencijalne aminokiseline i riboza za nukleotide (73). Ovo može barem djelomično objasniti prednost koju pruža Warburgov učinak, čije se razumijevanje smatra mogućom polaznom točkom za terapijsko uplitanje u stanični metabolizam tumora.

1.3.4. Metabolizam matičnih stanica osteosarkoma

Istraživanja različitih vrsta tumora kao što su glioblastom, OS, rak pluća, dojke, jajnika i debelog crijeva upućuju na to da njihove TMS preferiraju glikolizu u usporedbi s diferenciranim stanicama istih tumora (74, 75, 76, 77, 78, 79, 80). Obrazloženje toga je u sličnosti TMS s normalnim matičnim stanicama. Glikoliza ima uzročni odnos u induciranju pluripotentnog reprogramiranja matičnih stanica i stjecanju biljega matičnosti (71, 81). Regulacija glikolitičkih enzima poput transportera za glukozu (GLUT) i stimulacija glikolize su važni za besmrtnost stanica (82). Zbog toga se smatra da se i OS-TMS primarno oslanjaju na glikolizu.

Novi dokazi upućuju na postojanje specifičnih metaboličkih fenotipova TMS na temelju njihovog mikrokoliša, jer se one mogu naći u hipoksičnim i normoksičnim dijelovima tumora. Obilježja TMS još uvijek nisu potpuno jasna u kontekstu hipoksične niše, ali se smatra da takva niša potiče svojstva matičnosti i otpornosti na lijekove. Koka i sur. su analizirali OS-TMS iz stanične linije Saos-2 koristeći protutijelo CD133. CD133+ OS-TMS su pokazale pojačanu aktivnost LDH u hipoksičnim uvjetima te zanemarivu aktivnost LDH u normoksičnim

uvjetima. Biljezi matičnosti, biljeg metastatskih TMS (CD44) i biljeg otpornosti na lijekove (ABCG2) su bili visoko izraženi u CD133+ OS-TMS u normoksičnim uvjetima, ali nisu pokazale Warburgov učinak (83). TMS mogu biti manje ovisne o glikolizi od diferenciranih stanica istog tumora. Mitohondriji TMS brojnih tumora mogu imati povećanu mitohondrijsku masu, mogu trošiti više kisika, proizvoditi manje laktata i održavati višu razinu ATP u usporedbi s normalnim matičnim stanicama (84). Pored toga, TMS imaju razvijene antioksidacijske mehanizme koji održavaju ROS na niskoj razini, uz istovremeno očuvanje matičnih i tumorigenih svojstava (85). Prema tome, TMS mogu koristiti oksidacijsku fosforilaciju u normoksičnim uvjetima te unatoč njihovim matičnim svojstvima, ne možemo se u potpunosti osloniti na pretpostavku da su OS-TMS isključivo glikolitičke. U prilog tomu ide i naša studija u kojoj smo, metaboličkim profiliranjem OS-TMS uzgojenih iz bioptata triju bolesnika koji prethodno nisu bili liječeni protutumorskim lijekovima, utvrdili da one *in vitro* uglavnom koriste oksidacijsku fosforilaciju (86). U uvjetima smanjene količine hranjivih tvari tumorske stanice pokazuju sposobnost proizvodnje energije raznim aberantnim metaboličkim putevima poput korištenja arginina, glutationa, inozitola i masnih kiselina (87, 88, 89). U metastatskoj niši TMS pojačano koriste ekstracelularne hranjive tvari kao što su piruvat, laktat, glutamin, glutamat, alanin i ketonska tijela, a u stanjima nedostatka hranjivih tvari se oslanjaju na autofagiju (90) (slika 13).



Slika 13. Metabolizam matičnih stanica osteosarkoma (OS-TMS) ovisno o njihovoj lokalizaciji. Prilagođeno prema Snyder V, Reed-Newman TC, Arnold L, Thomas SM, Anant S. Cancer Stem Cell Metabolism and Potential Therapeutic Targets. Front. Oncol. 2018;8:203. Slika 1. The schematic represents the metabolic status of cancer stem cells (CSCs) in three broad categories based on the location.

Identificirani su specifični metabolički proteini kao potencijalni onkoproteini. Specifični onkoproteini mijenjaju metabolizam tumorskih stanica izravno regulirajući ključne metaboličke enzime i puteve. Na primjer, onkogeni transkripcijski čimbenik MYC aktivira transkripciju gena glikolitičkih enzima i prijenosnika glukoze (91). Metabolizam mitohondrija je reguliran onkoproteinom Bcl-2 (92). Ovakve mogućnosti OS treba imati na umu obzirom na njegovu gensku varijabilnost.

Dvostruka inhibicija glikolitičkih i mitohondrijskih energetske puteva se pokazala učinkovitom protiv rasta tumora u pretkliničkim modelima. Korištenjem 2-deoksi-D-glukoze (2-DG), konkurentskog inhibitora glikolize, zatim oligomicina, inhibitora mitohondrijske ATP-sintaze i metformina, široko korištenog lijeka protiv dijabetesa i inhibitora kompleksa I mitohondrijskog respiratornog lanca, Issaq i sur. su procijenili energetske profil i učinke inhibicije metabolizma na rast linijskih stanica sarkoma (OS i rabdomiosarkoma). Pokazali su da su stanice sarkoma različito osjetljive na inhibiciju glikolize, a još su osjetljivije na kombiniranu inhibiciju glikolize i oksidacijske fosforilacije. Ovi nalazi upućuju na to da ciljanje staničnih bioenergetika može predstavljati novu terapijsku strategiju za liječenje sarkoma (93), no ostaje izazov kako u živom organizmu blokirati metaboličke stanične procese, posebice oksidacijsku fosforilaciju.

Različiti stanični fenotipovi kao što su hipoksični u odnosu na normoksične ili mirujući u odnosu na proliferacijske imaju bitno različite metaboličke potrebe, što može izazvati različite odgovore pri uplitanju u njihov metabolizam. Čimbenici koji izravno utječu na metabolički status TMS mogu istovremeno djelovati na više razina, primjerice na promicanje diferencijacije TMS, mijenjanje njihovog mikrokoliša i poticanje prilagodbenih mehanizama.

1.4. ASKORBINSKA KISELINA I TUMORSKE STANICE

1.4.1. Vitamin C

Vitamin C je L-enantiomer askorbinske kiseline (AK) koji reverzibilno oksidira u dehidroaskorbinsku kiselinu (DHA). Gen za L-gulonolakton oksidazu je nefunkcionalan kod ljudi pa se vitamin C dobiva prehranom. U dodacima prehrani se koriste soli askorbata kao što su natrijev askorbat i kalcijev askorbat. Obzirom da je AK nestabilna, esterifikacijom hidroksilne skupine dugolančanim organskim i anorganskim kiselinama, dobivaju se stabilniji, hidrofobni derivati askorbata. AK djeluje kao antioksidans (redukcijsko sredstvo, davalac elektrona) u enzimskim i neenzimskim reakcijama kad prelazi u oksidirani oblik DHA. DHA

se može vratiti u reducirano stanje putem reduciranog glutationa (GSH). Bioraspoloživost AK ovisi o dozi, a unutarstanična koncentracija joj se povećava kad je stanici potrebna pojačana antioksidacijska zaštita. AK u stanicu uglavnom ulazi preko prijenosnika ovisnih o natriju (engl. *sodium-coupled vitamin C transporter, SVCT*), dok DHA ulazi putem GLUT, a unos se djelomično odvija i preko difuzije. Do nakupljanja AK u stanicama dolazi pretvaranjem DHA u AK pa nastaje niska unutarstanična koncentracija DHA što pogoduje unosu DHA duž gradijanta koncentracije. AK se uglavnom metabolizira u jetri i izlučuje urinom (94, 95).

AK je uobičajani dodatak staničnom mediju koji se koristi za poticanje diferencijacije MMS u stanice osteoblastične loze.

1.4.2. Askorbinska kiselina kao antioksidacijsko sredstvo

Proizvodnja ROS je neizbježna posljedica transporta elektrona u oksidacijskoj fosforilaciji u fiziološkim uvjetima. Visoke razine ROS potiču stanično starenje i smrt. Normalne i tumorske stanice mogu biti izložene visokoj razini oksidacijskog stresa koji nastaje zbog neravnoteže između proizvodnje slobodnih radikala kao što su superoksidni anion (O_2^-), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilni radikali ($OH^\cdot$), i njihovog uklanjanja antioksidansima kao što su superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza i drugi. Oksidacijski stres dovodi do oštećenja stanica uslijed lipidne peroksidacije koja uzrokuje gubitak funkcije i integriteta stanične membrane te oštećenja DNA (96).

U fiziološkoj koncentraciji (40-80 μM) AK pokazuje antioksidacijsko svojstvo kroz odnos između AK i GSH u metabolizmu glukoze, uključujući glikolizu, ciklus limunske kiseline i pentoza fosfatni put. GSH je kofaktor peroksidaza koje služe za poništavanje učinaka ROS na razne biomolekule te je davalac elektrona. Kako se elektroni gube, molekula postaje oksidirana, a dvije takve molekule se povezuju disulfidnom vezom da bi stvorile glutation-disulfid ili oksidirani glutation (GSSG). Ova veza je reverzibilna. GSH je pod strogom homeostatskom kontrolom. Recikliranje GSH katalizira glutation-disulfid reduktaza koja koristi reducirajuće ekvivalente iz NADPH za pretvorbu GSSG u GSH prema jednadžbi:

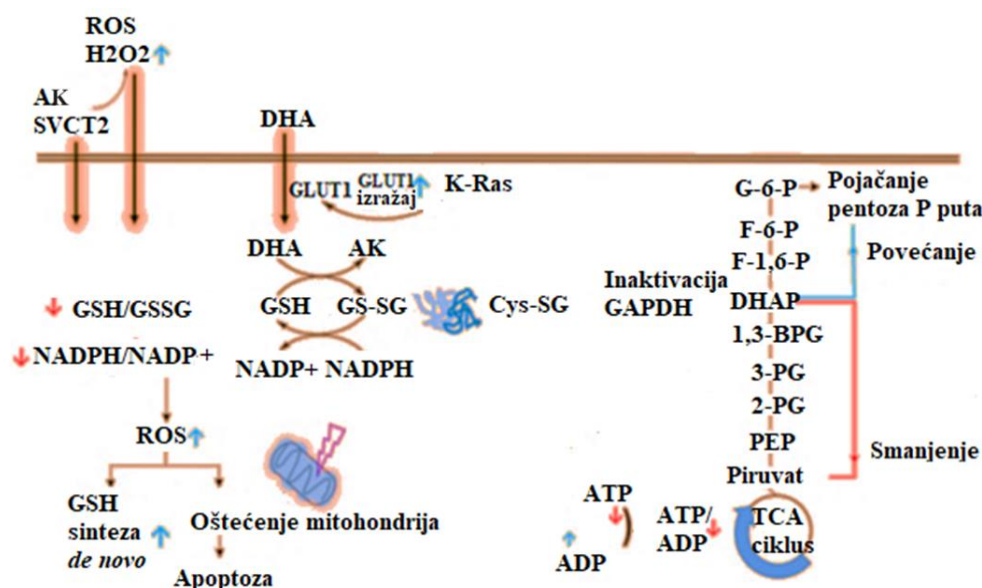
$2 \text{ GSH} + \text{NADP}^+ \leftrightarrow \text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+$. NADPH je reducirani oblik NADP (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) i djeluje kao redukcijsko sredstvo za GSSG, čime omogućava redoks ravnotežu u stanici. AK pomaže u očuvanju GSH jer potiče izražaj glutation-disulfid reduktaze, što rezultira povećanjem razine GSH putem *de novo* sinteze (97).

1.4.3. Askorbinska kiselina kao protutumorsko sredstvo

Brojni izvještaji govore o uporabi AK kao sredstva u liječenju i prevenciji različitih vrsta malignih tumora, odnosno o utjecaju AK na tumorske stanične linije u različitim dozama i koncentracijama. Prema tim izvještajima, AK je djelovala citotoksično na maligne stanične linije u niskim i visokim koncentracijama *in vitro*, antioksidacijski u niskim dozama na zdrave stanice, dok koncentracije od čak 20 mM AK nisu predstavljale rizik za nemaligne stanice (98, 99, 100, 101, 102). Prema tome bi AK mogla djelovati selektivno toksično na tumorske stanice, a taj antiproliferacijski učinak posredovan AK-om se ostvaruje kroz aktiviranje apoptoze mehanizmima posredovanim ROS.

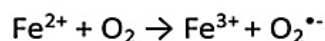
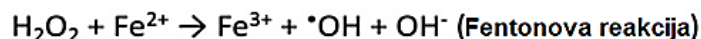
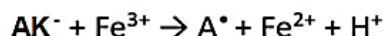
Glikoliza koja se pripisuje tumorskim stanicama, dijelom se odvija i preko pentoza fosfatnog puta koji je uključen u sintezu NADPH (103, 104). ROS se proizvode i u tumorskim stanicama, posebno kad su one izložene stresnim uvjetima. Zato tumorske stanice pojačavaju regulaciju antioksidacijskim sustavom koji uključuje GSH i puferiranje razine ROS. Ipak, tumorske stanice pokazuju i nestalnost u upravljanju oksidacijskim stresom što se pokušava iskoristiti u terapijske svrhe (105).

Primjećeno je da tumorske stanice različito reagiraju na visoke razine AK, a smatra se da je uzrok tomu njihova različita sposobnost uklanjanja ROS (106). Primjerice, AK u visokim dozama je selektivno toksična za stanice ljudskog kolorektalnog karcinoma koje nose mutacije gena *KRAS* ili *BRAF*. Mutirani geni *KRAS* i *BRAF* aktiviraju put MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*) koji vodi do pojačanog izražaja prijenosnika GLUT1 preko kojih DHA ulazi u stanice. Kad DHA uđe u stanicu, reducira se u AK oksidacijom GSH što rezultira trošenjem GSH i nakupljanjem visoke razine ROS u stanici. Smatra se da se u stanicama s mutiranim genima *KRAS* ili *BRAF* inaktivira GAPDH pod utjecajem ROS i to putem oksidacije cisteina navedenog enzima (107). Metaboliti uzlazno od GAPDH se nakupljaju dok metaboliti nizvodno od GAPDH bivaju iscrpljeni pa koncentracija ATP opada. AK posreduje u oksidacijskom stresu iscrpljivanjem i razine NADH, što u konačnici uzrokuje apoptozu (108, 109, 110) (slika 14).



Slika 14. Učinci askorbinske kiseline (AK) na stanični redoks sustav i metabolizam glukoze. G-6-P glukoza-6-fosfat, F-6-P fruktoza-6-fosfat, F-1,6B-P fruktoza-1,6-difostat, DHAP dihidroksiaceton fosfat, GAPDH gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, 1,3-PGB 1,3-difosfoglicerat, 3-PG 3-fosfoglicerat, 2-PG 2-fosfoglicerat, PEP fosfoenolpiruvat, DHA dehidroaskorbinska kiselina, SVCT2 prijenosnik ovisan o natriju 2, GLUT1 transporter za glukozu 1, ROS reaktivne kisikove vrste, GSSG oksidirani glutation, GSH reducirani glutation, NADP nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, NADPH reducirani oblik NADP. Prilagođeno prema Park S, Ahn S, Shin Y, Yang Y, and Yeom CH Vitamin C in Cancer: A Metabolomics Perspective. Front. Physiol. 2018;9:762. Slika 1. Effect of vitamin C on intracellular redox metabolism and glucose metabolism.

AK ima sposobnost stvaranja relativno stabilnih slobodnih radikala, ali u visokim koncentracijama i u aerobnim uvjetima kad su prisutni metali sposobni za redoks (Fe, Cu), AK može djelovati prooksidacijski posredujući u stvaranju superoksidnih radikala prema Fentonovoj reakciji (111) (slika 15), koji zatim uzorkuju oksidacijski stres i lipidnu peroksidaciju. Nakupljanje askorbilnog radikala može također djelovati štetno jer je njegov domet djelovanja i poluživot u stanici veći od ROS.



Slika 15. Shema stvaranja slobodnih radikala prema Fentonovoj reakciji. AK askorbinska kiselina, AK^- askorbatni anion, $\text{A}^\bullet$ askorbil radikal, $\bullet\text{OH}$ hidroksilni radikal, $\text{O}_2^{\bullet-}$ superoksid anion. Prilagođeno prema Kaźmierczak-Barańska J, Boguszewska K, Adamus-Grabicka A, Karwowski BT. Two Faces of Vitamin C-Antioxidative and Pro-Oxidative Agent. Nutrients. 2020;12(5):1501. Slika 2. Scheme of hydroxyl radical generation according to Fenton's predictions.

1.4.4. Utjecaj askorbinske kiseline na matične stanice osteosarkoma

Fernandes i sur. su primijetili antiproliferacijske, antidiferencijacijske i apoptotičke učinke AK u staničnoj liniji OS G292 korištenjem 1 mM AK (112). Valenti i sur. su našli da AK inducira apoptozu u staničnoj liniji OS MG-63 i diferencijaciju osteoblasta (113). Bose i sur. su našli da kontinuirano oslobađanje AK iz polikaprolaktonom obloženih β -3-kalcij-fosfat nosača poboljšava proliferaciju, održivost i diferencijaciju ljudske fetalne stanične linije osteoblasta te da smanjuje proliferaciju stanica MG-63 (114). Oka i sur. su pokazali kemosenzibilizirajući učinak AK na liječenje cisplatinom koji je usko povezan s proizvodnjom ROS. Uz to, značajno je bilo smanjeno stvaranje sarkosfera što upućuje na to da bi AK mogla povećati učinkovitost liječenja cisplatinom djelujući protiv OS-TMS. Pokazali su i da AK smanjuje otpornost na cisplatinu (115).

Preliminarni rezultati za ovo istraživanje su dobiveni na uzorku OS izuzetog od punoljetnog bolesnika po učinjenoj resekciji OS i provedenoj kemoterapiji. Ispitan je učinak AK na OS-TMS iz navedenog uzorka. Western blot analiza OS-TMS je pokazala da GAPDH više nije detektabilna kad se one tretiraju tijekom 72 sata IC_{50} AK (koncentracija AK pri kojoj je 50% stanica mrtvo), a koji je iznosio 30 μ g/mL i 40 μ g/mL AK. Analizom stanične smrti protočnim citometrom koristeći aneksin V i propidij jodid, nađeno je da su OS-TMS tretirane s 30 μ g/mL AK tijekom 24 sata uglavnom bile u kasnoj apoptozi / nekrozi (50,37%) te u ranoj apoptozi (21,71%). OS-TMS tretirane 40 μ g/mL AK-om tijekom 24 sata uglavnom su bile u kasnoj apoptozi / nekrozi (53,70%) te u ranoj apoptozi (19,19%). Iste stanice tretirane samo cisplatinom su bile uglavnom vijabilne (90,92%). Opažena je pojačana proizvodnja ROS u OS-TMS nakon tretmana koncentracijama AK od 30 μ g/mL i 40 μ g/mL tijekom 72 sata (2,44 puta veća nego u kontrolnim stanicama) što je upućivalo na prooksidacijski i selektivni učinak AK (32).

Preliminarnim istraživanjem ispitan je i utjecaj AK na vijabilnost i metabolički profil OS-TMS uzgojenih iz bioptata izuzetih od triju bolesnika koji prethodno nisu bili liječeni protutumorskim lijekovima. U medij za uzgoj OS-TMS je dodavan bFGF. I njihove OS-TMS su bile osjetljivije na AK, ali ta osjetljivost (IC_{50} pri 15,5 mM AK) nije bila značajno veća u odnosu na kontrolne stanice staničnih linija U2OS, MMS i HEK 293 (IC_{50} pri 18-25,6 mM AK). Inkubiranje u 1 mM AK tijekom 24 sata nije imalo učinka na metabolizam ispitanih stanica. Inkubiranjem u 10 mM AK tijekom 24 sata usporio se metabolizam OS-TMS. OS-TMS su prema osnovnom metaboličkom profilu više pokazale sklonost oksidacijskoj fosforilaciji. (86).

2. HIPOTEZA

Askorbinska kiselina izaziva selektivnu smrt matičnih stanica osteosarkoma uzgojenih iz uzoraka tumorskih tkiva bolesnika dok ne šteti zdravim stanicama, a ovaj biološki fenomen je združen s razlikom u metaboličkom profilu, povećanjem razine reaktivnih vrsta kisika i blokadom glikolize u matičnim stanicama osteosarkoma.

3. CILJEVI RADA

OPĆI CILJ:

Provjera selektivnosti učinka askorbinske kiseline na matične stanice osteosarkoma.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Uzgoj matičnih stanica osteosarkoma iz uzoraka tumorskih tkiva izuzetih od najmanje 3 bolesnika/-ice, neposredno nakon učinjene biopsije (najmanje 3 uzorka);
2. Potvrda matičnog statusa matičnih stanica osteosarkoma uzgojem druge generacije sfera i testom izbacivanja boje;
3. Određivanje koncentracije askorbinske kiseline koja ubija 50% matičnih stanica osteosarkoma te stanica iz staničnih linija HEK 293, normalnih mezenhimskih matičnih stanica i U2OS MTT testom vijabilnosti;
4. Određivanje razine reaktivnih kisikovih vrsta u matičnim stanicama osteosarkoma nakon tretmana askorbinskom kiselinom;
5. Određivanje prisutnosti gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze u matičnim stanicama osteosarkoma nakon tretmana askorbinskom kiselinom Western blot analizom;
6. Određivanje vrste stanične smrti matičnih stanica osteosarkoma te stanica iz staničnih linija HEK 293, normalnih mezenhimskih matičnih stanica i U2OS uzrokovane djelovanjem askorbinske kiseline pomoću aneksina V, propidij jodida i protočnog citometra;
7. Određivanje metaboličkog fenotipa matičnih stanica osteosarkoma te stanica iz staničnih linija HEK 293, normalnih mezenhimskih matičnih stanica i U2OS prije i nakon tretmana askorbinskom kiselinom pomoću uređaja Seahorse.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. OPĆI ASPEKTI ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je provedeno u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost, „Selektivno ciljanje matičnih stanica sarkoma askorbinskom kiselinom“; šifra projekta: 7590; voditeljica projekta: izv.prof.dr.sc. Inga Urlić; trajanje projekta od 2018. do 2022. godine.

Etičko povjerenstvo Klinike za dječje bolesti Zagreb je dana 8. studenoga 2017. godine dalo suglasnost za provođenje ovog istraživanja (Urbroj 02-23/34-4-17).

Prilozi I, II, III i IV predstavljaju obrasce obavijesti o istraživanju i suglasnosti za sudjelovanje u istraživanju maloljetnih osoba za roditelje odnosno skrbnike, kao i za maloljetne osobe adolescentne dobi. Navedeni obrasci su priloženi Etičkim povjerenstvima Klinike za dječje bolesti Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Uzorci za ovo istraživanje su prikupljeni u Klinici za dječje bolesti Zagreb. Uzgoj matičnih stanica, MTT test vijabilnosti stanica, određivanje stanične razine ROS i Western blot analiza uzoraka su provedeni u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Određivanje vrste stanične smrti protočnim citometrom je provedeno u Institutu Ruđer Bošković. Metaboličko profiliranje ispitivanih stanica tehnologijom Seahorse je provedeno u Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci.

4.2. UZORKOVANJE TUMORSKIH TKIVA ZA ISTRAŽIVANJE

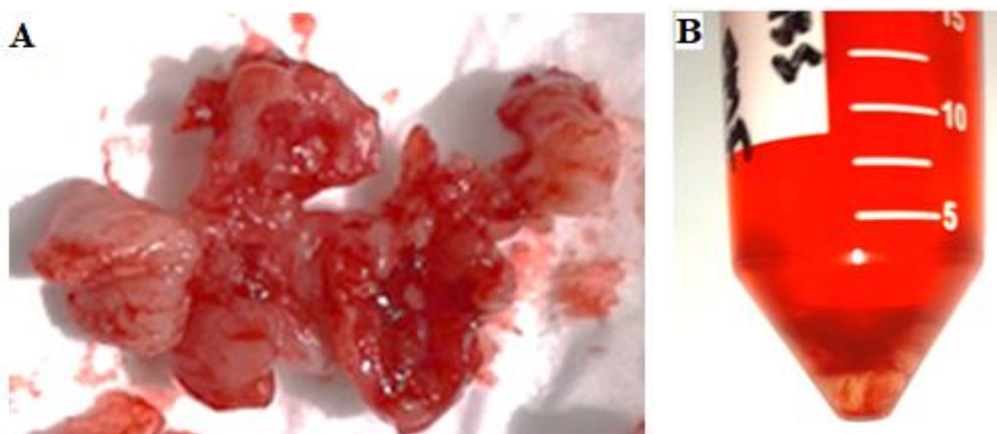
Materijali:

- falkon epruvete s hranjivim medijem za prijenos uzoraka
- hranjivi medij (engl. *growth medium*, *GM*) sastava: 10% fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, *FBS*) (Gibco) i 1% Penicilina/Streptomicina (Pen/Strep) (Capricorn) u modificiranom Coon Ham F12 mediju (Sigma-Aldrich)

Postupak:

Za potrebe ovog istraživanja su korištena tri konsektivno dobivena uzorka OS koji su izuzeti tijekom dijagnostičke otvorene biopsije (slika 16 A). Od svakog bolesnika je izuzet po

jedan uzorak tumorskog tkiva od strane liječnika/-ice specijaliste/-ice ortopedije, odnosno ortopedije i traumatologije, prema pravilima izvođenja biopsije tvorbi sustava za kretanje. Bolesnici prethodno nisu dobivali protutumorsku terapiju. Nakon što je uzorak izuzet, podijeljen je na dva dijela: jedan dio za istraživanje, a drugi za citološku i patohistološku dijagnostiku. Uzorci za istraživanje dobiveni od triju bolesnika su označeni kao P1, P2 i P3, i s njima se postupalo na isti način. Po izuzimanju u operacijskoj sali, uzorak za istraživanje je pohranjen u falkon epruvetu koja sadrži sterilizirani GM (slika 16 B) i poslan u laboratorij Zavoda za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Malignost je potvrđena citološkim pregledom otisaka tkiva u Klinici za dječje bolesti Zagreb isti dan po izuzimanju uzorka, a patohistološka dijagnoza OS je postavljena naknadno u Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 16. Biopstat tumorskog tkiva. A. Makroskopski izgled izuzetog tumorskog tkiva. B. Komadić tumorskog tkiva za istraživanje na dnu falkon epruvete s hranjivim medijem. Klinika za dječje bolesti Zagreb.

4.3. IZOLACIJA PARENTALNIH STANICA OSTEOSARKOMA

Materijali:

- biopstat tkiva OS-a triju bolesnika
- fosfatni pufer (engl. *phosphate buffer saline, PBS*) (Gibco)
- kolagenazni medij (engl. *collagenase medium, CM*) sastava: 20% FBS (Gibco), 1% Pen/Strep (Capricorn) i 3,75 mg/mL kolagenaze tipa II u modificiranom Coon Ham F12 mediju (Sigma-Aldrich)
- Petrijeve posude

- boce T-75
- inkubator
- tresilica
- centrifuga (Universal 320R, Hettich)

Postupak:

Isti dan po prispijeću uzorka tumorskog tkiva u laboratorij, GM iz epruvete je uklonjen aspiriranjem. Tkivo je stavljeno u Petrijevu posudu promjera 100 mm koja sadrži PBS, usitnjeno na veličinu dijelova od 0,5-1 mm i premješteno u epruvetu s 10 mL CM radi enzimske razgradnje. Epruveta s uzorkom zatim se inkubirala u inkubatoru na tresilici na 37 °C u 5% CO₂ tijekom 2 sata. Nakon inkubiranja, suspenzija je centrifugirana na 300 × *g*, supernatant je uklonjen aspiriranjem, a nataloženi djelići tkiva su suspendirani u 10 mL GM.

Dobivena stanična suspenzija je prebačena u bocu T-75 i inkubirana na 37 °C u 5% CO₂. Hranjivi medij je izmjenjivan svježim svaka 3 dana. Stanice koje su prionule uz podlogu u jednom sloju su predstavljale parentalne stanice OS.

4.4. UZGOJ SARKOSFERA

Materijali:

- parentalne stanice uzgojene iz triju bioptata OS-a
- PBS (Gibco)
- tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich)
- GM sastava: 10% FBS (Gibco) i 1% Pen/Strep (Capricorn) u modificiranom Coon Ham F12 mediju (Sigma-Aldrich)
- 2% metil-celuloza (MC) u miliQ-H₂O (Sigma-Aldrich)
- epidermalni čimbenik rasta EGF (Gibco) i bazični čimbenik rasta fibroblasta bFGF (Gibco)
- medij za uzgoj sarkosfera (engl. *sarcosphere growth medium*, *SGM*) sastava: 10% FBS (Gibco), 1% Pen/Strep (Capricorn), 0,01% EGF (Gibco) i 0,01% bFGF (Gibco) u modificiranom Coon Ham F12 mediju (Sigma-Aldrich)
- ploča sa 6 jažica s ultraslabim prijanjanjem
- inkubator

- autoklav
- hemocitometar
- centrifuga (Universal 320R, Hettich)
- mikroskop

Postupak:

Aspiriranjem je uklonjen GM i parentalne stanice su isprane PBS-om. Na sobnoj temperaturi je dodano 3 mL tripsin-EDTA u svrhu otpuštanja stanica iz formiranog sloja, nakon čega su stanice inkubirane na 37 °C u 5% CO₂ tijekom 4 minute. Reakcija tripsina je zaustavljena dodavanjem 10 mL GM. Stanice su zatim centrifugirane na 300 × *g* te po resuspendiranju taloga izbrojane pomoću hemocitometra.

Unaprijed je pripremljeno 2% MC u miliQ-H₂O koja se otapala 3 dana na 4°C, nakon čega je sterilizirana autoklaviranjem. MC-SGM je pripremljen miješanjem MC i SGM u jednakom omjeru do koncentracije od 1% MC.

Na ploču sa 6 jažica s ultraslabim prijanjanjem je dodano 5 mL MC-SGM i zasađeno 4x10⁴ stanica po jažici. Svaka 3 dana u svaku jažicu su dodavani EGF i bFGF do postizanja koncentracije od 10 ng/mL. Formiranje sarkosfera je fotografirano.

4.5. IZOLACIJA SARKOSFERA I UZGOJ DVIJU GENERACIJA MATIČNIH STANICA OSTEOSARKOMA

Materijali:

- sarkosfere uzgojene iz triju bioptata OS-a
- GM sastava: 10% FBS (Gibco) i 1% Pen/Strep (Capricorn) u modificiranom Coon Ham F12 mediju (Sigma-Aldrich)
- 40 µm najlonski procjeđivač (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- bFGF (Gibco)
- inkubator
- Petrijeve posude
- Mikroskop

Postupak:

Uzgojene sarkosfere su premještene na 40 µm najlonski procjeđivač pa se MC-SGM ocijedio pod utjecajem gravitacije. Jažice iz kojih su uzete sarkosfere su isprane 2 puta s 5 mL GM i sadržaj je procijeđen kroz stanični procjeđivač da bi se sačuvala sve sarkosfere. Procjeđivač je nakon toga stavljen u Petrijevu posudu, preokrenut za 180°, ispran s 10 mL GM i lagano protrešen kako bi se sarkosfere s njega otpustile. Sarkosfere u Petrijevoj posudi su zatim inkubirane u GM uz dodatak 10 ng/mL bFGF na 37 °C u 5% CO₂. Pod prijanjajućim uvjetima stanice iz sarkosfera su stvorile jedan sloj i kao takve predstavljaju prvu generaciju OS-TMS.

Opisani postupci formiranja i izolacije sarkosfera su ponovljeni i tako je dobivena druga generacija OS-TMS koje su korištene za nastavak istraživanja.

4.6. TEST IZBACIVANJA BOJE HOECHST 33342

Materijali:

- druga generacija OS-TMS izoliranih iz triju bioptata, stanične linije MMS i U2OS
- boja Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich)
- osnovni medij za kulturu stanica ovisno o tipu stanica (tablica 2)
- PBS (Gibco)
- ploče s 96 jažica
- GloMax čitač mikroploča (Promega)
- folija
- inkubator
- računalni program „Graph Pad Prism“

Tablica 2. Tipovi stanica i odgovarajući osnovni mediji za kulturu stanica.

Tipovi stanica	Osnovni medij za kulturu stanica	Dodatak staničnom mediju
U2OS	10% FBS (Gibco), 1% Pen/Strep (Capricorn) u modificiranom Dulbecco Eagle mediju (DMEM) – obogaćen glukozom (Sigma-Aldrich)	-
HEK 293	10% FBS (Gibco), 1% Pen/Strep (Capricorn) u modificiranom Dulbecco Eagle mediju (DMEM) – obogaćen glukozom (Sigma-Aldrich)	-
MMS	10% FBS (Gibco), 1% Pen/Strep (Capricorn) u modificiranom Dulbecco Eagle mediju (DMEM) – smanjene glukoze (Sigma-Aldrich)	0,01% bFGF (Gibco)
Parentalne stanice OS	10% FBS (Gibco), 1% Pen/Strep (Capricorn) u modificiranom Coon Ham F12 mediju (Sigma-Aldrich)	-
OS-TMS 1. generacija	10% FBS (Gibco), 1% Pen/Strep (Capricorn) u modificiranom Coon Ham F12 mediju (Sigma-Aldrich)	0,01% bFGF (Gibco)
OS-TMS 2. generacija	10% FBS (Gibco), 1% Pen/Strep (Capricorn) u modificiranom Coon Ham F12 mediju (Sigma-Aldrich)	0,01% bFGF (Gibco)

Postupak:

Ispitivanje izbacivanja boje Hoechst 33342 iz stanica provedeno je na drugoj generaciji OS-TMS izoliranih od triju bolesnika te na staničnim linijama MMS i U2OS.

Stanice su zasađene na ploču s 96 jažica u gustoći od 6×10^4 stanica po jažici u odgovarajućem mediju za kulturu stanica i inkubirane na 37 °C u 5% CO₂ tijekom 24 sata. Nakon što su stanice prionule uz podlogu, u svaku jažicu je dodano 100 µL odgovarajućeg medija za uzgoj stanica i 5 µg/mL boje Hoechst 33342. Ploča s jažicama je zatim pokrivena folijom zbog osjetljivosti na svjetlo boje Hoechst 33342 i inkubirana na 37 °C u 5% CO₂ tijekom 90 minuta. Nakon inkubiranja, uklonjen je supernatant i jažice su isprane s 100 µL odgovarajućeg medija za kulturu stanica. Medij je uklonjen aspiriranjem i zamijenjen sa 100 µL PBS.

Apsorbancije uzoraka su mjerene u GloMax čitaču mikroploča (ekscitacija 360 nm, emisija 450 nm). Rezultati su analizirani računalnim programom „Graph Pad Prism“.

4.7. MTT TEST VIJABILNOSTI STANICA

MTT test je kolorimetrijska metoda temeljena na mjerenju metaboličke aktivnosti stanica. Naime, pomoću staničnih dehidrogenaza u živim stanicama dolazi do redukcije MTT u plave kristale formazana (116).

Materijali:

- druga generacija OS-TMS izoliranih iz triju bioptata te stanične linije HEK 293, MMS i U2OS u osnovnom mediju za kulturu stanica ovisno o tipu stanica (tablica 2), s i bez dodatka bFGF
- tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich)
- askorbinska kiselina (AK)
- tetrazolijeva sol (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, MTT) (Sigma-Aldrich)
- dimetil-sulfoksid, DMSO (Roth)
- PBS (Gibco)
- miliQ-H₂O
- ploče s 96 jažica
- filter 0,22 µm
- GloMax čitač mikroploča (Promega)
- inkubator
- tresilica
- centrifuga (Universal 320R, Hettich)
- mikroskop
- računalni program „Graph Pad Prism“

Postupak:

Navedeni test je proveden na sljedećim vrstama stanica: drugoj generaciji OS-TMS izoliranih od triju bolesnika te staničnim linijama HEK 293, MMS i U2OS, koristeći stanični medij s i bez dodatka bFGF.

Stanice su pregledane, tripsinizirane i centrifugirane. Talog je resuspendiran u odgovarajućem staničnom mediju (do 2 mL) i stanice su izbrojane na hemocitometru prema protokolu dostupnom na mrežnoj stranici: <https://www.abcam.com/protocols/counting-cells->

[using-a-haemocytometer](#) (117). Stanice su zatim zasijane na ploču s 96 jažica u gustoći od 6×10^4 stanica po jažici u odgovarajućem mediju za uzgoj stanica i inkubirane preko noći na 37 °C u 5% CO₂, kako bi prionule uz podlogu.

Pripremljena je zaliha 100 mM AK otapanjem u miliQ-H₂O i filtriranjem kroz 0,22 µm filter. Ovako pripremljena zaliha AK je pohranjena na -20 °C i spremna za pripremu razrjeđenja AK potrebnih za pokuse.

Drugi dan stanice su tretirane AK-om u koncentracijama od 1, 5, 10, 15, 20, 25 i 30 mM u odgovarajućem staničnom mediju, s i bez dodatka bFGF, u triplicatima (osim stanica iz uzorka P3 koje su tretirane u duplikatima jer ih nije bilo dovoljno). Kontrolne stanice nisu tretirane AK-om. Nakon 24-satnog inkubiranja na 37 °C u 5% CO₂, medij je uklonjen aspiriranjem i stanice su 3 puta isprane PBS-om. U svaku jažicu je zatim dodano 40 µL MTT razrijeđenog 1x u odgovarajućem staničnom mediju, nakon čega su stanice inkubirane zaštićene od svjetla na 37 °C u 5% CO₂ tijekom 4 sata. Nakon inkubiranja, u svaku jažicu je dodano 170 µL DMSO i zatim su ploče s jažicama stavljene na tresilicu da bi se otopili kristali formazana.

Izmjeren je intenzitet apsorbancije na GloMax čitaču mikropločica pri 560 nm i analiziran pomoću programa „Graph Pad Prism“. Od dobivene apsorbancije pojedine jažice sa stanicama oduzeta je vrijednost apsorbancije slijepe probe i dobivena vrijednost koja je proporcionalna broju metabolički aktivnih stanica u toj jažici. Izračunat je relativni broj stanica u odnosu na kontrolne stanice. Vijabilnost stanica je izračunata kao postotak netretirane kontrole. Izračunata je i inhibitorna koncentracija AK pri kojoj je 50% stanica mrtvo (IC₅₀).

4.8. MJERENJE RAZINE REAKTIVNIH KISI KOVIH VRSTA

DCFH₂-DA se koristi za identifikaciju ROS, tj. ispitivanje unutarstaničnog oksidacijskog stresa *in vitro*. Nakon difuzije kroz staničnu membranu, esterase cijepaju acetatne skupine kako bi stvorile hidrofilniji 2',7'-diklorodihidrofluorescein (DCFH₂) koji se zadržava u citosolu. Oksidacija DCFH₂ daje visoko fluorescentni 2',7'-diklorofluorescein (DCF) koji se može mjeriti spektrofotometrijski (118).

Materijali:

- druga generacija OS-TMS izoliranih iz triju bioptata te stanične linije MMS i U2OS u osnovnom mediju za kulturu stanica (tablica 2), s i bez dodatka bFGF
- 2', 7'-diklorofluorescein – diacetat (DCFH₂-DA) (Sigma-Aldrich)

- PBS (Gibco)
- AK iz zalihe
- ploče s 96 jažica
- inkubator
- čitač mikropločica GloMax

Postupak:

Stanice su zasijane na ploču s 96 jažica u gustoći od 1×10^4 stanica po jažici i tretirane 1 mM AK-om iz pripremljene zalihe, u mediju s i bez dodatka bFGF. Medij je izmjenjivan svaka 2 dana tijekom 7 dana (ukupno 4 izmjene medija). Sedmoga dana tretmana stanicama je izmijenjen medij te je mjerena razina ROS i to nakon 3 sata od zadnje izmjene medija. Stanice su 3 puta isprane PBS-om, dodano im je zatim 20 μ M DCFH₂-DA te su inkubirane na 37 °C tijekom 30 minuta u tamnoj prostoriji. Koristeći čitač mikropločica GloMax, izmjerena je fluorescencija temeljena na oksidaciji DCFH₂-DA pri 485/535 nm. Izmjerene fluorescencije su normalizirane na koncentraciju proteina pojedine jažice.

4.9. WESTERN BLOT ANALIZA PRISUTNOSTI GLICERALDEHID-3-FOSFAT DEHIDROGENAZE (GAPDH)

Western blot je metoda za identifikaciju i određivanje prisutnosti malih količina određenog proteina. Tehnika se temelji na ostvarivanju kompleksa antigena i protutijela pri čemu se protutijelo veže na antigen na sintetskoj membrani (119).

4.9.1. Citoliza i izolacija proteina

Materijali:

- druga generacija OS-TMS izoliranih iz triju bioptata u osnovnom mediju za kulturu stanica (tablica 2), s i bez dodatka bFGF
- tripsin-EDTA
- AK iz zalihe
- CellLytic™ M (Sigma-Aldrich)
- tekući koktel inhibitora proteaza (Thermo Fisher)

- PBS (Gibco)
- tekući dušik
- ploče sa 6 jažica
- inkubator
- zamrzivač
- centrifuga (Universal 320R, Hettich)

Postupak:

OS-TMS su zasijane na ploču sa 6 jažica u gustoći od $4,8 \times 10^4$ stanica po jažici. Stanice su zatim inkubirane na 37 °C u 5% CO₂ tijekom 24 sata da bi se prihvatile. Stanice u kontrolnim jažicama su tretirane samo medijem, odnosno medijem uz dodatak bFGF, dok su stanice iz druge dvije jažice tretirane 1 mM AK-om, također s i bez dodatka bFGF. Medij je izmjenjivan svaka 2 dana kroz 7 dana (ukupno 4 izmjene medija). Po završetku tretmana, stanice su tripsinizirane. U svaku jažicu je dodano 1mL otopine tripsin-EDTA i ploča s jažicama je inkubirana na 37 °C u 5% CO₂ tijekom 4 minute. Tripsin se neutralizirao dodavanjem 1mL GM i sadržaj je prebačen u čiste epruvete. Epruvete su centrifugirane na 450 x *g* i 4 °C tijekom 10 minuta. Supernatant je uklonjen aspiriranjem, a ostao je talog. Stanice u talogu su zatim lizirane dodavanjem 50 µL reagensa CellLytic™ M kojem su prethodno dodani inhibitori proteaza (1%). Talog je resuspendiran te je suspenzija prebačena u čiste epruvete koje su zamrznute na -20 °C. Metodom ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja koristeći tekući dušik, izolirani su proteini. Ciklusi su odrađeni 3 puta centrifugirajući epruvete s uzorkom na 20 000 x *g* i 4 °C tijekom 15 minuta svaki put prije zamrzavanja. Supernatant s izoliranim proteinima je prebačen u čiste epruvete.

4.9.2. Određivanje koncentracije proteina korištenjem bicinkoninične kiseline

Materijali:

- bicinkoninična kiselina (engl. *bicinchoninic acid*, *BCA*) (Sigma-Aldrich)
- radni reagens Amersham ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences)
- miliQ-H₂O

- ploče s 96 jažica
- inkubator
- GloMax čitač mikropločica

Postupak:

Za određivanje koncentracije proteina korišteni su BCA i radni reagens. Reagensi A i B su pomiješani u omjeru 50 : 1 i pohranjeni na tamnom mjestu. Uzorci su razrijeđeni 5 puta u miliQ-H₂O. Na ploču s 96 jažica u svaku jažicu je dodano po 10 µL standarda i razrijeđenog uzorka te je dodano 200 µL radnog reagensa AB. Ploča s uzorcima je inkubirana na 37 °C tijekom 30 minuta, a zatim još 5 minuta na sobnoj temperaturi.

Apsorbancije jažica su mjerene koristeći GloMax čitač mikropločica pri 560 nm. Izmjerena apsorbancija je izravna funkcija količine proteina. Nepoznata koncentracija svakog uzorka izračunata je usporedbom vrijednosti njegove apsorbancije sa standardnom krivuljom.

4.9.3. Razdvajanje proteina natrij dodecil sulfat - poliamidakril gel elektroforezom (SDS-PAGE)

Materijali:

- epruvete s proteinima izoliranim iz triju uzoraka OS-TMS
- pufer za denaturaciju proteina koji sadrži 0,1% SDS (engl. *sodium dodecyl sulphate*) i β-merkaptoetanol
- stakalca, stalak i češljic za izlijevanje gelova
- poliakrilamidni gel za elektroforezu (tablica 3)
- pufer za elektroforezu sastava: 3,03 g Tris, 14,4 g glicina, 10 mL 10% SDS i do 1L destilirane vode
- izopropanol
- obilježavač Blue Protein Standard, 11-190 kDa, Broad Range (BioLabs)
- termoblok
- led

Tablica 3. Sastavi gelova za sabijanje i razdvajanje.

Gel za sabijanje (4%)		Gel za razdvajanje (10%)	
1 M Tris-HCl pH 8,8	2,35 mL	0,375 M Tris-HCl pH 6,8	1050 µL
10% SDS	62,5 µL	10% SDS	31,25 µL
miliQ H ₂ O	1,625 mL	miliQ H ₂ O	1158 µL
30 % akrilamid/bisakrilamid	2,08 mL	30 % akrilamid/bisakrilamid	418 µL
Temed	1,56 µL	Temed	1,25 µL
APS	156 µL	APS	250 µL

Postupak:

Prije nanošenja izoliranih proteina na gel za elektroforezu, izračunat je volumen koji sadrži 3 µg proteina te je taj volumen pomiješan u omjeru 1:1 s puferom za zagrijavanje proteina koji sadrži SDS radi denaturacije. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani na 95 °C tijekom 5 minuta u termobloku, a zatim ohlađeni na ledu.

Za provođenje elektroforeze pripremljen je gel koji se sastoji od 4% gela za sabijanje i 10% gela za razdvajanje. Najprije je izliven gel za razdvajanje koji je prekriven izopropanolom. Nakon njegove polimerizacije je uklonjen izopropanol i nanešen je gel za sabijanje i češljčić koji će formirati jažice za nanošenje uzoraka. Po polimerizaciji gela, sklopljen je sustav za provođenje elektroforeze tako da je niži rub stakla u kojem se nalazi gel smješten prema unutrašnjem dijelu. Zatim je uklonjen češljčić iz gela te je odjeljak napunjen puferom za elektroforezu (pH 8,3) koji je dodan u sustav tako da potopi jažice. Denaturirani uzorci i obilježivač su nanešeni u jažice te je pokrenuta elektroforeza. Elektroforeza se odvijala na sobnoj temperaturi pri 180 V tijekom sat vremena.

4.9.4. Prijenos proteina na membranu

Materijali:

- pufer za prijenos proteina na membranu sadrži: 3,03 g Tris, 14,4 g glicina, 200 mL metanola i do 1 L destilirane vode
- nitrocelulozne membrane (GE Healthcare Life Sciences)
- katoda XCell IITM Blot Module (Invitrogen)
- filter papiri
- spužvice za elektroforezu

- boja Ponceau S (Sigma-Aldrich)
- pufer TBST za blokiranje membrane sastava: 10 mL 1 M Tris (pH 8,0), 18,75 mL 4 M NaCl, 500 μ L Tween-20 i 500 mL destilirane vode
- bezmasno mlijeko
- primarno protutijelo na GAPDH (Sigma-Aldrich)
- sekundarno zečje IgG, HRP-vezano protutijelo (Cell Signaling, #7074)
- plastična folija
- reagensi: Clarity Western Peroxide i Clarity Western Luminol/Enhancer (Biorad)
- kazete za nitrocelulozne membrane
- Kodak razvijač i fiksativ (Sigma-Aldrich)

Postupak:

Četiri spužvice i jedan filter papir prethodno namočeni u puferu za prijenos proteina su stavljeni na katodu XCell IITM Blot Module. Nakon elektroforeze, na filter papir su stavljena stakalca s gelom, a na njih nitrocelulozna membrana koja se također prethodno namakala u puferu za prijenos proteina. Mjehurići zraka su otklonjeni rolajući stakleni valjak preko površine membrane. Na membranu je zatim stavljen drugi prednamočeni filter papir i još tri spužvice. Sve je poklopljeno anodnom pločom i učvršćeno u sustav za prijenos. Prijenos proteina se odvijao na 10 V i + 4 °C tijekom noći.

Idući dan, jedinica se odvoji i membrana se inkubira bojom Ponceau S tijekom 5 minuta da se vizualiziraju proteini prenešeni na membranu. Boja s membrane se uklonila trominutnim ispiranjem u puferu TBST. Uslijedilo je blokiranje membrane u 5% bezmasnom mlijeku otopljenom u puferu TBST tijekom sat vremena. Nakon blokiranja, membrana je isprana u puferu TBST, 2 puta po 5 minuta. Primarno protutijelo na GAPDH je razrijeđeno u 0,5% bezmasnom mlijeku otopljenom u TBST u omjeru 1 : 5 000 te je membrana njime inkubirana na 4 °C tijekom noći. Idući dan membrana je ispirana 3 puta TBST-om po 5 minuta. Slijedilo je inkubiranje membrane sa sekundarnim protutijelom (sekundarno zečje IgG, HRP-vezano protutijelo) koje je razrijeđeno u omjeru 1 : 2 000 u 0,5% bezmasnom mlijeku i puferu TBST. Inkubacija je trajala sat vremena na sobnoj temperaturi, a potom je membrana ispirana 3 puta puferom TBST po 5 minuta. Membrana je ostavljena da se osuši na papiru, nakon čega je umotana u plastičnu foliju.

Pripremljena je mješavina reagensa Clarity Western Peroxide i Clarity Western Luminol/Enhancer u jednakim omjerima koja je zatim izlivena po membrani i prekrivena folijom kako bi se inkubirala tijekom 3 minute u kazeti. Mješavina reagensa je potom uklonjena, a membrana zamotana u čistu plastičnu foliju i stavljena u kazetu, pazeći da nema zarobljenih mjehurića zraka. Kazeta s membranom je prenešena u tamnu komoru radi postupka vizualizacije. Na membranu u kazeti je prslonjen film za autoradiografiju i inkubiran tijekom 15 sekundi. Potom je film uronjen u otopinu razvijачa te se pratila pojava pruga na filmu. Kad su se počele pojavljivati pruge, film je ispran u vodi i uronjen u fiksativ.

4.10. ODREĐIVANJE VRSTE STANIČNE SMRTI UZROKOVANE ASKORBINSKOM KISELINOM POMOĆU PROTOČNOG CITOMETRA

Aneksin-V-fluorescein i propidij jodid (PI) omogućuju razlikovanje živih stanica, zatim stanica u ranoj apoptozi i nekrotičnih stanica. U ranoj apoptozi fosfatidilserin se premješta s unutrašnje strane na vanjsku stranu membrane te se tako izložen na površini stanice može detektirati pomoću aneksina V koji se veže za fosfatidilserin. Fosfatidilserin se premješta na površinu stanice i u nekrozi. Za razlikovanje nekrotičnih stanica od apoptotičnih koristi se PI jer on ulazi samo u nekrotične stanice gdje se veže za DNA (120).

Materijali:

- druga generacija OS-TMS izoliranih iz triju bioptata te stanične linije HEK 293, MMS i U2OS u osnovnom mediju za kulturu stanica ovisno o tipu stanica (tablica 2), s i bez dodatka bFGF
- PBS (Gibco)
- AK iz zalihe
- tripsin-EDTA
- „Muse Annexin and Dead Cell Assay Kit“ (Luminex)
- pufer za vezivanje aneksina V (BD Pharmingen)
- propidij jodid (PI)
- protočni citometar
- ploče sa 6 jažica

- inkubator
- centrifuga (Universal 320R, Hettich)
- led

Postupak:

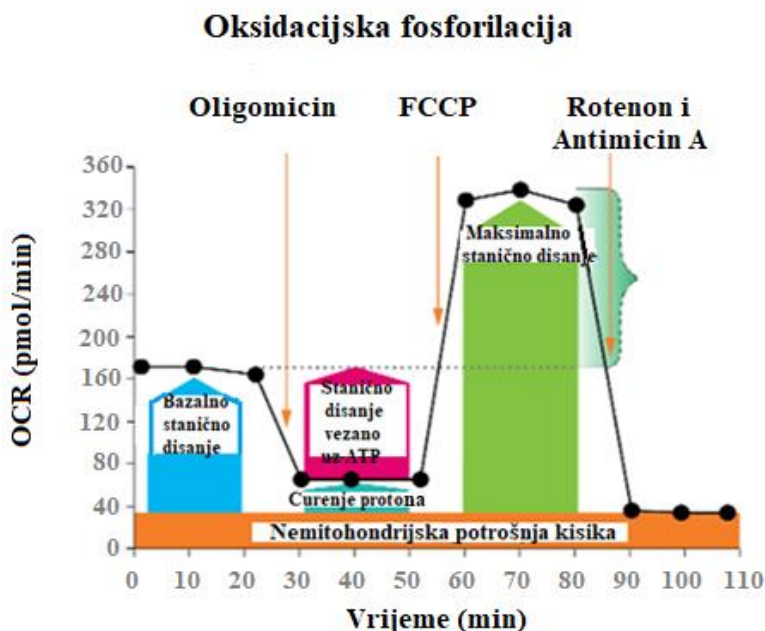
Stanice su zasijane na ploču sa 6 jažica u gustoći od 6×10^4 stanica po jažici i tretirane s 10 mM AK te inkubirane na 37 °C u 5% CO₂ tijekom 24 sata. Kontrolne stanice nisu tretirane nego im je samo dodan odgovarajući medij. Nakon inkubiranja, sadržaj iz jažica je prebačen u epruvete zapremine 15 mL, jažice su isprane 1 mL PBS-om i taj sadržaj je pridružen u epruvete. Dodano je 1 mL tripsina i stanice su inkubirane na 37 °C u 5% CO₂ tijekom 4 minute. Tripsin je neutraliziran dodatkom 1mL GM. Epruvete su centrifugirane brzinom 400 x *g* na 4°C tijekom 10 minuta. Epruvete su zatim odložene na led. Supernatant je uklonjen aspiriranjem, a talog resuspendiran u 1 mL PBS. Epruvete su ponovno centrifugirane brzinom 400 x *g* na 4°C tijekom 10 minuta. Supernatant je uklonjen aspiriranjem, a talog resuspendiran u puferu za vezanje aneksina V te je dobivena suspenzija prebačena u epruvete s utorom za protočni citometar. U jednu epruvetu je dodano 5 µL aneksina V, u drugu 5 µL PI, u treću 5 µL aneksina V i 5 µL PI, a u četvrtu samo pufer. Epruvete su inkubirane na sobnoj temperaturi u mraku tijekom 15 minuta i u svaku epruvetu je dodano po 400 µL pufera za vezanje aneksina V. Analiza protočnim citometrom je obavljena unutar jednoga sata. Za analizu su korišteni plavi (zeleno obojenje) i zeleni filter (crveno obojenje).

4.11. ODREĐIVANJE METABOLIČKOG PROFILA STANICA POMOĆU UREĐAJA SEAHORSE XF

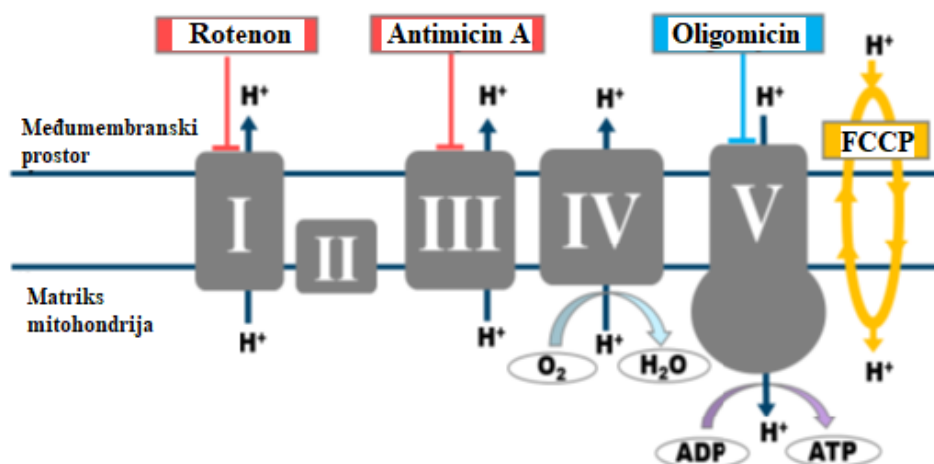
Uređaj Seahorse mjeri potrošnju kisika kao mjeru oksidacijske fosforilacije i zakiseljavanja okoliša kao mjeru glikolize te na osnovi tih podataka stvara metabolički profil stanica. Dodatkom metaboličkih stresora mjeri se potencijal oksidacijske fosforilacije i glikolize stanica.

Oligomicin inhibira ATP sintazu (kompleks V) i prvi se ubrizgava nakon početnog mjerenja razine kisika. On smanjuje protok elektrona kroz lanac za prijenos elektrona što rezultira smanjenjem mitohondrijskog disanja, odnosno razine potrošnje kisika (engl. *oxygen consumption rate*, OCR). Ovo smanjenje OCR je povezano s proizvodnjom staničnog ATP.

Karbonil cijanid-4-trifluorometoksi-fenilhidrazon (FCCP) je sredstvo za odvajanje koje utječe na gradijent protona i ometa potencijal mitohondrijske membrane. Dodaje se nakon oligomicina. Rezultat toga je neometan protok elektrona kroz lanac za prijenos elektrona, a potrošnja kisika kompleksom IV doseže maksimum. FCCP-om stimulirani OCR se može koristiti za izračun rezervnog respiratornog kapaciteta, definiranoga kao razlike između maksimalnog i bazalnog staničnog disanja. Rezervni respiratorni kapacitet je mjera sposobnosti stanice da odgovori na povećanu potražnju za energijom pod stresom. Na kraju se ubrizgava mješavina rotenona, inhibitora kompleksa I i antimicina A, inhibitora kompleksa III. Ova kombinacija isključuje mitohondrijsko disanje i omogućuje izračun nemitohondrijskog disanja (slike 17 i 18).

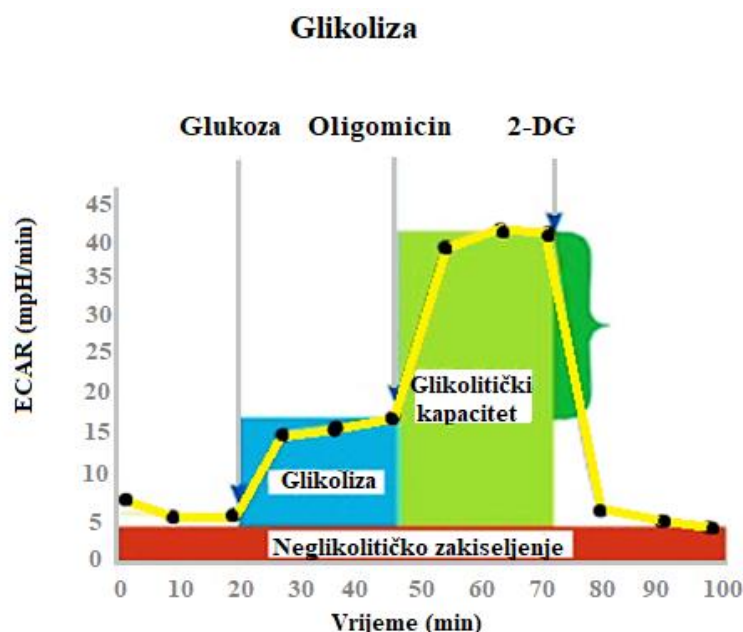


Slika 17. Grafički prikaz metaboličkog profiliranja oksidacijske fosforilacije pomoću „Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test“. Prilagođeno prema https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Cell_Mito_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf. Slika 1, Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test profile, showing the key parameters of mitochondrial function; str. 6.

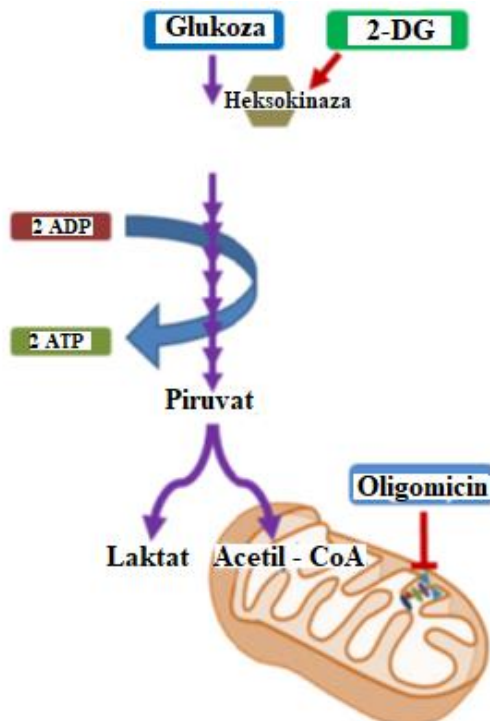


Slika 18. Shematski prikaz mjesta djelovanja modulatora u lancu prijenosa elektrona korištenih u „Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test“. Prilagođeno prema https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Cell_Mito_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf. Slika 2. Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test modulators of the ETC; str. 6.

Mjerenje brzine zakiseljavanja (engl. *extracellular acidification rate*, ECAR) se provodi tako da se najprije stanice inkubiraju u testnom mediju za glikolizu bez glukoze ili piruvata i izmjeri se ECAR koji označava neglikolitičko zakiseljenje. Zatim se doda glukoza koju će stanice katabolizirati glikolizom do piruvata, stvarajući ATP, NADH, vodu i protone. Izlazak protona u okolni medij uzrokuje povećanje ECAR. Ovaj odgovor izazvan glukozom označava glikolizu u bazalnim uvjetima. Nakon toga se doda oligomicin koji inhibira mitohondrijsku proizvodnju ATP pa se za proizvodnju energije koristi glikoliza i tako dolazi do dodatnog povećanja ECAR, što označava maksimum glikolitičkog kapaciteta stanice. Na kraju se dodaje 2-DG, analog glukoze koja inhibira glikolizu kompetitivnim vezanjem za glukoza heksokinazu, prvi enzim u glikolitičkom putu. Kao posljedica toga dolazi do smanjenja ECAR što potvrđuje da je ECAR u pokusu rezultat glikolize. Razlika između glikolitičkog kapaciteta i brzine glikolize određuje glikolitičku rezervu (slike 19 i 20).



Slika 19. Grafički prikaz metaboličkog glikolitičkog profiliranja pomoću „Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Test“. Prilagođeno prema https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Glycolysis_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf. Slika 1. Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Test profile of the key parameters of glycolytic function; str. 7.



Slika 20. Shematski prikaz mjesta djelovanja modulatora glikolize korištenih u „Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Test“. Prilagođeno prema https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Glycolysis_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf. Slika 2. Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Test Modulators of Glycolysis; str.7.

4.11.1. Određivanje vrste staničnog metabolizma

Materijali:

- druga generacija OS-TMS izoliranih iz triju bioptata te stanične linije HEK 293, MMS i U2OS u osnovnom mediju za kulturu stanica ovisno o tipu stanica (tablica 2), s i bez dodatka bFGF
- 10 mM AK
- bicinkoninična kiselina (engl. *bicinchoninic acid*, *BCA*) (Sigma-Aldrich)
- tekući koktel inhibitora proteaza (Thermo Fisher)
- Agilent Seahorse XF mikroploča za kulturu stanica s 24 jažice i umetak koji sadrži senzor
- „Seahorse XF Cell Energy kit“
- testni medij sastava: 1 mM piruvata (Gibco), 2 mM glutamina (Gibco) i 10 mM glukoze (Fluka Analytical) i osnovni medij (Seahorse XF Base Medium)
- CellLytic™ M (Sigma-Aldrich)
- tripsin-EDTA
- tekući koktel inhibitora proteaza (Thermo Fisher)
- PBS (Gibco)
- tekući dušik
- centrifuga (Universal 320R, Hettich)
- inkubator
- računalni program „Wave Desktop“

Postupak:

Dva dana prije analize, stanice su zasijane na ploču s 24 jažice u gustoći od 6×10^4 stanica po jažici u 200 μ L odgovarajućeg medija za staničnu kulturu. Broj stanica je određen pomoću priručnika dostupnog na mrežnoj stranici: <https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/how-to-run-an-assay> (121). Medij bez dodataka je stavljen u jažice za korekciju pozadine. Ploča je ostavljena tijekom sat vremena na sobnoj temperaturi u odjeljku za kulturu tkiva. Stanice su tretirane s 10 mM AK i inkubirane na 37 °C u 5% CO₂ tijekom 24 sata. Kontrolne stanice nisu tretirane.

Za ispitivanje staničnog metaboličkog fenotipa su korišteni pripadajući kompleti „Seahorse XF Cell Energy kit“ i priručnici s uputama o njihovom korištenju dostupni na mrežnim stranicama:

https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Cell_Mito_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf (122) i

https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Glycolysis_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf (123).

Važan analitički dio XF platforme je umetak koji sadrži senzor i koji se mora hidratizirati dan prije analize. U svaku jažicu ploče koja je korištena pri analizi stavljeno je 1 mL XF kalibranta te je na pomoćnu ploču postavljena tzv. „Hydro Booster“ ploča. Umetak sa senzorom je spušten u pomoćnu ploču kroz otvore na „Hydro Booster“ ploči bivajući tako potopljen u XF kalibrant. Platforma sa senzorom je stavljena u inkubator na 37 °C bez CO₂ tijekom noći. „Hydro Booster“ ploča je uklonjena prije mjerenja.

Pripremljen je testni medij koji se čuvao do uporabe na 37 °C. Neposredno prije početka analize, stanice su 2 puta isprane tako da je iz svake jažice uklonjeno sve osim 50 µL pripadajućeg medija za staničnu kulturu da bi se spriječila dehidracija stanica. Zatim je dodan testni medij do volumena od 1 mL i na kraju do konačnog volumena od 500 µL. Sat vremena prije ispitivanja ploča sa zasijanim stanicama je odložena u inkubator na 37°C bez CO₂.

Tijekom inkubiranja je pripremljena mješavina stresora uključenih u komplet „Seahorse XF Cell Energy kit“. Oligomicin i FCCP su otopljeni u mediju za ispitivanje do konačne koncentracije od 100 µM i kombinirani u odgovarajućim količinama da se dobije jedinstvena 10x otopina. Mješavina stresora u volumenu od 56 µL je stavljena u svaki tzv. „port A“ hidratiziranog umetka koji sadrži senzor. Napunjeni umetak koji sadrži senzor s pomoćnom pločom je stavljen u analizator Seahorse XF te je započeta kalibracija umetka. Nakon kalibracije, navedeni umetak je ostavljen unutar Seahorse XF analizatora, a pomoćna ploča je uklonjena i umjesto nje je stavljena mikroploča sa staničnim kulturama. Ispitivanje staničnog metaboličkog fenotipa koristeći Seahorse XF je učinjeno prema uputama proizvođača. Rezultati su analizirani pomoću računalnog programa „Wave Desktop“.

Normalizacija XF testa temeljena je na količini ukupnih staničnih proteina koja je mjerena opisanim testom BCA. Prvi korak bila je liza stanica. Medij iz svake jažice koji je sadržavao uzorak iz Seahorse je prebačen u čistu epruvetu i ispran s 2 mL PBS koji je također stavljen u epruvetu. U svaku jažicu je dodan 1 mL otopine tripsina-EDTA i inkubiran na 37 °C tijekom 4 minute. Tripsin je neutraliziran s 1 mL medija i taj sadržaj je prebačen u epruvete. Jažice su još jednom isprane s 2 mL PBS i sadržaj je prebačen u epruvete koje su centrifugirane

na 450 x g i 4 °C tijekom 10 minuta. Supernatant je uklonjen aspiriranjem. U zasebnoj epruveti su pomiješani reagens CellLytic™ M s koktelom inhibitora proteaza u omjeru 100 : 1. Zapremine su izračunate na temelju broja uzoraka. Zatim su talogu dodani 30 µL mješavine CellLytic™ M i koktela inhibitora proteaza, talog je resuspendiran, prebačen u čiste epruvete i zamrznut na -20 °C. Za izolaciju proteina korištena je metoda ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja. Zamrzavanje staničnih lizata je provedeno korištenjem tekućeg dušika. Postupak je ponovljen 3 puta uz centrifugiranje uzoraka svaki put prije zamrzavanja. Epruvete s uzorcima su centrifugirane na 20 000 x g pri 4 °C tijekom 15 minuta. Supernatant koji je sadržavao izolirane proteine je prebačen u čiste epruvete. Opisani test BCA je korišten za kvantificiranje količine proteina izdvojenih iz Seahorse uzoraka. Pokus je napravljen koristeći stanični medij s i bez dodatka bFGF (86, 124).

4.11.2. Ispitivanje učinka askorbinske kiseline na stanični metabolizam

ECAR vrijednost predstavlja očitavanje pH medija koji odražava nakupljanje mliječne kiseline i bikarbonata, dok je OCR određen razinom izvanstaničnog kisika. ECAR i OCR su mjereni u osnovnim i stresnim uvjetima za netretirane stanice i stanice tretirane 10 mM AK-om tijekom 24 sata. Osnovni OCR i ECAR su izmjereni na početku, a zatim su izmjerene vrijednosti nakon dodavanja mješavine stresora u svaku jažicu. Mjerenja su pokazala tri ključna parametra metabolizma stanične energije: osnovni fenotip, fenotip u stresu i metabolički potencijal za tretirane stanice u usporedbi sa stanicama koje nisu tretirane AK-om, s i bez dodatka bFGF. Metabolički potencijal označava reakciju stanice na induciranu potražnju za energijom. Jažice s najmanje jednim negativnim mjerenjem vrijednosti OCR ili ECAR su isključene iz analize jer negativne vrijednosti fizički nisu moguće. Zbog varijabilnosti broja stanica od jažice do jažice i osjetljivosti Seahorse XF analizatora na male promjene u vrijednostima OCR i ECAR, dobiveni podaci su normalizirani na sakupljanje proteina nakon analize.

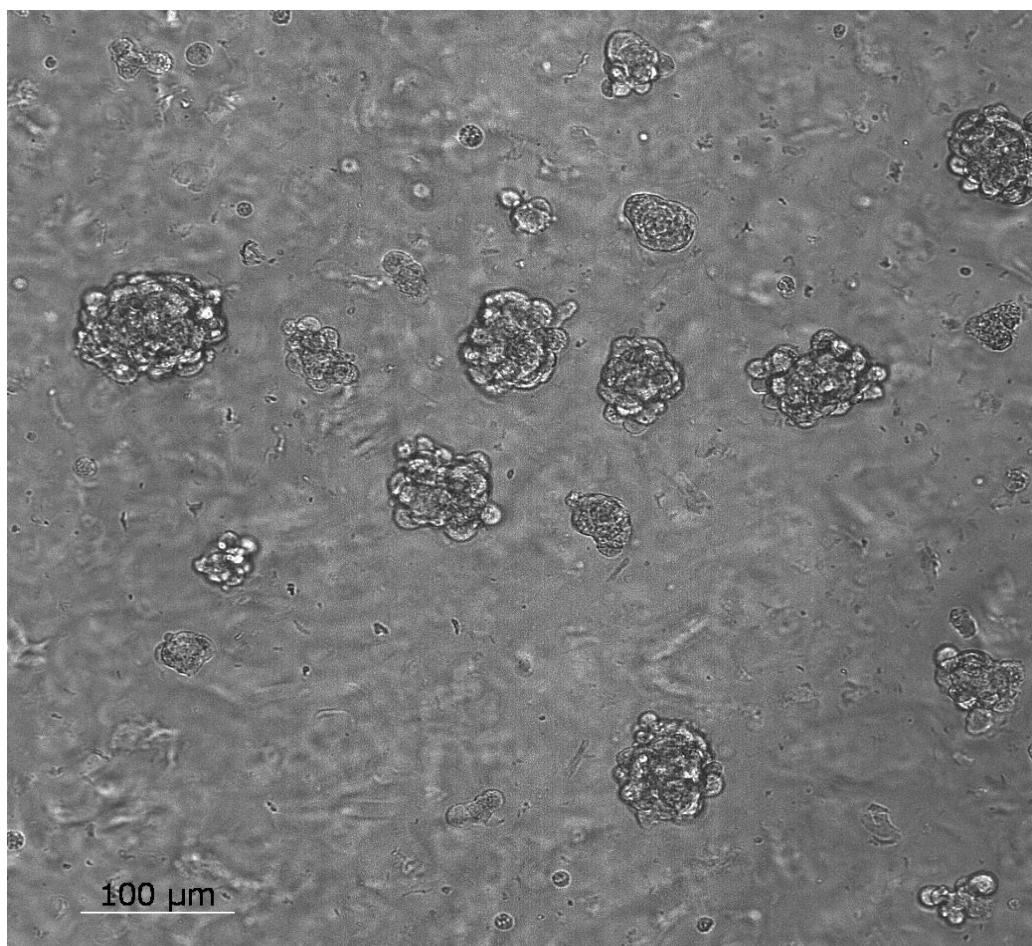
Kao što je navedeno u korisničkom vodiču proizvođača, visoko aerobne stanice su podložne proizvodnji CO₂ kad su u stresnim uvjetima. Ovaj pozadinski učinak CO₂ može pridonijeti ECAR i predstavljati pojačan glikolitički doprinos metaboličkom potencijalu. Stanice s omjerom OCR/ECAR < 4 u osnovnim uvjetima su identificirane kao stanice koje proizvode CO₂ što neznatno doprinosi vrijednosti ECAR. S druge strane, metabolizam stanica s omjerom OCR/ECAR > 4 u osnovnim uvjetima, a koje imaju naglašenu ECAR vrijednost, mogao bi uključivati i oksidacijsku fosforilaciju i glikolizu (86, 124).

5. REZULTATI

5.1. PROCJENA MATIČNOSTI STANICA IZOLIRANIH IZ UZORAKA TUMORSKIH TKIVA

5.1.1. Formiranje sarkosfera

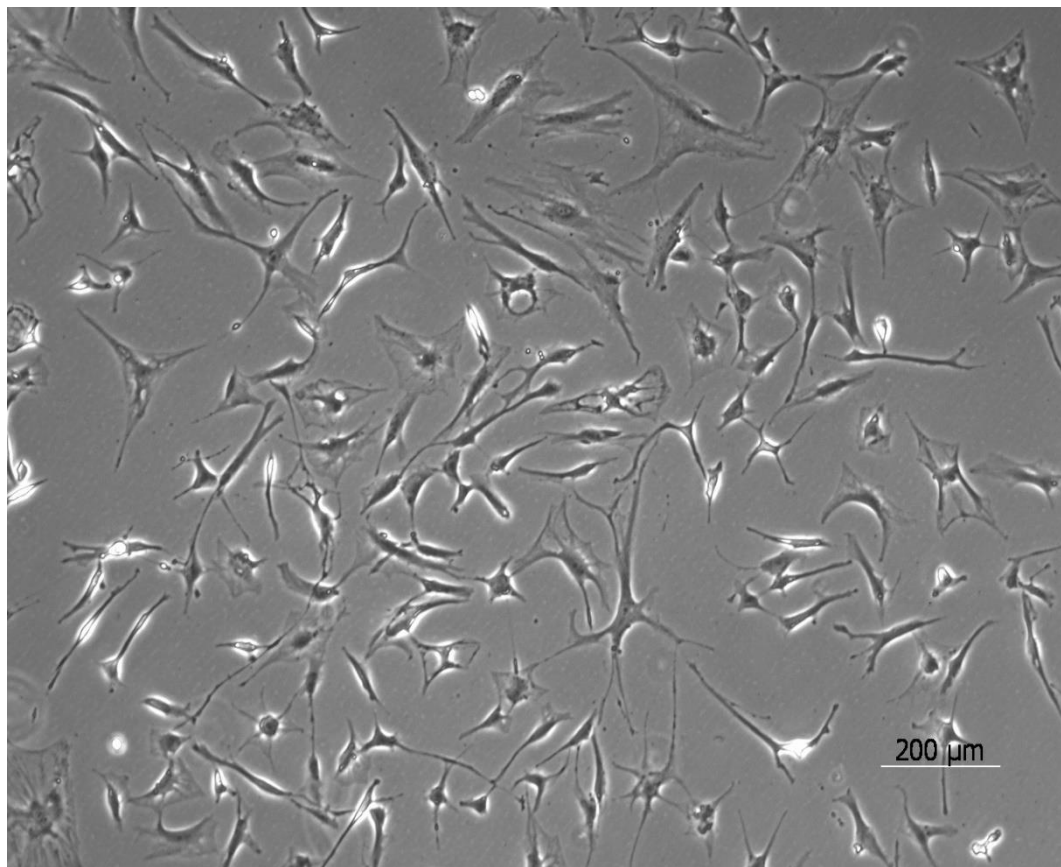
Svojstvo matičnosti OS-TMS se očituje u formiranju sarkosfera, stoga je tehnika formiranja sarkosfera korištena pri izolaciji OS-TMS iz bioptata. Uzgoj stanica OS u neprijanjajućim i nutritivno nedostatnim uvjetima bez seruma kod diferenciranih stanica je uzrokovao apoptozu, dok su OS-TMS preživjele i nastavile proliferirati (slika 21). Sfere uzoraka P1 i P2 su rasle oko 30 dana, dok su sfere uzorka P3 rasle vrlo sporo i do 90 dana.



Slika 21. Sarkosfere u kulturi stanica u neprijanjajućim uvjetima snimljene svjetlosnim mikroskopom. Zavod za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

5.1.2. Formiranje jednog sloja tumorskih matičnih stanica

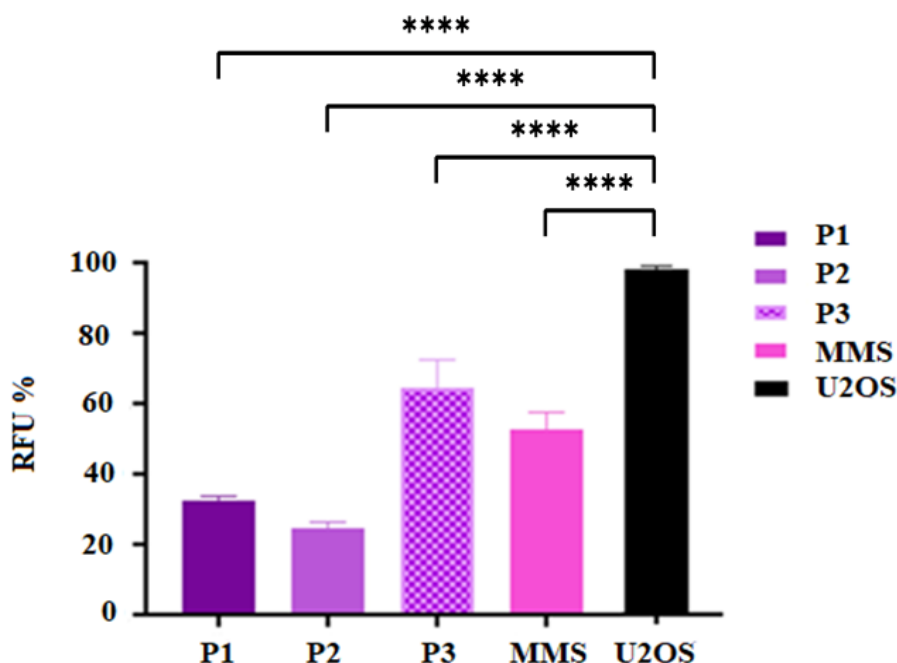
Ponovnom uspostavom prijanjajućih uvjeta, stanice iz sarkosfera su se umnožile formirajući jedan sloj OS-TMS na dnu boce T-75 (slika 22).



Slika 22. Matične stanice osteosarkoma u jednom sloju u prijanjajućim uvjetima snimljene svjetlosnim mikroskopom. *Zavod za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*

5.1.3. Izbacivanje boje Hoechst 33342

Bojenje stanica bojom Hoechst 33342 je korišteno da bi ispitali prisutnost SP stanica u uzorcima P1, P2 i P3, odnosno za potvrdu matičnosti tumorskih stanica iz druge generacije sarkosfera. Zadržavanje boje je kvantificirano mjerenjem fluorescencije boje koja je ostala unutar stanica i izraženo je kao postotak relativne jedinice fluorescencije (engl. *relative fluorescence units, RFU*) uz normalizaciju prema U2OS. U2OS su zadržale boju (negativna kontrola) za razliku od matičnih stanica MMS (pozitivna kontrola) i OS-TMS koje su pokazale sposobnost izbacivanja boje (slika 23). Redoslijed uzoraka prema sposobnosti izbacivanja boje se može izraziti kao $P2 > P1 > MMS > P3$.



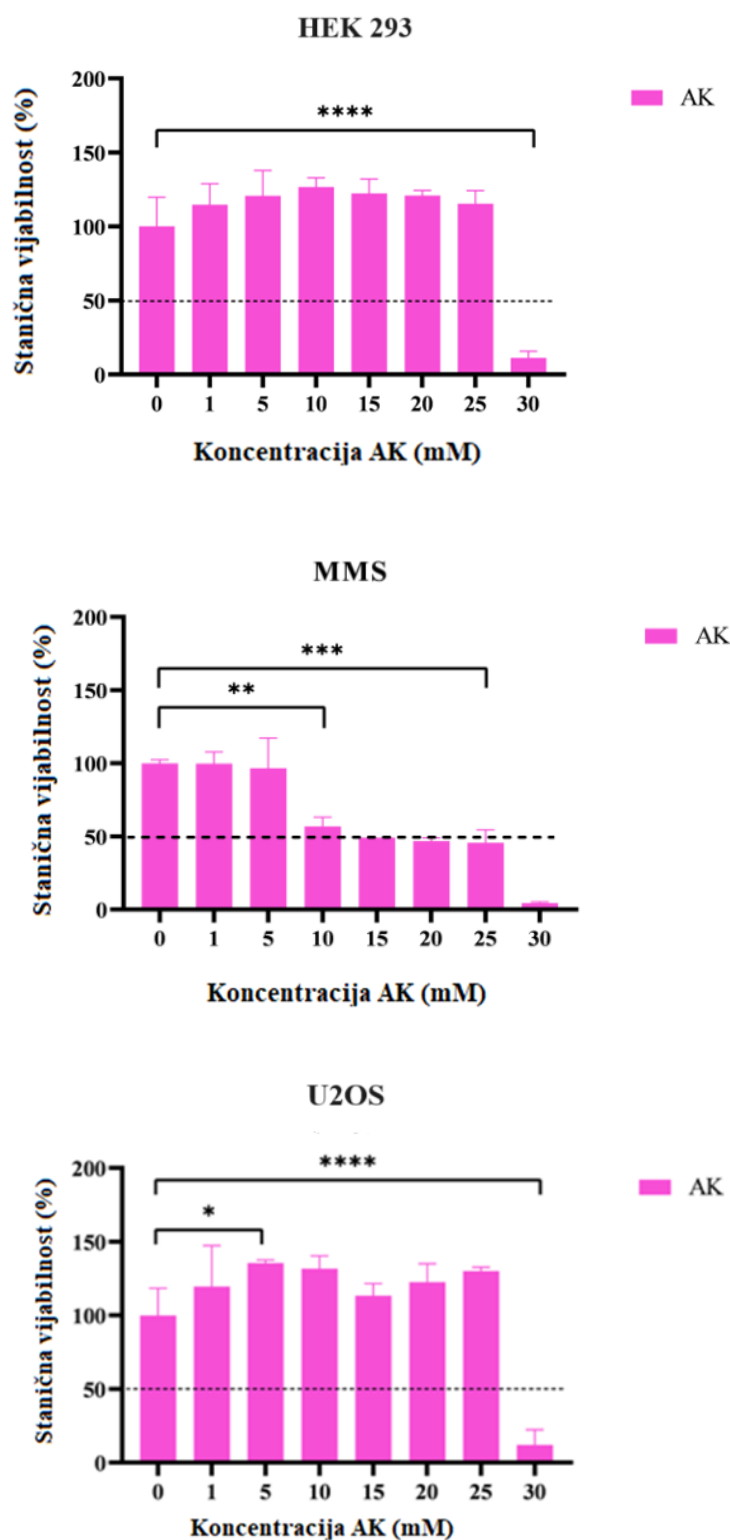
Slika 23. Grafički prikaz rezultata testa izbacivanja boje Hoechst 33342. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u postotku relativne jedinice fluorescencije % RFU u odnosu na staničnu liniju osteosarkoma U2OS se opaža u ispitivanim uzorcima P1, P2, P3 te normalnim linijskim mezenhimskim matičnim stanicama MMS.

5.2. UČINAK ASKORBINSKE KISELINE NA VIJABILNOST STANICA

MTT test je korišten za proučavanje učinka AK na vijabilnost OS-TMS uzgojenih iz triju uzoraka što je uspoređeno s vijabilnošću staničnih linija HEK 293, MMS i U2OS tretiranih AK-om. Korišten je i za određivanje koncentracije AK koja uzrokuje smrt 50% stanica (IC_{50}). Ispitivanja su provedena na triplikatima staničnih uzoraka (osim uzorka P3 kod kojega je ispitivanje provedeno na duplikatima staničnih uzoraka) zasađenima u gustoći od 6×10^4 stanica po jažici i tretiranim tijekom 24 sata koncentracijama od 1, 5, 10, 15, 20, 25 i 30 mM AK iz prethodno pripremljene zalihe AK. Kontrolne stanice nisu tretirane AK-om (0 mM). Grafički je prikazan postotak živih (vijabilnih) stanica HEK 293, MMS i U2OS u odnosu na koncentraciju AK (slika 24).

Odgovor HEK 293 i U2OS je bio takav da se na grafičkim prikazima uočava vrlo nagli prijelaz na smanjenje vijabilnosti stanica kad su tretirane s 30 mM AK pa se zato njihova IC_{50} vrijednost ne može izračunati. Postotak živih HEK 293 stanica je ostao oko ili iznad 100% sve dok koncentracija AK nije dosegla 30 mM. Za tu posljednju koncentraciju od 30 mM postotak živih stanica bio je približno 5%. Vijabilnost MMS je smanjena već nakon 5 mM AK i varirala je na oko 50% za koncentracije između 10 mM i 25 mM AK sve dok nije pala na gotovo 0% kad su stanice tretirane s 30 mM AK. Stanice U2OS su pokazale blagi porast vijabilnosti pri tretmanu od 1 mM do 25 mM AK (najznačajnije pri 5 mM), a koja je drastično opala kad se koncentracija povećala na 30 mM.

Od navedenih stanica, MMS su bile najosjetljivije na djelovanje AK.



Slika 24. Grafički prikaz učinka askorbinske kiseline AK na vijabilnost staničnih linija HEK 293, MMS i U2OS. Izraženo kao srednja vrijednost postotaka živih stanica ($\pm$ standardna devijacija), mjereno za 7 različitih koncentracija AK MTT testom. Kontrolne stanice nisu tretirane. Statistička značajnost u smanjenju vijabilnosti ($p < 0,05$) je vidljiva kod HEK 293 i stanične linije osteosarkoma U2OS pri koncentraciji od 30 mM AK, a kod normalnih linijskih mezenhimskih matičnih stanica MMS pri koncentraciji od 10 mM AK i naviše. Statistička značajnost u porastu vijabilnosti stanica se uočava kod U2OS pri tretmanu od 5 mM AK.

Grafički je prikazan postotak živih (vijabilnih) stanica OS-TMS iz uzoraka P1, P2 i P3 u odnosu na koncentraciju AK. Jednoj skupini stanica nije dodavan bFGF, a drugoj jest (slika 25).

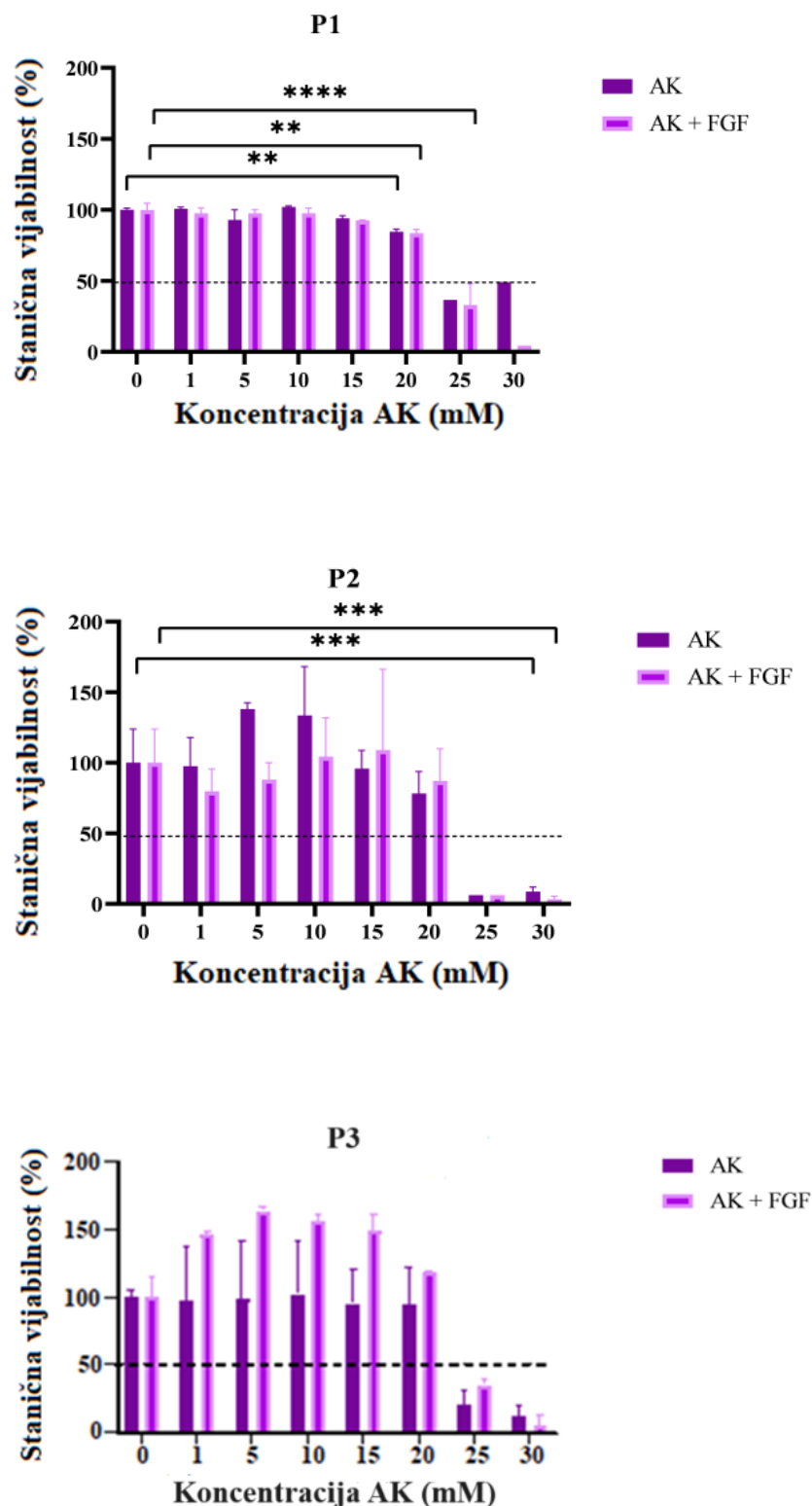
U uzorku P1 smanjenje postotka vijabilnih stanica se uočava na 25 mM AK. Do te vrijednosti AK praktički nije imala nikakvog učinka na OS-TMS, bez obzira na dodatak bFGF. Pri koncentracijama od 25-30 mM AK manje od 50% stanica je vijabilno. Pri koncentraciji od 30 mM AK vijabilnost stanica pada gotovo na 0 ako im se doda bFGF. IC_{50} se procjenjuje na 20,54 mM AK, odnosno 23,74 mM AK uz dodatak bFGF.

U uzorku P2 koncentracija od 1 mM AK nije imala značajnijeg učinka na vijabilnost stanica. Pri koncentracijama 5 i 10 mM AK uočava se manji porast postotka vijabilnih stanica u odnosu na kontrolne, a pri sljedećim koncentracijama od 15 i 20 mM AK vijabilnost se vratila na slične vrijednosti kao kod kontrolnih stanica. Porast vijabilnosti se uočio i dodatkom bFGF, samo što je taj trend porasta bio nešto usporeniji. Tek pri koncentracijama od 25 i 30 mM AK bilježi se značajnija promjena u vijabilnosti stanica koja naglo pada, gotovo na 0, bez obzira na dodavanje bFGF. IC_{50} se procjenjuje na 20,30 mM AK, odnosno 20,73 mM AK uz dodatak bFGF.

Za P3 AK do koncentracije od 20 mM nije značajnije djelovala na vijabilnost stanica, ali već pri 1 mM AK se uočava porast postotka vijabilnih stanica ako se uzorku doda bFGF. Vijabilnost stanica u razini kontrolne ili viša od nje se zadržala sve do koncentracije od 20 mM AK, pri tretmanu od 25 mM AK je naglo pala, a pri 30 mM AK je došla gotovo na 0, bez obzira na dodavanje bFGF. IC_{50} se procjenjuje na 22,65 mM AK, odnosno 22,37 mM AK uz dodatak bFGF. Statističke oznake nisu stavljene jer su stanice u duplikatima.

Koncentracije AK niže od 20 mM nisu imale značajniji učinak na vijabilnost OS-TMS ili su blago pojačale njihovu vijabilnost što je uočeno kod P2. Kod P3 to pojačanje vijabilnosti stanica je bilo potaknuto dodatkom bFGF.

Usporedbom vijabilnosti OS-TMS s HEK 293, MMS i U2OS zaključujemo da je AK pokazala značajniji učinak na vijabilnost MMS pri koncentracijama od 10 i 15 mM, dok su HEK 293 i U2OS značajniju osjetljivost na AK pokazale tek pri koncentraciji od 30 mM. OS-TMS su bile tek blago osjetljivije na djelovanje AK u odnosu na HEK 293 i U2OS, pri čemu se IC_{50} kod OS-TMS kretao između 20-24 mM, Tako su se OS-TMS pokazale otpornijima na djelovanje AK od normalnih mezenhimskih matičnih stanica.



Slika 25. Učinak askorbinske kiseline AK na vijabilnost matičnih stanica osteosarkoma uzoraka P1, P2 i P3 s i bez dodatka bazičnog čimbenika rasta fibroblasta FGF. Izraženo kao srednja vrijednost postotaka živih stanica ($\pm$ standardna devijacija), mjereno za 7 različitih koncentracija AK MTT testom. Statistička značajnost u smanjenju vijabilnosti OS-TMS ($p < 0,05$) je vidljiva kod sva tri ispitana uzorka pri koncentracijama od 25 i 30 mM AK. Statističke oznake nisu stavljene na P3 jer su stanice u duplikatima.

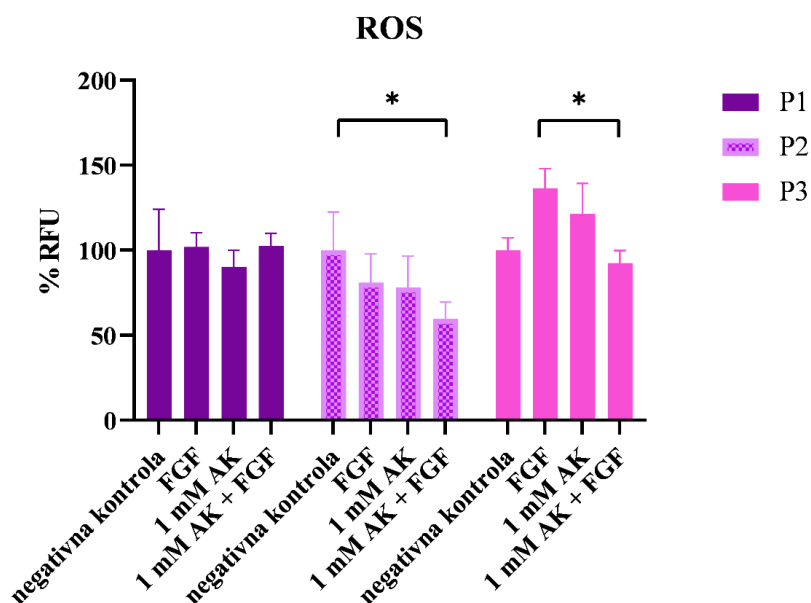
5.3. UČINAK ASKORBINSKE KISELINE NA REDOKS STANJE MATIČNIH STANICA OSTEOSARKOMA

Ispitivanje učinka AK na redoks stanje OS-TMS u ovom istraživanju se temeljilo na određivanju razine ROS koje su nastale u navedenim stanicama. Stanice su zasađene u gustoći od 1×10^4 po jažici i 7 dana inkubirane u 1mM AK, s i bez dodatka bFGF. Razina ROS izmjenjena je koristeći DCFH-DA. Kontrolne stanice pokazuju osnovnu razinu ROS (slika 26).

U uzorku P1, osim diskretnog pada (za oko 10%) razine fluorescencije pri dodatku samo AK, nije primijećen gotovo nikakav učinak AK na razinu staničnog ROS u odnosu na negativnu kontrolu. Dodatak bFGF također nije imao učinka na razinu ROS.

U uzorku P2 je uočen nešto veći pad razine fluorescencije u odnosu na negativnu kontrolu pri dodatku AK, odnosno bFGF (pad za oko 20%), te još veći pad fluorescencije pri dodatku AK i bFGF (pad za oko 40%), što bi moglo upućivati na antioksidacijski učinak AK na OS-TMS iz ovog uzorka.

U uzorku P3 je uočena viša razina fluorescencije u odnosu na negativnu kontrolu pri dodatku bFGF (porast za oko 40%) i pri dodatku AK (porast za oko 25%), a pri dodatku AK i bFGF ta razina fluorescencije, odnosno razina ROS postaje usporediva s negativnom kontrolom. U ovom uzorku se bilježi najviši porast ROS.

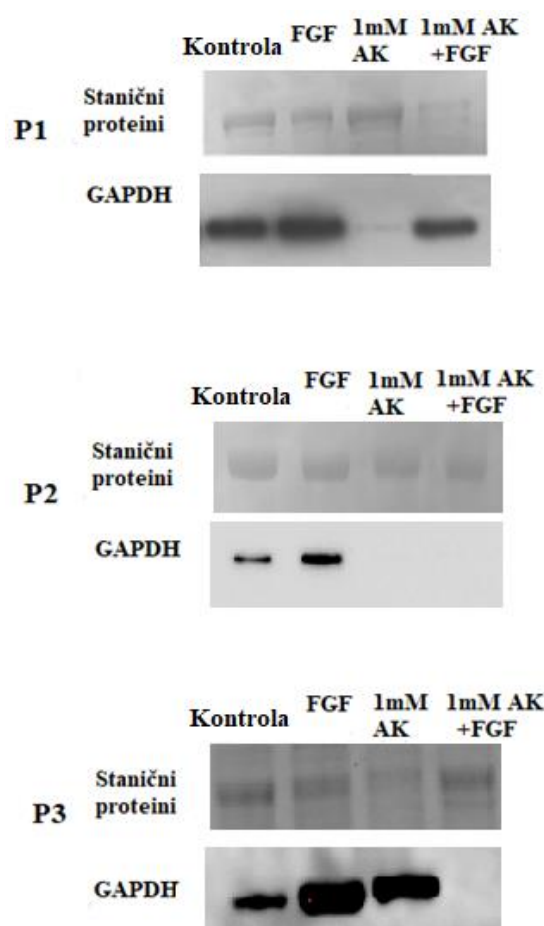


Slika 26. Grafički prikaz ispitivanja razine reaktivnih kisikovih vrsta ROS u matičnim stanicama osteosarkoma u odnosu na negativnu kontrolu. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u postotku relativne jedinice fluorescencije % RFU u odnosu na negativnu kontrolu je vidljiva samo kod uzorka P2 pri dodatku bazičnog čimbenika rasta fibroblasta FGF, askorbinske kiseline AK i kombinacije AK i FGF, te kod uzorka P3 pri dodatku FGF i pri dodatku AK.

5.4. PRISUTNOST GLICERALDEHID-3-FOSFAT DEHIDROGENAZE (GAPDH) U MATIČNIM STANICAMA OSTEOSARKOMA

Ispitivanje prisutnosti enzima GAPDH je provedeno Western blot analizom. OS-TMS su zasađene u gustoći od $4,8 \times 10^4$ po jažici i 7 dana inkubirane u 1 mM AK, s i bez dodatka bFGF. Uslijedila je citoliza, izolacija i određivanje koncentracije proteina. Stanični proteini (3 μ g) su korišteni kao kontrolni. Prikazane su fotografije membrana po učinjenim Western blot analizama (slika 27).

U uzorku P1 nema GAPDH pri tretmanu 1 mM AK. U uzorku P2 nema GAPDH u stanicama tretiranim 1 mM AK bez obzira na dodatak bFGF. U uzorku P3 nema GAPDH u stanicama tretiranim 1 mM AK samo ako im je dodan bFGF. Tretman samim bFGF nije utjecao na prisutnost GAPDH u ispitivanim uzorcima.



Slika 27. Western blot analiza prisutnosti gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze GAPDH u matičnim stanicama osteosarkoma ispitivanih uzoraka. Stanice su tretirane 1 mM askorbinskom kiselinom AK ili bazičnim čimbenikom rasta fibroblasta FGF, odnosno kombinacijom 1 mM AK i FGF. Stanični proteini su korišteni kao kontrolni.

5.5. VRSTA STANIČNE SMRTI UZROKOvana ASKORBINSKOM KISELINOM

Vrstu stanične smrti koju je uzrokovala AK smo odredili protočnim citometrom koristeći aneksin V (za stanice u apoptozi i kasnoj apoptozi / ranoj nekrozi) i PI (za stanice u nekrozi). OS-TMS su nasadene u koncentraciji od 6×10^4 po jažici i tretirane s 10 mM AK kroz 24 sata. Matične stanice su inkubirane s i bez dodatka bFGF. Kontrolne stanice nisu tretirane. Rezultati pokazuju srednje vrijednosti do triju neovisnih mjerenja za HEK 293, MMS i U2OS, do triju mjerenja za OS-TMS te su prikazani grafički kao udjeli pojedine vrste stanične smrti iskazani u postocima %. Reakcije stanica su svrstane u četiri kategorije: žive stanice, rane apoptotske stanice, kasne apoptotske i rane nekrotične stanice, te nekrotične stanice (slika 28).

Stanice HEK 293 tretirane AK-om uglavnom su pokazale pad postotka vijabilnosti (s 81,3% na 46,7%) i porast udjela stanica u ranoj apoptozi (s 5,7% na 25,9%), odnosno kasnoj apoptozi / ranoj nekrozi (s 10% na 26,7%).

Vijabilnost MMS tretiranih AK-om se smanjila sa 73,7% na 40,6% bez dodatka bFGF, odnosno sa 71,2% na 49,7% uz dodatak bFGF. Postotak MMS tretiranih AK u ranoj apoptozi se povećao s 12,7% na 50,7% bez dodatka bFGF, odnosno s 13,9% na 43,4% uz bFGF.

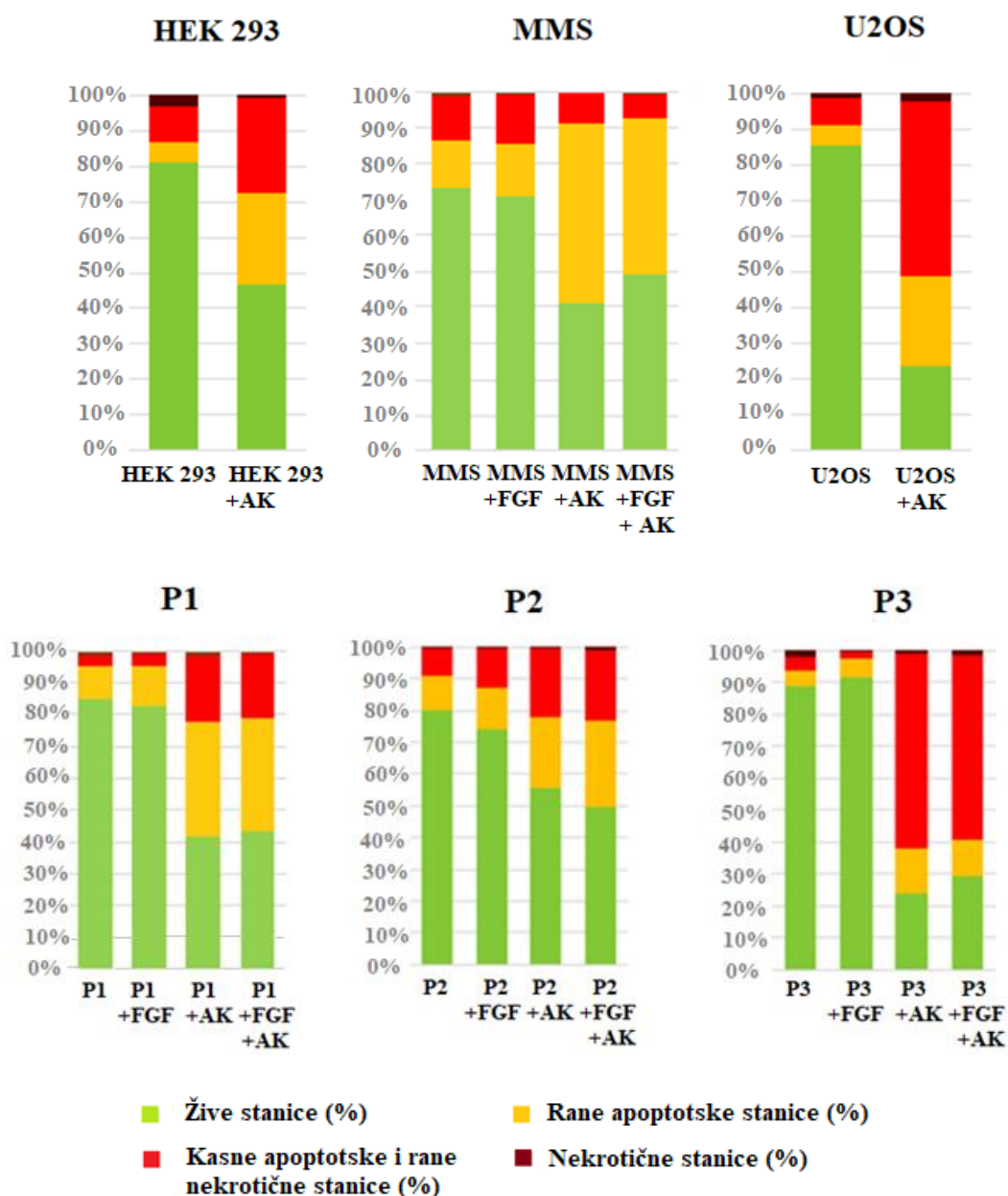
U2OS tretirane AK-om također su pokazale pad postotka vijabilnosti (s 85,6% na 23,4%), dok se postotak stanica u ranoj apoptozi povećao (s 5,7% na 25,4%) odnosno u kasnoj apoptozi / ranoj nekrozi (sa 7,6% na 49,1%).

Kod P1 vijabilnost OS-TMS tretiranih AK-om se smanjila s 84,8% na 40,7% bez dodatka bFGF, odnosno s 83,2% na 43,9% uz dodatak bFGF. Postotak OS-TMS u uzorku P1 tretiranih AK-om u ranoj apoptozi se povećao s 10,3% na 37,4% bez dodatka bFGF, odnosno s 11,6% na 35,2% uz bFGF. Povećao se i postotak stanica u kasnoj apoptozi / ranoj nekrozi s 3,9% na 20,9% bez dodatka bFGF, odnosno s 4,5% na 20,2 % uz bFGF.

Kod P2 uzorka uočavamo da je AK smanjila vijabilnost OS-TMS s 80,6% na 55,65% bez dodatka bFGF, odnosno sa 73,9% na 49,4% uz dodatak bFGF. Bilježi se porast postotka OS-TMS iz uzorka P2 u ranoj apoptozi s 10,6% na 22,4% bez dodatka bFGF, odnosno s 13% na 27,4% uz dodatak bFGF. Povećao se i postotak stanica u kasnoj apoptozi / ranoj nekrozi s 8,5% na 21,5 % bez dodatka bFGF, odnosno s 12,8% na 22,5% uz dodatak bFGF. Uočavamo da je utjecaj AK na OS-TMS iz ovog uzorka najmanji od sva tri ispitana uzorka.

Kod P3 uzorka uočavamo da je AK smanjila vijabilnost OS-TMS s 88,7% na 24,2% bez dodatka bFGF, odnosno s 91,6% na 29,2%, uz dodatak bFGF. Bilježi se porast postotka OS-

TMS iz uzorka P3 u ranoj apoptozi s 4,8% na 13,9% bez dodatka bFGF, odnosno s 5,7% na 11,7% uz dodatak bFGF. Najznačajnije povećanje postotka stanica u kasnoj apoptozi / ranoj nekrozi s 4,7% na 61% je bez dodatka bFGF odnosno s 2,4% na 57,6% uz dodatak bFGF. Kod P3 uzorka uočavamo da su OS-TMS tretirane AK uglavnom u kasnoj apoptozi / ranoj nekrozi, čime se ovaj uzorka pokazao najosjetljivijim na djelovanje AK.



Slika 28. Grafički prikaz rezultata određivanja vrste stanične smrti protočnim citometrom koristeći aneksin V i propidij jodid PI. Prikazani su udjeli pojedine vrste stanične smrti (iskazani u %) za stanične linije HEK 293, liniju OS-a U2OS, normalne mezenhimske stanice MMS te za matične stanice osteosarkoma svakog od triju ispitivanih uzorka P1, P2 i P3 tretiranih 10 mM askorbinskom kiselinom AK ili/i bazičnim čimbenikom rasta fibroblasta FGF tijekom 24 sata. Kontrolne stanice nisu tretirane.

5.6. METABOLIČKI PROFIL STANICA I UČINAK ASKORBINSKE KISELINE NA STANIČNI METABOLIZAM

Stanice su tretirane s 10 mM AK tijekom 24 sata. Ispitane su stanične linije HEK 293, MMS i U2OS te OS-TMS uzoraka P1, P2 i P3. Generirane karte fenotipa su prikazane na slici 29 A za HEK 293, MMS i U2OS te OS-TMS P1, P2 i P3, s i bez dodatka bFGF skupno, a na slici 29 B su prikazane karte fenotipa za OS-TMS P1, P2 i P3 pojedinačno, s i bez dodatka bFGF.

Na temelju osnovne vrijednosti i stresnog fenotipa izračunat je metabolički potencijal za OS-TMS P1, P2 i P3 i prikazan na slici 30 A, B, C i D. Dodatno, metabolički potencijal je određen za OS-TMS P1, P2 i P3, s i bez dodatka bFGF.

HEK 293 u osnovnim uvjetima koriste OXPHOS. Dodatkom stresora ubrzale su metabolizam, pojačale OXPHOS, porastao je OCR, ali i ECAR zbog pozadinskog učinka OXPHOS. Inkubacija u AK im je ubrzala osnovni metabolizam. Dodatkom stresora i AK dodatno su ubrzale metabolizam, nešto izraženije glikolizu, ali i dalje su se oslanjale na OXPHOS.

MMS u osnovnim uvjetima koriste OXPHOS. Dodatkom stresora ubrzale su metabolizam, pojačale OXPHOS, porastao je OCR, ali i ECAR zbog pozadinskog učinka OXPHOS. MMS inkubirane u AK su smanjile OXPHOS i pojačale glikolizu. Dodatkom stresora i AK usporio im se metabolizam i počele su se više oslanjati na glikolizu. Nakon tretmana AK-om, MMS se i dalje oslanjaju uglavnom na OXPHOS, ali i pojačavaju glikolizu.

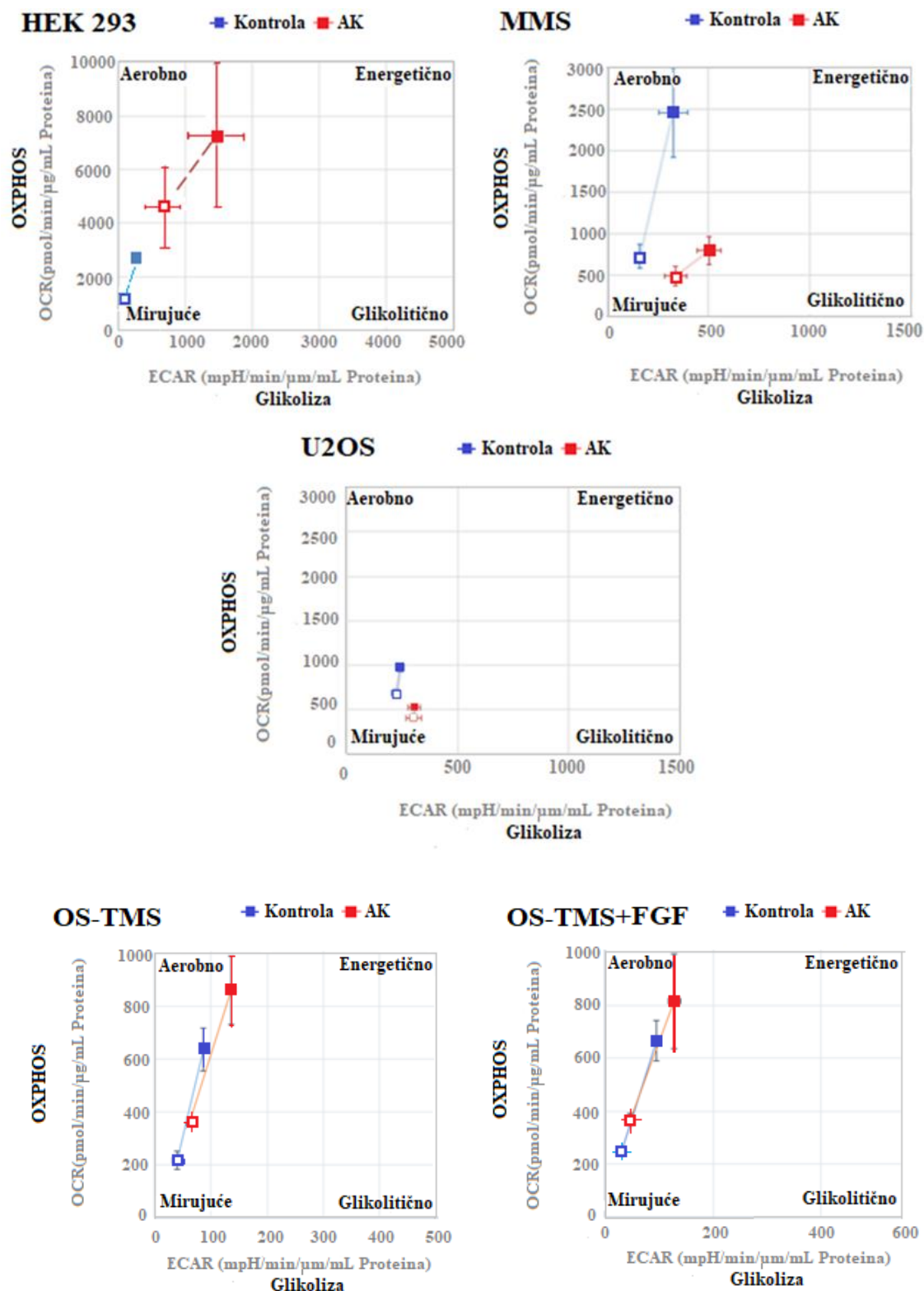
U2OS u osnovnim uvjetima koriste OXPHOS. Dodatkom stresora ubrzale su metabolizam, pojačale OXPHOS, porastao je OCR, ali i ECAR zbog pozadinskog učinka OXPHOS. U2OS inkubirane u AK su smanjile OXPHOS i pojačale glikolizu. Dodatkom stresora i AK nije bilo značajnijeg ubrzanja metabolizma. Nakon tretmana AK-om, U2OS se i dalje oslanjaju na OXPHOS.

OS-TMS su dodatkom AK pokazale ubrzanje metabolizma. Iako je tada došlo do blažeg smanjenja potencijala OXPHOS, one su se uglavnom i dalje oslanjale na OXPHOS. OS-TMS kojima je dodan bFGF i koje su tretirane AK-om također su ubrzale metabolizam, pri čemu su pokazale nešto veće vrijednosti ECAR u odnosu na tretirane OS-TMS kojima nije dodan bFGF. OS-TMS kojima je dodan bFGF također su se uglavnom oslanjale na OXPHOS.

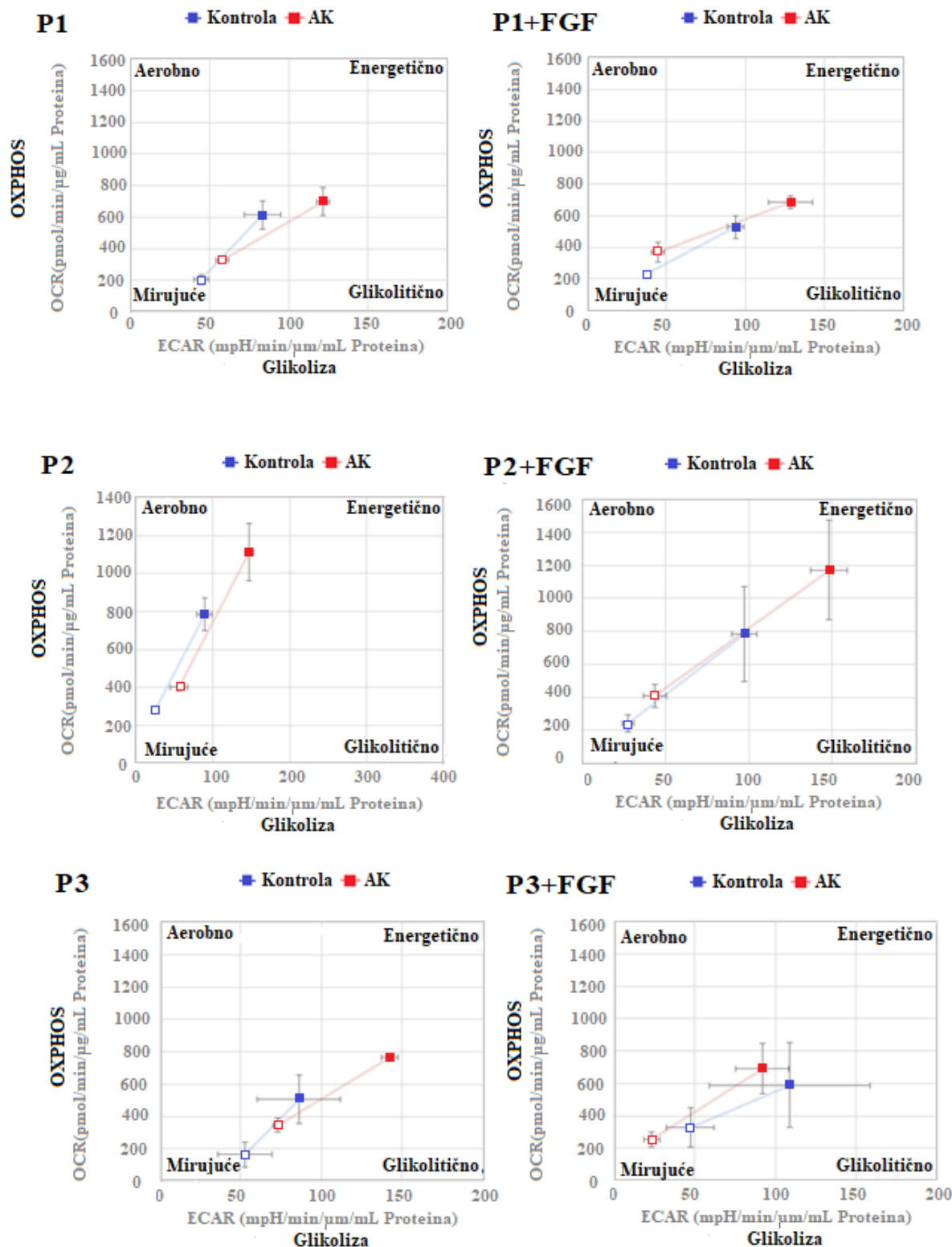
Rezultati Seahorse analize metabolizma uzoraka OS-TMS P1, P2 i P3 i učinka 24-satne inkubacije u 10 mM AK na njihov metabolizam i metabolički potencijal, s i bez dodatka bFGF, detaljnije su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Rezultati Seahorse analize metabolizma matičnih stanica osteosarkoma uzoraka P1, P2 i P3 i učinka njihove 24-satne inkubacije u 10 mM askorbinskoj kiselini AK na metabolizam i metabolički potencijal, s i bez dodatka bazičnog čimbenika rasta fibroblasta FGF. OXPHOS u značenju oksidacijska fosforilacija.

	P1	P2	P3
BEZ bFGF			
Osnovni metabolizam	OXPHOS, glikoliza	OXPHOS, glikoliza	Glikoliza
Metabolizam u stresu	Ubrzan	Ubrzan	Ubrzan
Metabolički potencijal	Porast, Oba metabolička puta	Porast, Oba metabolička puta	Porast, Oba metabolička puta
Osnovni metabolizam + AK	OXPHOS, glikoliza	OXPHOS, glikoliza	OXPHOS, glikoliza
Metabolizam u stresu + AK	Ubrzan	Ubrzan	Ubrzan
Metabolički potencijal + AK	Porast, Oba metabolička puta	Porast, Oba metabolička puta	Porast, Oba metabolička puta
Utjecaj AK na metabolizam OS-TMS bez bFGF	Ubrzanje oba metabolička puta	Ubrzanje oba metabolička puta	Ubrzanje oba metabolička puta
UZ bFGF			
Osnovni metabolizam	OXPHOS, glikoliza	OXPHOS, glikoliza	OXPHOS, glikoliza
Metabolizam u stresu	Ubrzan	Ubrzan	Ubrzanje
Metabolički potencijal	Porast, Oba metabolička puta	Porast, Oba metabolička puta	Porast, Oba metabolička puta
Osnovni metabolizam + AK	OXPHOS, glikoliza	OXPHOS, glikoliza	OXPHOS, glikoliza,
Metabolizam u stresu + AK	Ubrzan	Ubrzan	Ubrzan
Metabolički potencijal + AK	Porast, Oba metabolička puta, više glikoliza	Porast, Oba metabolička puta	Porast, Oba metabolička puta
Utjecaj AK na metabolizam OS-TMS uz bFGF	Ubrzanje, oba metabolička puta	Ubrzanje, oba metabolička puta	Ubrzanje, oba metabolička puta



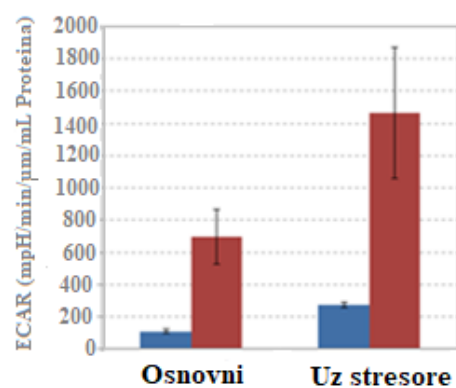
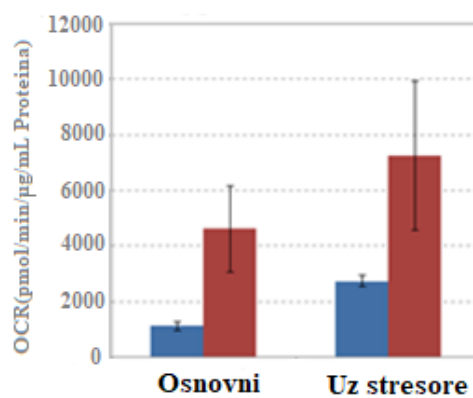
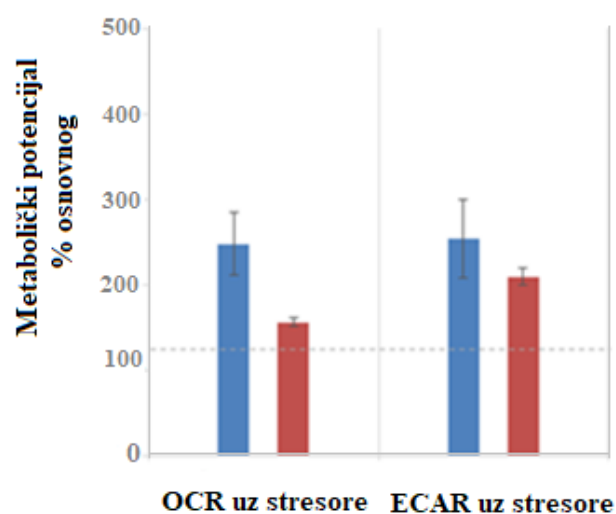
Slika 29 A. Karte fenotipa utjecaja askorbinske kiseline AK na stanične linije HEK 293, normalne mezenhimske stanice MMS i staničnu liniju OS-a U2OS te skupno za matične stanice osteosarkoma OS-TMS iz sva tri uzoraka, s i bez dodatka bazičnog čimbenika rasta fibroblasta FGF. Prikazani su stopa potrošnje kisika OCR i stopa ekstracelularnog zakiseljavanja ECAR za netretirane (plavo) i uzorke tretirane s 10 mM AK tijekom 24 sata (crveno), mjereni u osnovnim (otvoreni simboli) i stresnim (zatvoreni simboli) uvjetima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.



Slika 29 B. Karte fenotipa utjecaja askorbinske kiseline AK i bazičnog čimbenika rasta fibroblasta FGF na energetski fenotip pojedinačnih ispitivanih uzoraka matičnih stanica osteosarkoma P1, P2 i P3. Prikazani su stopa potrošnje kisika OCR i stopa ekstracelularnog zakiseljavanja ECAR za netretirane (plavo) i uzorke tretirane s 10 mM AK tijekom 24 sata (crveno), s i bez dodatka bFGF, mjereni u osnovnim (otvoreni simboli) i stresnim (zatvoreni simboli) uvjetima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

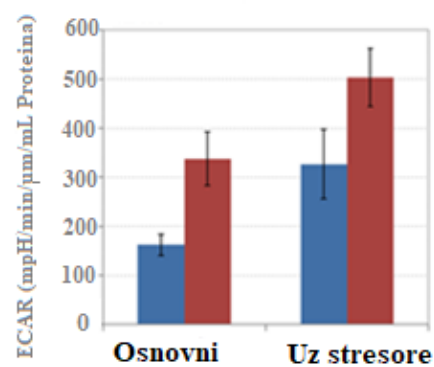
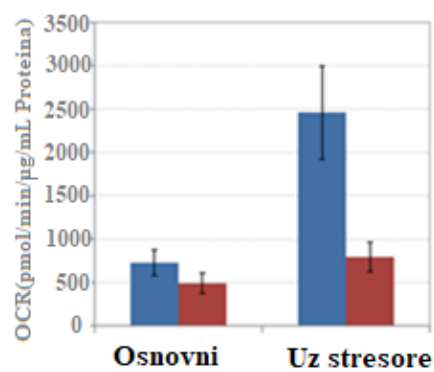
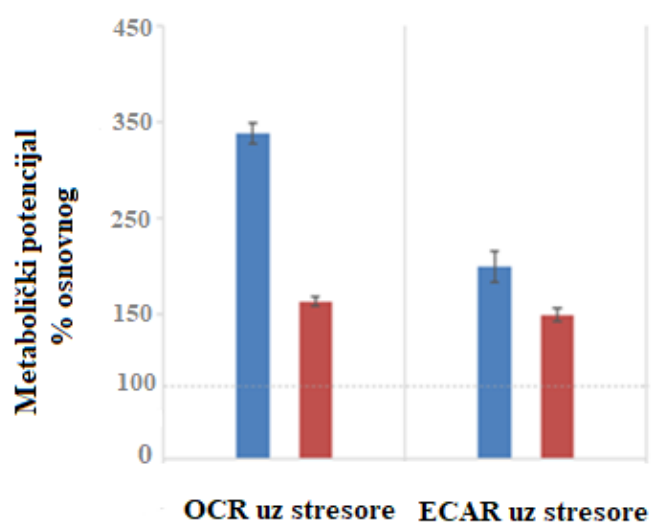
HEK 293

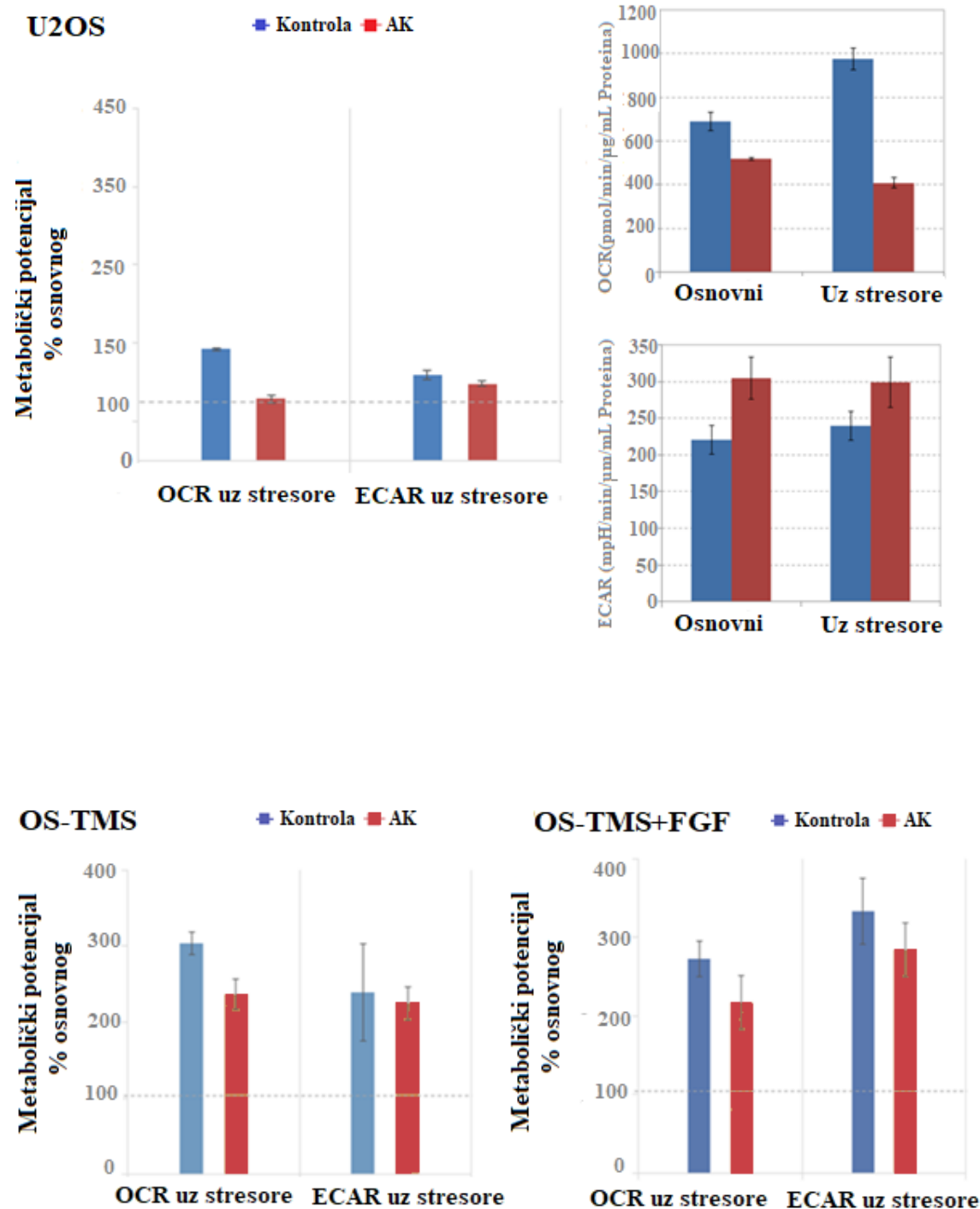
■ Kontrola ■ AK



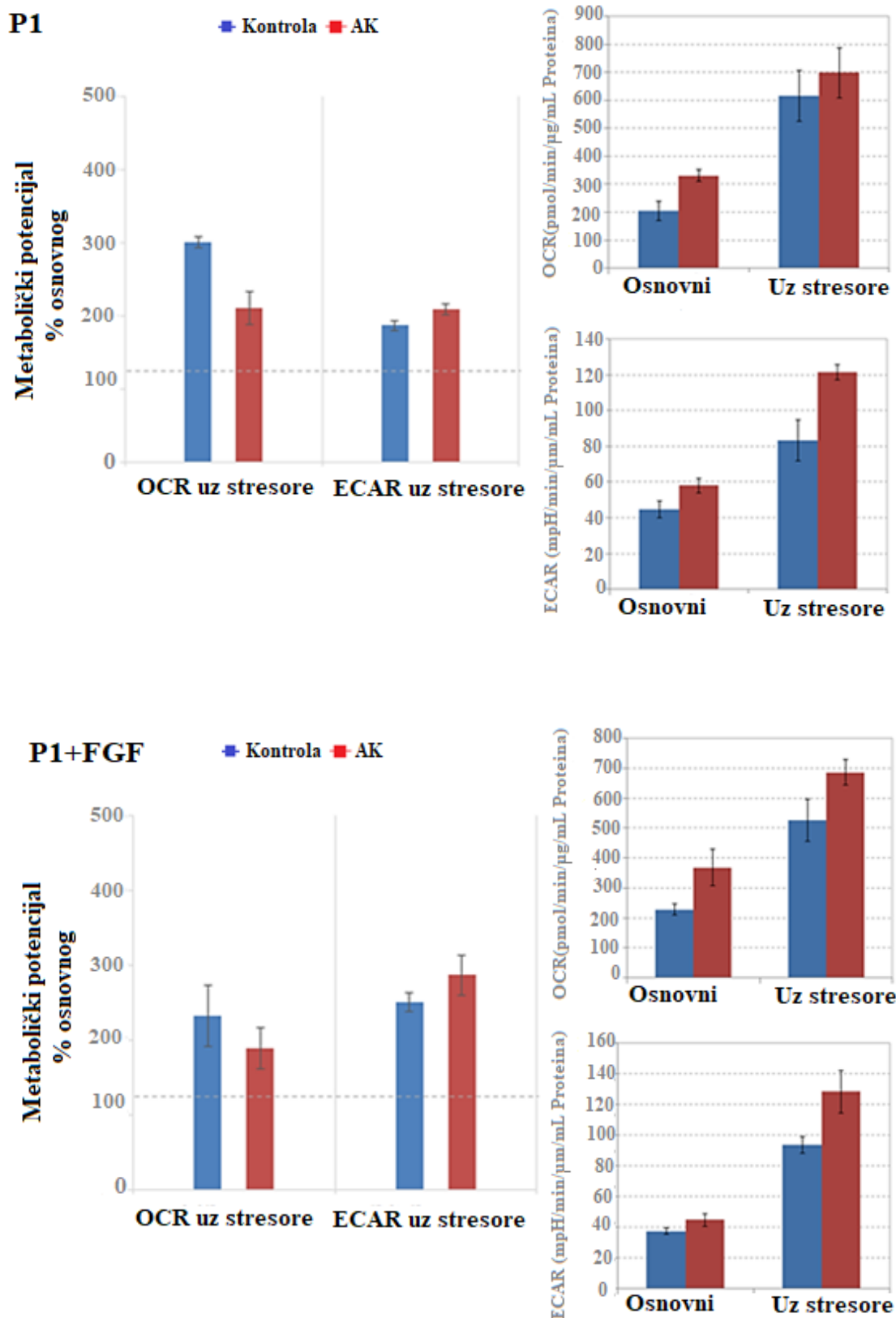
MMS

■ Kontrola ■ AK

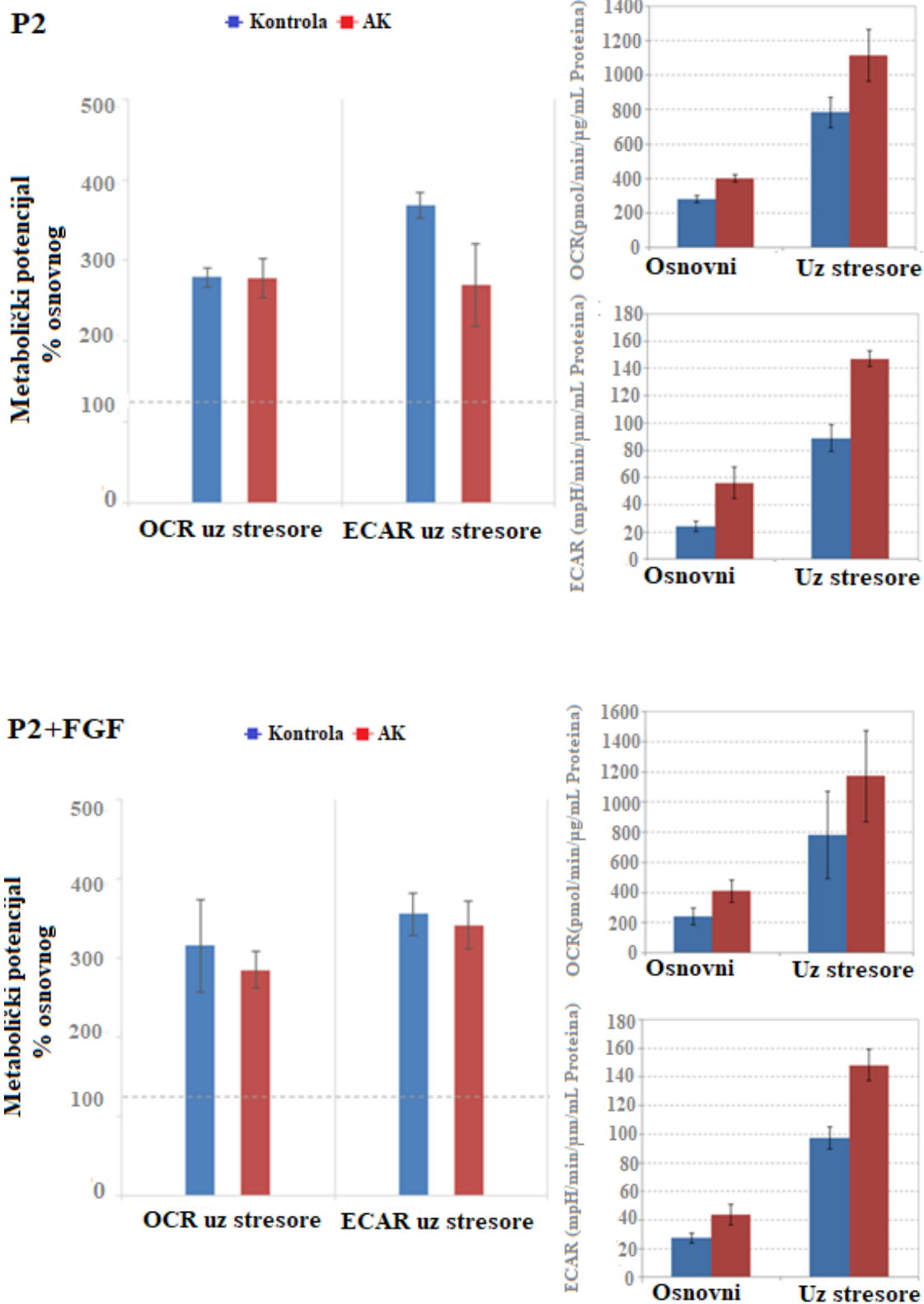




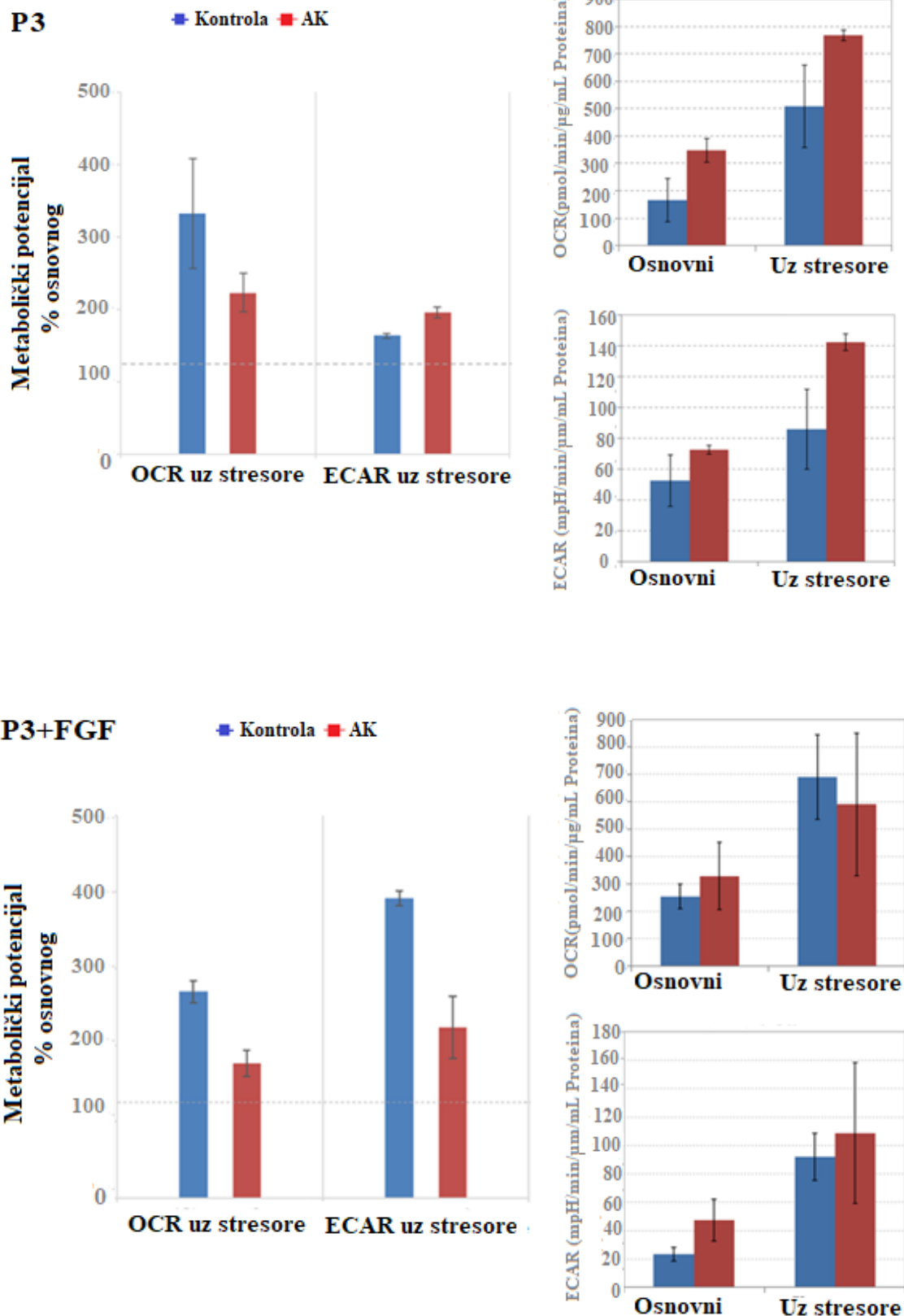
Slika 30 A. Grafički prikaz metaboličkog potencijala utjecaja askorbinske kiseline AK na stanične linije HEK 293 normalne mezenhimske matične stanice MMS i liniju OS-a U2OS, te skupno za sva tri uzorka matičnih stanica osteosarkoma OS-TMS, s i bez dodatka bazičnog čimbenika rasta fibroblasta FGF. Metabolički potencijal predstavljen je kao postotak povećanja stresa u odnosu na početnu stopu potrošnje kisika OCR, odnosno stope ekstracelularnog zakiseljavanja ECAR, za netretirane (plavo) i uzorke tretirane 10 mM AK-om tijekom 24 sata (crveno). Podaci su izvedeni iz karte energetskog fenotipa prikazane na slici 29 A. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.



Slika 30 B. Grafički prikaz metaboličkog potencijala utjecaja askorbinske kiseline AK na matične stanice osteosarkoma uzorka P1, s i bez dodatka bazičnog čimbenika rasta fibroblasta FGF. Podaci su izvedeni iz karte energetske fenotipa prikazane na slici 29 B za P1. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.



Slika 30 C. Grafički prikaz metaboličkog potencijala utjecaja askorbinske kiseline AK na matične stanice osteosarkoma uzorka P2, s i bez dodatka bazičnog čimbenika rasta fibroblasta FGF. Podaci su izvedeni iz karte energetske fenotipa prikazane na slici 29 B za P2. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.



Slika 30 D. Grafički prikaz metaboličkog potencijala utjecaja askorbinske kiseline AK na matične stanice osteosarkoma uzorka P3, s i bez dodatka bazičnog čimbenika rasta fibroblasta FGF. Podaci su izvedeni iz karte energetskog fenotipa prikazane na slici 29 B za P3. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

6. RASPRAVA

Među različitim staničnim subpopulacijama, u OS se mogu naći OS-TMS za koje se smatra da imaju sposobnost samoobnavljanja, razvijene mehanizme otpornosti na protutumorske lijekove te da su odgovorne za recidiv bolesti. OS-TMS je teško uništiti protutumorskim lijekovima zbog njihove sposobnosti pojačanog izbacivanja lijekova iz stanice, pa je njihov metabolizam prepoznat kao potencijalna meta terapijskog djelovanja i mogućeg poboljšanja ishoda u liječenju OS-a. Prema podacima iz literature, jedno od sredstava upliva u metabolizam OS-TMS je AK, koja bi svoju selektivnost u izazivanju stanične smrti u ovoj metabolički preferentno glikolitičkoj subpopulaciji mogla ostvariti induciranjem oksidacijskog stresa i blokadom djelovanja GAPDH. Preliminarnim istraživanjima i sami smo dobili rezultate koji su dijelom bili na tragu ove pretpostavke (32), ali dijelom i oprečni (86, 124), pa smo podrobnije proučili učinke AK na metabolizam OS-TMS.

Osvrt na rezultate provedenog istraživanja i literaturnih podataka

Matičnost tumorskih stanica

Koristeći kulture sarkosfera, izolirali smo OS-TMS iz bioptičkih uzoraka izuzetih od triju bolesnika. Period uzgoja sarkosfera je bio oko 30 dana, osim za uzorak P3 čije su sfere rasle gotovo 3 puta sporije, što sugerira da OS-TMS mogu biti izrazito mirujuće. Matičnost stanica za sva tri uzorka smo potvrdili rastom prve i druge generacije stanica u neprijanjajućim uvjetima i testom izbacivanja boje Hoechst 33342.

MTT test vijabilnosti

Naši rezultati upućuju na to da su linijske MMS pokazale najveću osjetljivost na AK. Na uzorku P2 je primijećeno da AK u koncentracijama 5 i 10 mM potiče vijabilnost stanica, a na uzorku P3 je primijećeno da AK u koncentracijama 1-20 mM potiče vijabilnost stanica ako se uz AK doda bFGF. Uzorak P1 nije pokazao porast vijabilnosti stanica dodatkom AK odnosno AK i bFGF. Pri višim koncentracijama AK, ispitivane OS-TMS ne pokazuju značajniju selektivnu osjetljivost u odnosu na HEK 293 i U2OS što je u suprotnosti s rezultatom rada Skube K. (32). Moguće pojašnjenje je velika varijabilnost nelinejskih OS-TMS i to što su za navedeni rad korištene stanice tumora koji je prethodno tretiran neoadjuvantnom kemoterapijom, a koja je mogla pojačati učinak AK na OS-TMS, te što je za potvrdu matičnosti

OS-TMS korištena samo jedna tehnika - izolacija sarkosfera. To je u suprotnosti i s radovima koji tvrde da AK u visokim koncentracijama selektivno ubija tumorske stanice, a djeluje neštetno na zdrave (98, 99, 100, 101, 102) i to pojašnjavaju slabijim sustavom tumorskih stanica za borbu protiv oksidacijskog stresa. Postoji mogućnost da OS-TMS ne moraju imati nužno slabe mehanizme obrane protiv oksidacijskog stresa, da niže koncentracije AK mogu djelovati antioksidacijski i na OS-TMS te da visoke koncentracije AK mogu štetiti netumorskim stanicama. Visoki IC_{50} upućuje na to da je inhibitorni učinak AK na nelinejske OS-TMS slab i opaža se pri izrazito visokim koncentracijama AK, koje su daleko iznad fizioloških, a time je izvjesniji štetan učinak AK i na ostale stanice. Time bi AK bila slabo sredstvo u eradikaciji nelinejskih OS-TMS *in vitro* koje prethodno nisu tretirane protutumorskim lijekovima.

Redoks stanje stanica

Prooksidacijsko djelovanje AK smo ispitali određivanjem razine ROS u stanicama. Manji broj stanica smo koristili obzirom na broj planiranih i ponavljanih pokusa, stoga smo stanice tretirali koncentracijom od 1mM AK koristeći kalkulator razrjeđenja. Premda manja od IC_{50} , i ova koncentracija AK je iznad fiziološke, a stanice su tretirane kroz 7 dana. Netretirane (kontrolne) stanice pokazuju osnovnu staničnu proizvodnju ROS. Kod P1 dodatak samo AK blago je smanjio razinu ROS, ali nije bilo značajnijeg utjecaja AK na OS-TMS bez obzira na dodatak bFGF. Kod P2 se uočava pad razine ROS ako se stanicama doda AK ili bFGF, a još izraženiji ako se dodaju i AK i bFGF, što može govoriti u prilog antioksidacijskog učinka AK na OS-TMS uzorka P2. Pad razine ROS, odnosno pojačanje antioksidacijskog učinka AK dodatkom bFGF, upućuje na to da i bFGF može djelovati na redoks stanje stanica. bFGF je sredstvo koje se koristi za sprječavanje diferencijacije TMS, pa bi stupanj diferencijacije OS-TMS mogao imati veze s metaboličkim putem kojega one dominantno koriste, proizvodnjom ROS i mehanizmima obrane od oksidacijskog stresa. Kod uzorka P3 uočavamo porast razine ROS pri tretmanu AK-om što upućuje na pojačanu osjetljivost OS-TMS na AK, odnosno na prooksidacijsko djelovanje AK na ovaj uzorak. Od svih ispitivanih stanica, jedino su se OS-TMS uzorka P3 ponašale u skladu s pretpostavkom da će biti osjetljivije na AK od netretiranih stanica. Razina ROS u OS-TMS uzorka P3 je bila viša u odnosu na kontrolne stanice kad su one bile inkubirane samo u bFGF, a dodatkom AK i bFGF razina ROS kod P3 je bila slična kao kod netretiranih stanica, gdje se opet uočava određeni utjecaj bFGF na stanično redoks stanje.

Zbog uočenih razlika, zaključujemo da OS-TMS mogu imati različite različite mehanizme obrane od staničnog stresa uzrokovanog ROS (održavanje niske razine ROS je važno za održavanje svojstava matičnosti) te da dodavanje bFGF kao antidiferencijacijskog

sredstva može utjecati na redoks stanje OS-TMS. One, dakle, nisu jednoznačno pokazale značajno veću razinu oksidacijskog stresa pri primjeni AK u odnosu na netretirane stanice polazeći od hipoteze istraživanja da će ta razina osjetljivosti biti veća zbog njihovog preferentno glikolitičkog metaboličkog puta koji je svojevrsni fenotipski odraz matičnih stanica, a koji je navodno osjetljiviji na AK. To upućuje na mogućnost da ispitivane OS-TMS nisu ovisne isključivo o glikolizi. Nije isključeno da bi proizvodnja ROS bila uočljivija pri još višim koncentracijama AK i duljoj inkubaciji OS-TMS u AK.

Western blot analiza prisutnosti GAPDH

AK je u ispitivanim uzorcima imala očekivan utjecaj na prisutnost GAPDH samostalno ili u kombinaciji s bFGF. U netretiranim uzorcima kao i u onima koji su tretirani samo bFGF-om, detektirana je prisutnost GAPDH. Pri tumačenju učinka AK na OS-TMS, postoji mogućnost da ROS u niskoj koncentraciji nisu imale nikakav utjecaj na GAPDH, nego da je ona nestala zbog nekog drugog učinka AK, primjerice prilagodbe stanice na zakiseljenje staničnog okoliša. Treba imati na umu da GAPDH ima različite oblike i funkcije u tumorskim stanicama koje još nisu dovoljno istražene, pa tako niti utjecaj AK na njih.

Glikolitička funkcija GAPDH se odnosi na homotetramerni oblik GAPDH koji se nalazi u citosolu. Međutim, različiti tipovi GAPDH su primijećeni u membranama, mitohondrijima i jezgri. U tim staničnim odjeljcima, GAPDH sudjeluje u nizu staničnih funkcija, uključujući transport, signalizaciju i biogenezu ekstracelularnih vezikula, replikaciju DNA te popravak i regulaciju puteva stanične smrti. Ova funkcionalna raznolikost GAPDH djelomično je posredovana posttranslacijskim promjenama. Štoviše, posttranslacijske promjene koje se javljaju u GAPDH u malignim stanicama rezultiraju novim aktivnostima koje nisu povezane s izvornom glikolitičkom funkcijom GAPDH (125), a mogu biti posredovane ROS (126).

Uz to se čini da se prisutnost GAPDH u uzorcima OS-TMS tretiranima AK-om *in vitro* može promijeniti ako stanični medij obogaćujemo bFGF-om, a koji se uobičajeno dodaje TMS da bi se održala njihova matičnost. Obzirom da smo ponovno primijetili razlike u rezultatima povezane s dodavanjem, odnosno nedodavanjem bFGF, detaljnije smo istražili literaturne podatke o *in vitro* utjecaju FGF-a na TMS.

Utjecaj FGF-a na OS-TMS

FGF se veže na svoje receptore (engl. *fibroblast growth factor receptor*, *FGFR*) (127). Otkriće da mutacije FGFR uzrokuju niz poremećaja razvoja koštanog sustava kod ljudi, pružilo je dokaz o važnosti FGF signalizacije u razvoju kostiju (128, 129). FGF stimulira proliferaciju

i blokira diferencijaciju nezrelih osteoblasta i inducira izražaj gena Sox2 (130, 131, 132). FGF signalizacija također inducira proliferaciju KS-MMS (133). Stimulacija FGF-om pojačava proliferaciju stanica ljudskog OS te je nađeno da su FGFR prekomjerno prisutni u uzorcima ljudskog OS (134, 135). Liječenje inhibitorima signalizacije posredovane FGF-om dovodi do smanjenja izražaja gena Sox2 i smanjene proliferacije stanica mišjeg OS, a FGF ima ulogu u održavanju nezrelog stanja i agresivnosti mišjeg OS te pojačava formiranje sarkosfera OS (136, 137). Stanična linija ljudskog OS-a OST-1-PF može rasti u Coonovom modificiranom Ham F12 mediju bez proteina pri čemu su EGF, transformirajući čimbenik rasta alfa (TGF- α), kiseli čimbenik rasta fibroblasta (aFGF) i bazični čimbenik rasta fibroblasta (bFGF) bili su najsnažniji mitogeni. Na površini stanica OST-1-PF su pronađeni receptori visokog afiniteta za EGF i FGF (138). 2-fosfat L-askorbinske kiseline (Asc-2P) djeluje kao antioksidans i stimulator proizvodnje čimbenika rasta hepatocita (engl. *hepatocyte growth factor*, HGF). Smanjenje čimbenika rasta fibroblasta 2 i 4 (FGF2 i FGF4), EGF i HGF tijekom uzgoja može potaknuti autofagiju i negativno utjecati na regulaciju matičnosti. Zajednički tretman koristeći FGF2 i Asc-2P pomaže optimalnoj proliferaciji KS-MMS te regulira njihov potencijal diferencijacije putem HGF (139). Dakle, dodavanje FGF2, AK i EGF je korisno za *in vitro* umnažanje MMS, a istodobno dodavanje FGF2 je povezano gubitkom potencijala diferencijacije MMS, stoga se FGF koristi kao uobičajeni čimbenik za uzgoj matičnih stanica (140). U kontekstu nedodavanja FGF prilikom uzgoja OS-TMS, postoji mogućnost da se dio matičnih stanica u SP staničnoj populaciji koje su sačinjavale sarkosfere počeo diferencirati uslijed manjka FGF. Navedena početna diferencijacija je možda dovela do toga da su stanice postale manje „plastične“. Također, možemo pretpostaviti da i *in vivo* tumorske matične stanice nemaju FGF uvijek u tolikoj količini da bi stalno ostale matične, baš zato da bi tumor zadržao različite subpopulacije malignih stanica, različitog diferencijacijskog profila. Ta heterogenost mu daje veću šansu za preživljenjem, jer različiti profili stanica unutar tumora će različito reagirati na promjenjivost staničnog okoliša. Tako će u određenim uvjetima neke OS-TMS možda biti vulnerabilnije, ali će zato druge biti otpornije. Kad dodamo bFGF, moguće je da podržavamo svojstva matičnosti te tako bude više mirujućih stanica u metaboličkom i proliferacijskom smislu, s izraženijim matičnim i „plastičnim“ svojstvima, ali to ništa ne govori o njihovim mehanizmima obrane od prooksidacijskog djelovanja AK.

Vrsta stanične smrti

Analizom vrste stanične smrti nađeno je da 24-satna *in vitro* inkubacija u 10 mM AK kod osjetljivih stanica uglavnom uzrokuje ranu apoptozu te kasnu apoptozu / ranu nekrozu, što

je u skladu s preliminarnim istraživanjem (32). Sve stanične linije su pokazale određenu osjetljivost na AK, a najosjetljivije su bile U2OS i OS-TMS iz uzorka P3. Navedeno može biti rezultat prooksidacijskog djelovanja AK i utjecaja kiselog okoliša na stanice na kojeg one mogu imati različito razvijene prilagodbene mehanizme. bFGF nije imao značajnijeg utjecaja na izazivanje stanične smrti.

Metaboličko profiliranje

Tehnologija Seahorse XF u našoj studiji je pokazala da netretirane OS-TMS P1 i P2 mogu koristiti oba metabolička puta, vjerojatnije OXPHOS, a P3 su bile glikolitičke. Kad ih se izložilo pojačanim metaboličkim zahtjevima, OS-TMS su više koristile OXPHOS. Pri tretmanu s 10 mM AK s i bez bFGF-a, OS-TMS su pojačale metabolizam u smjeru OXPHOS. Sve stanice osim iz uzorka P3 su pokazale da zadržavaju metabolički profil OXPHOS, bez obzira na primjenu stresora. OS-TMS uzorka P3 su pokazale da dodatkom stresora pojačavaju OXPHOS i time se metabolički poravnavaju s ostalim OS-TMS. 10 mM AK kojom su stanice bile tretirane kroz 24 sata, ubrzala je metabolizam OS-TMS, osim u uzorku P3 s dodatkom bFGF-a. Tretman AK-om, dakle, nije pokazao očekivano smanjenje metabolizma OS-TMS, kao niti kod HEK 293. Smanjenje OXPHOS je zabilježeno u tretiranim MMS i U2OS, te se pojačao njihov glikolitički izražaj, no ne u mjeri da bi posve prešle na glikolizu. Zaključno, AK-om tretirane OS-TMS, s i bez bFGF, uglavnom se oslanjaju na OXPHOS, a AK ubrzava njihov metabolizam. Moguće je da je AK smanjila glikolitički potencijal ispitivanih OS-TMS. Navedeno nije potpuno u skladu s izvještajima iz literature koji govore u prilog glikolitičkom metaboličkom profilu OS-TMS (141, 142). Uzorci korišteni za istraživanje su bioptati tumora uzeti iz zahvaćenog ekstremiteta od različitih bolesnika za vrijeme dijagnostičke biopsije, prije bilo kakvog terapijskog tretmana, pri čemu se vodilo računa da se uzme reprezentativni dio tumora, a ne nekrotični. Moguće je da su te OS-TMS uglavnom imale razvijena oba metabolička puta, ali su koristile OXPHOS jer su živjele u kisikom dostatnim uvjetima. Moguće je također da su OS-TMS uzorka P3 koristile glikolizu u trenutku provođenja eksperimenta jer su bile u nekoj vrsti stresa (rasle su usporeno, zabilježena su zagađenja stanične kulture plijesnima, zamrzavanje, ponavljanja procesa uzgoja). MMS i U2OS su također preferirale OXPHOS. Što se tiče MMS, nije u skladu s očekivanjem da su matične stanice nužno isključivo glikolitične, ali jest da imaju zadržan potencijal glikolize te da bolje diferencirane stanice OS pokazuju odmak od glikolize. HEK 293 su očekivano preferirale OXPHOS.

Razlike u rezultatima istraživanja metaboličkih profila TMS raznih vrsta tumora imaju nekoliko objašnjenja koje treba imati u vidu kod provođenja sličnih istraživanja. Jedno

predloženo objašnjenje je utjecaj eksperimentalnih uvjeta i čimbenika koji se dodaju staničnim kulturama. Drugo je mikrookoliš jer se metabolički status TMS razlikuje u normoksičnim, hipoksičnim i metastatskim lokacijama, a ulogu ima i stroma tumora. Primjerice, fibroblasti iz tumorske strome proizvode različite metabolite koji mogu utjecati na metabolizam tumorskih stanica. Treći je utjecaj stupnja diferencijacije OS-TMS u trenutku dobivanja uzorka i dosadašnje prilagodbe OS-TMS (143). Četvrto je samo definiranje TMS. Naime, razvijeno je nekoliko metoda za identifikaciju i izolaciju TMS na temelju njihovog svojstva samoobnavljanja. Funkcionalni *in vitro* testovi obično se primjenjuju na početku uzgoja izoliranih TMS za povećanje njihove količine. Nakon toga slijede kvalitativni testovi te *in vivo* provjera matičnosti, no redoslijed i odabir testova ovise o studiji. Funkcionalni *in vitro* test za stvaranje tumorskih sfera u neprijanjajućim uvjetima i bez seruma često služi kao početni korak za obogaćivanje staničnih populacija sličnih TMS. Standardna metoda za potvrdu TMS *in vivo* je serijska transplantacija izoliranih potencijalnih TMS u gole miševe za procjenu tumorskog kapaciteta pri malom broju stanica. Nedostatak ovih testova je taj što mirne TMS možda neće biti identificirane. U vezi s njima često se koriste metode opisne analize, poput mjerenja razine izražaja čimbenika povezanih s matičnošću i identifikacija na temelju površinskih biljega stanice. Da bi se procijenila stvarna populacija TMS koje pokazuju svojstvo otpornosti na lijekove, koriste se test izbacivanja boje i dokaz aktivnosti ALDH. Primjena i interpretacija metoda zahtijeva promišljanje, jer se ni jednom od njih u eksperimentalnim uvjetima ne mogu dobiti potpuno čiste populacije TMS, niti se mogu otkriti sve eventualne subpopulacije TMS. Metode dakle pružaju dokaz veće vjerojatnosti da je ispitivani uzorak bogat TMS, no nedostaje im utjecaj okoliša i tumorske niše koje je teško u potpunosti eksperimentalno oponašati, a koji imaju dodatni utjecaj u odabiru čistih TMS. Trebalo bi, dakle, koristiti niz metoda i pažljivo interpretirati rezultate (144).

Odgovor OS-TMS na *in vitro* tretman s 10 mM AK uglavnom je bilo pojačanje metabolizma i zadržavanje metaboličkog puta OXPHOS. Razlog tome možda leži u njihovoj reakciji na signale iz okoline (razni metaboliti, pH). Pod acidozom (AK stvara kiseli mikrookoliš), metaboličko reprogramiranje malignih stanica je povezano s brзом sposobnošću promjene izražaja različitih staničnih kanala za protone ili povećanjem broja i veličine lizosoma (145). Chano i sur. su pokazali da acidoza potiče metaboličko reprogramiranje. Održavanje epigenetskog profila u stresnim uvjetima je ključni mehanizam za preživljavanje malignih stanica i promicanje integriteta genoma te učinkovitosti kloniranja (146). Metaboličke prilagodbe pod acidozom utječu na epigenetske promjene tumora kao odgovor na preživljavanje na nepovoljni kiseli mikrookoliš već nakon 24 sata. Koristeći OXPHOS, OS-TMS su kratkoročno metabolički

preživjele možebitno djelovanje AK na put glikolize. Kad je riječ o OS-TMS koje su i tako izuzete iz vijabilnih dijelova tumora, a ne iz nekrotičnih, razumljiv je njihov potencijal za namicanje energije putem OXPHOS, odnosno neovisnost isključivo o glikolizi. Pojačanje metabolizma hipotetski je mogao biti odraz aktivacije prilagodbenih mehanizama stanica na djelovanje AK. Također je moguće da zadržavanje njihovih matičnih svojstava nije nužno vezano za glikolizu, nego je glikoliza njihov potencijalni metabolički put kojega aktiviraju kad se nađu u hipoksičnim uvjetima. Sve navedeno govori o plastičnosti OS-TMS.

Promjene koje smo primijetili su zapravo prva reakcija OS-TMS prilagodbe kiselom mikrokolišu zbog prisutnosti AK. U jednoj studiji metabolizam prilagođen izvanstaničnoj acidozi u smislu smanjenja glikolize je utjecao na brzinu proliferacije stanica OS. Smanjenje glikolize (Western blot analizom je utvrđen nestanak GAPDH u OS-TMS tretiranim AK-om) kao odgovor na ekstracelularnu acidozu može biti učinkovit sustav povratne sprege kako bi se izbjeglo daljnje zakiseljavanje ekstracelularnog prostora, koji bi u konačnici mogao dovesti do pretjeranog zakiseljavanja citosola i stanične smrti, što ukazuje na to da acidoza inducira metaboličku prilagodbu do neke granice. OS stanice su navodno osjetljivije na liječenje pod acidozom nego pod neutralnim pH, posebno ako su joj predugo izložene, što se objašnjava iscrpljivanjem staničnih mehanizama za preživljenje u kiselom mikrokolišu (147). Nameće se pitanje što bi se dogodilo da smo OS-TMS duže inkubirali u AK i kako bi se dogotrajna i ciljana inkubacija tumora u suprafiziološkim koncentracijama AK mogla reproducirati u živom organizmu.

Prednosti istraživanja

Iako smo u preliminarnom istraživanju i sami na jednom uzorku OS imali dojam selektivnog djelovanja AK na OS-TMS (32), proširena istraživanja koristeći nelinejske OS-TMS su ukazala da bi se moglo raditi o složenim i višesmjernim reakcijama ove još nedovoljno poznate subpopulacije stanica na djelovanje AK *in vitro*, što je u skladu s najnovijim istraživanjima o različitim mogućim reakcijama tumorskih stanica na AK (86, 148). Premda je ispitan mali broj uzoraka, i taj broj nam je bio dovoljan da zaključimo kako nelinejske stanice OS ne moraju jednoznačno reagirati na tretman AK-om.

Tijekom izvođenja pokusa, utvrdili smo da laboratorijski čimbenici mogu utjecati na rezultate proučavanja OS-TMS, primjerice način uzgoja sarkosfera i izolacije OS-TMS, zatim koncentracija AK, dodavanje bFGF i dužina inkubacije stanica u AK. Stoga smo, radi boljeg razumijevanja, dodatno ispitali utjecaj bFGF kao važnog čimbenika koji se uobičajeno uz AK dodaje staničnom mediju pri uzgoju OS-TMS. Pokazali smo i da OS-TMS iz ispitanih uzoraka

nisu jednoznačno pokazale selektivnu osjetljivost na djelovanje AK. Štoviše, niže doze su u nekim uzorcima OS-TMS povećale njihovu vijabilnost, dok su visoke doze AK smanjile vijabilnost netumorskih stanica. To treba imati na umu kad se razmatra primjena AK u bolesnika oboljelih od OS. Navedeno je već primijećeno kod melanoma (149). Primjenom protočnog citometra smo pokazali da AK može uzrokovati apoptozu velikog dijela OS-TMS, ali i drugih vrsta stanica, no nismo se zadržali samo na tome, jer je za objektivniji uvid u djelovanje AK na OS-TMS potrebno koristiti više različitih metoda molekularne biologije. Tako smo obuhvatnijim pristupom pokazali da se nestanak GAPDH ne mora nužno povezivati s negativnim djelovanjem ROS u OS-TMS, da nelinejske OS-TMS nisu isključivo glikolitične, te da AK ne izaziva samo apoptozu nego i prilagodbenu reakciju OS-TMS, sugerirajući njihovu metaboličku plastičnost.

Nedostaci istaživanja

Nije ispitan učinak cisplatine na OS-TMS jer smo za usporedbu koristili negativne stanične kontrole, a stanice izuzete od različitih bolesnika mogu različito odgovoriti na protutumorske lijekove. Osim toga, u liječenju OS koriste se i drugi protutumorski lijekovi pa bi usporedba s utjecajem same cisplatine na OS-TMS bila nedovoljno reprezentativna.

Nisu ispitane parentalne stanice jer se radi o heterogenoj populaciji stanica. Potvrda matičnosti se temeljila samo na uzgoju dviju generacija sarkosfera i izbacivanju boje. Istraživanje je provedeno na malom broju uzoraka tumorskog tkiva pa bi za traženje eventualnog „obrasca“ reakcije tumorskih stanica na AK trebao daleko veći broj uzoraka nelinejskih OS-TMS. Za uzorak P3 nije provedena statistička analiza jer je većina uzoraka bila u duplikatima umjesto u triplicatima zbog tehničkih problema oko uzgoja OS-TMS uzorka P3. U istraživanju nije korištena DHA (zbog svoje izrazite nestabilnosti), a koja bi prema literaturi vjerojatno izazvala veći apoptotski učinak na TMS nego AK.

Predviđanja daljnjih istraživanja

Na temelju dobivenih rezultata moguće je osmisлити daljnja istraživanja s ciljem proučavanja iscrpljivanja prilagodbenih mehanizama tumorskih stanica na AK, zatim kako bi se ciljano inkubacija tumorskog tkiva u suprafiziološkim koncentracijama AK mogla reproducirati u živom organizmu te istražiti utjecaj AK na OS-TMS nakon tretmana protutumorskim lijekovima i u kombinaciji s drugim sredstvima upliva u stanični metabolizam.

7. ZAKLJUČAK

Uspješno smo uzgojili matične stanice osteosarkoma iz uzoraka bioptata tumorskih tkiva izuzetih od triju bolesnika/-ica.

Matični status tumorskih stanica iz sva tri uzorka smo potvrdili izbacivanjem boje Hoechst 33342.

MTT test vijabilnosti nakon tretmana askorbinskom kiselinom nije veću osjetljivost matičnih stanica osteosarkoma u odnosu na stanične linije HEK 293, normalne mezenhimske matične stanice MMS i linije osteosarkoma U2OS, bez obzira na dodatak bazičnog čimbenik rasta fibroblasta.

Nismo dokazali značajniji porast razine reaktivnih kisikovih vrsta u matičnim stanicama osteosarkoma nakon tretmana askorbinskom kiselinom, bez obzira na dodatak bazičnog čimbenik rasta fibroblasta.

Askorbinska kiselina smanjuje prisutnost gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze u matičnim stanicama osteosarkoma *in vitro*, što ne mora biti nužno povezano s negativnim djelovanjem reaktivnih kisikovih vrsta.

Apoptoza je glavni oblik smrti matičnih stanica osteosarkoma koje su osjetljive na tretman askorbinskom kiselinom.

Matične stanice osteosarkoma mogu koristiti oksidacijsku fosforilaciju.

Pri istraživanju utjecaja askorbinske kiseline na metabolizam matičnih stanica osteosarkoma uzgojenih iz različitih uzoraka tumorskih tkiva izuzetih od bolesnika, ne možemo očekivati jednoznačne rezultate među ispitivanim uzorcima, a ti rezultati se mogu razlikovati i od rezultata dobivenih istraživanjem staničnih linija osteosarkoma.

Askorbinska kiselina ne djeluje selektivno na matične stanice osteosarkoma *in vitro* koje prethodno nisu bile tretirane protutumorskim lijekovima, bez obzira na dodatak bazičnog čimbenik rasta fibroblasta.

Potrebna su daljnja istraživanja učinaka askorbinske kiseline na matične stanice osteosarkoma prije nego se ona uvede kao pomoćno terapijsko sredstvo u liječenju oboljelih od osteosarkoma.

8. SAŽETAK

Stagnacija rezultata liječenja osteosarkoma (OS) ukazuje na potrebu za novim terapijskim metodama. OS se sastoji od različitih staničnih subpopulacija, među kojima su tumorske matične stanice (OS-TMS). Smatra se da OS-TMS imaju sposobnost samobnavljanja i razvijene mehanizme otpornosti na protutumorske lijekove te da su odgovorne za recidiv bolesti. Obzirom na mehanizme otpornosti, OS-TMS je teško uništiti, pa je njihov metabolizam prepoznat kao potencijalna meta terapijskog djelovanja. Smatra se da se tumorske matične stanice, pa tako i OS-TMS, primarno oslanjaju na glikolizu.

Prema prethodnim *in vitro* studijama, askorbinska kiselina (AK) bi mogla selektivno inducirati apoptozu OS-TMS iz staničnih linija prooksidacijskim djelovanjem na gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) i inhibicijom glikolize.

Ovo istraživanje je imalo za cilj ispitati *in vitro* utjecaj AK na metabolizam OS-TMS izoliranih iz uzoraka tumorskih tkiva izuzetih od triju bolesnika tijekom dijagnostičke biopsije, s ciljem boljeg razumijevanja biološkog fenomena djelovanja AK na OS-TMS. Dodatno smo ispitali utjecaj bazičnog čimbenika rasta fibroblasta (bFGF) kao čimbenika koji se uobičajeno dodaje staničnom mediju pri uzgoju OS-TMS.

Istraživanje nije potvrdilo hipotezu da AK selektivno djeluje na OS-TMS, štoviše ona može i povećati njihovu vijabilnost. U osjetljivih stanica, AK je izazvala apoptozu. OS-TMS nisu pokazale značajno veću razinu oksidacijskog stresa pri primjeni AK. AK je imao utjecaj na prisutnost GAPDH u OS-TMS što ne mora biti povezano s negativnim djelovanjem reaktivnih kisikovih vrsta. Pokazalo se da OS-TMS nisu nužno isključivo glikolitične nego pokazuju metaboličku plastičnost, štoviše, mogu koristiti oksidacijsku fosforilaciju. bFGF je imao utjecaj na varijabilnost dobivenih rezultata.

Rezultati ovog istraživanja upućuju na to da bi za istraživanje djelovanja AK na OS-TMS trebalo koristiti nelinejske stanice i više metoda molekularne biologije čime bi se mogao dobiti cjelovitiji uvid. Također, rezultati sugeriraju da bi AK mogla biti slabo terapijsko sredstvo u eradikaciji OS-TMS kod bolesnika koji prethodno nisu bili izloženi protutumorskom liječenju. Potrebna su daljnja istraživanja učinaka AK na nelinejske stanice OS-a prije nego se ona uvede kao pomoćno terapijsko sredstvo u liječenju oboljelih od OS.

9. SUMMARY

Title of doctoral thesis: The effects of ascorbic acid on metabolism of osteosarcoma stem cells grown from patients' tumour tissue samples.

Stagnation of osteosarcoma (OS) treatment results indicates the need for new therapeutic methods. OS consists of different cell subpopulations, among which are cancer stem cells (OS-CSCs). It is believed that OS-CSCs have the ability to self-renew and developed mechanisms of resistance to antitumour drugs and are responsible for disease recurrence. Considering the mechanisms of resistance, OS-CSCs are difficult to eradicate, so their metabolism is recognized as a potential target of therapeutic action. OS-CSCs are thought to rely primarily on glycolysis. According to previous *in vitro* studies, ascorbic acid (AA) could selectively induce apoptosis of OS-CSCs from cell lines by prooxidative effect and inhibition of glycolysis.

The aim of this study was to examine the *in vitro* effect of AA on the metabolism of OS-CSCs isolated from tumor tissue samples taken from three patients during diagnostic biopsy, with the aim of better understanding the biological phenomenon of the effect of AA on OS-CSCs. Additionally, we examined the influence of bFGF as a factor that is commonly added to the cell medium during OS-CSCs cultivation.

In this study AA induced apoptosis of non-lineage OS-CSCs, but had no selective effect. OS-CSCs did not show a significantly higher level of oxidative stress when treated with AA. OS-CSCs were not necessarily glycolytic but exhibited metabolic plasticity, moreover, they used oxidative phosphorylation despite their stemness. AA decreased the GAPDH in OS-CSCs, which does not have to be necessarily related to the negative effect of reactive oxygen species. bFGF had an impact on the variability of the obtained results.

Results obtained using different complementary *in vitro* methods suggest that AA is not a potent therapeutic agent in the eradication of OS-TMS in patients who have not been previously exposed to antitumor treatment. Further research of the effects of AA on non-lineage OS cells is needed before it is introduced as an adjunctive therapeutic agent in the treatment of OS patients.

Name of the author: Marijana Šimić Jovičić

Year: 2024

10. POPIS LITERATURE

1. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn P, Mertens F. WHO Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. Lyon: IARC press; 2013.
2. Mirabello L, Troisi JR, Savage AS. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: Data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer*. 2009;115(7):1531–43.
3. Hameed M, Mandelker D. Tumor Syndromes Predisposing to Osteosarcoma. *Adv Anat Pathol*. 2018;25(4):217-22.
4. University of Münster. Osteosarcoma database [Internet]. Münster: CCSR Cancer & Complex Systems Research Group, Institute of Bioinformatics. 2013 Oct - [pristupljeno 16.2.2022.]. Dostupno na: <http://osteosarcoma-db.uni-muenster.de/>.
5. Raymond AK, Ayala AG, Knuutila S. Convencional osteosarcoma. U: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, ur. *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone, WHO Classification of Tumours*. Lyon: IARC press; 2002. Str. 264-70.
6. Jovičić S. Onkolitička viroterapija osteosarkoma visokog stupnja malignosti [specijalistički rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2020.
7. Ramnani D, WebPathology. Osteoblastic osteosarcoma [slika s interneta]. 2022 Mar 31 [pristupljeno 19.4.2022.]. Dostupno na: <https://www.webpathology.com/image.asp?case=335&n=35>
8. Ramnani D, WebPathology. Chondroblastic osteosarcoma [slika s interneta]. 2022 Mar 31 [pristupljeno 19.4.2022.]. Dostupno na: <https://www.webpathology.com/image.asp?case=335&n=32>
9. Ramnani D, WebPathology. Fibroblastic osteosarcoma [slika s interneta]. 2022 Mar 31 [pristupljeno 19.4.2022.]. Dostupno na: <https://www.webpathology.com/image.asp?case=335&n=27>
10. Machado I, Navarro S, Picci P, Llombart-Bosch A. The utility of SATB2 immunohistochemical expression in distinguishing between osteosarcomas and their malignant bone tumor mimickers, such as Ewing sarcomas and chondrosarcomas. *Pathol Res Pract*. 2016;212(9):811-6.
11. Anninga JK, Gelderblom H, Fiocco M, Kroep JR, Taminiau AH, Hogendoorn PC i sur. Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand? *Eur J Cancer*. 2011;47(16):2431-45.

12. Whelan JS, Bielack SS, Marina N, Smeland S, Jovic G, Hook JM i sur. EURAMOS-1, an international randomised study for osteosarcoma: results from pre-randomisation treatment. *Ann Oncol.* 2015;26(2):407-14.
13. Mazzocca A. The Systemic-Evolutionary Theory of the Origin of Cancer (SETOC): A New Interpretative Model of Cancer as a Complex Biological System. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19):4885.
14. Ryu D, Joung JG, Kim NK, Kim KT, Park WY. Deciphering intratumor heterogeneity using cancer genome analysis. *Hum Genet.* 2016;135(6):635-42.
15. Abarrategi A, Tornin J, Martinez-Cruzado L, Hamilton A, Martinez-Campos E, Rodrigo JP i sur. Osteosarcoma: Cells-of-Origin, Cancer Stem Cells, and Targeted Therapies. *Stem Cells Int.* 2016;2016:3631764.
16. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal.* 2011;9:12.
17. Brune JC, Tormin A, Johansson MC, Rissler P, Brosjö O, Löfvenberg R i sur. Mesenchymal stromal cells from primary osteosarcoma are non-malignant and strikingly similar to their bone marrow counterparts. *Int J Cancer.* 2011;129(2):319–30.
18. Rubio R, Gutierrez-Aranda I, Saez-Castillo AI, Labarga A, Rosu-Myles M, Gonzalez-Garcia S i sur. The differentiation stage of p53-Rb-deficient bone marrow mesenchymal stem cells imposes the phenotype of in vivo sarcoma development. *Oncogene.* 2013;32(41):4970–80.
19. Wang JY, Wu PQ, Chen PC, Lee CW, Chen WM, Hung SC. Generation of osteosarcomas from a combination of Rb silencing and c-Myc overexpression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2016;6(2):512–6.
20. Quist T, Jin H, Zhu JF, Smith-Fry K, Capecchi MR, Jones KB. The impact of osteoblastic differentiation on osteosarcomagenesis in the mouse. *Oncogene.* 2015;34(32):4278-84.
21. Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo JV i sur. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature Rev Cancer.* 2012;12(11):767-75.
22. Halldorsson A, Brooks S, Montgomery S, Graham S. Lung metastasis 21 years after initial diagnosis of osteosarcoma: a case report. *J Med Case Rep.* 2009;3:9298.
23. Le Nail LR, Brennan M, Rosset P, Deschaseaux F, Piloquet P, Pichon O i sur. Comparison of Tumor- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Patients with High-Grade Osteosarcoma. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):707.

24. Ridge SM, Sullivan FJ, Glynn SA. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol Cancer*. 2017;16(1):31.
25. Baglio SR, Lagerweij T, Perez Lanzon M, Xuan Ho D, Leveille N, Melo SA i sur. Blocking tumor-educated MSC paracrine activity halts osteosarcoma progression. *Clin Cancer Res*. 2017;23(14):3721–33.
26. Tang QL, Liang Y, Xie XB, Yin JQ, Zou CY, Zhao ZQ i sur. Enrichment of osteosarcoma stem cells by chemotherapy. *Chin J Cancer Res*. 2011;30(6):426-32.
27. Basu-Roy U, Basilico C, Mansukhani A. Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma. *Cancer Lett*. 2013;338(1):158-67.
28. Wang T, Shigdar S, Gantier MP, Hou Y, Wang L, Li Y i sur. Cancer stem cell targeted therapy: progress amid controversies. *Oncotarget*. 29;6(42):44191-206.
29. Giancotti FG, Ruoslahti E: Integrin signaling. *Science*. 1999; 285(5430):1028-32.
30. Diaz-Montero CM, McIntyre BW. Acquisition of anoikis resistance in human osteosarcoma cells. *Eur J Cancer*. 2003; 39(16):2395-402.
31. Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, Scott EW i sur. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia*. 2005;7(11):967–76.
32. Skube K. The Effects of ascorbic acid on osteosaroma stem cells [diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2018.
33. Tirino V, Desiderio V, Paino F, Papaccio G, De Rosa M. Methods for cancer stem cell detection and isolation. *Methods Mol Biol*. 2012;879:513-29.
34. Murase M, Kano M, Tsukahara T, Takahashi A, Torigoe T, Kawaguchi S i sur. Side population cells have the characteristics of cancer stem-like cells/cancer-initiating cells in bone sarcomas. *British J Cancer*. 2009;101(8):1425-32.
35. Yang M, Yan M, Zhang R, Li J, Luo Z. Side population cells isolated from human osteosarcoma are enriched with tumor-initiating cells. *Cancer Sci*. 2011;102(10):1774-81.
36. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, La Noce M i sur. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J*. 2013;27(1):13-24.
37. Martins-Neves SR, Lopes AO, Carmo A, Paiva AA, Simoes PC, Abrunhosa AJ i sur. Therapeutic implications of an enriched cancer stem-like cell population in a human osteosarcoma cell line. *BMC Cancer*. 2012;12:139.
38. Basu-Roy U, Seo E, Ramanathapuram L, Rapp TB, Perry JA, Orkin SH i sur. Sox2 maintains self renewal of tumor-initiating cells in osteosarcomas. *Oncogene*. 2012;31(18):2270-82.

39. Tang L, Wang D, Gu D. Knockdown of Sox2 Inhibits OS Cells Invasion and Migration via Modulating Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Pathol Oncol Res.* 2018;24(4):907-13.
40. Yan GN, Lv YF, Guo QN. Advances in osteosarcoma stem cell research and opportunities for novel therapeutic targets. *Cancer Lett.* 2016;370(2):268-74.
41. Fujii H, Honoki K, Tsujiuchi T, Kido A, Yoshitani K, Takakura Y. Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. *Int J Oncol.* 2009;34(5):1381-6.
42. Honoki K, Fujii H, Kubo A, Kido A, Mori T, Tanaka Y i sur. Possible involvement of stem-like populations with elevated ALDH1 in sarcomas for chemotherapeutic drug resistance. *Oncol Rep.* 2010;24(2):501-5.
43. Greco N, Schott T, Mu X, Rothenberg A, Voigt C, McGough RL i sur. ALDH Activity Correlates with Metastatic Potential in Primary Sarcomas of Bone. *J. Cancer Ther.* 2014;5(4):331-8.
44. Adhikari AS, Agarwal N, Wood BM, Porretta C, Ruiz B, Pochampally RR i sur. CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor-initiating cells associated with metastasis and drug resistance. *Cancer Res.* 2010;70(11):4602-12.
45. Morath I, Hartmann TN, Orian-Rousseau V. CD44: More than a mere stem cell marker. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;81(Pt A):166-73.
46. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky LW, Weinberg K, Barr ML i sur. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells.* 2006;24(4):928-35.
47. Li J, Zhong XY, Li ZY, Cai JF, Zou L, Li JM i sur. CD133 expression in osteosarcoma and derivation of CD133(+) cells. *Mol Med Rep.* 2013;7(2):577-84.
48. He A, Qi W, Huang Y, Feng T, Chen J, Sun Y i sur. CD133 expression predicts lung metastasis and poor prognosis in osteosarcoma patients: A clinical and experimental study. *Exp Ther Med.* 2012;4(3):435-41.
49. Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. *Oncogene.* 2003;22(42):6557-63.
50. Tian J, Li X, Si M, Liu T, Li J. CD271+ osteosarcoma cells display stem-like properties. *PLoS One.* 2014;9(6):e98549.
51. Kise K, Kinugasa-Katayama Y, Takakura N. Tumor microenvironment for cancer stem cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;99(Pt B):197-205.
52. He J, Xiong L, Li Q, Lin L, Miao X, Yan S i sur. 3D modeling of cancer stem cell niche.

- Oncotarget. 2017;9(1):1326-45.
53. Oskarsson T, Batlle E, Massagué J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell*. 2014;14(3):306-21.
 54. Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(9):671-7.
 55. Melzer C, von der Ohe J, Lehnert H, Ungefroren H, Hass R. Cancer stem cell niche models and contribution by mesenchymal stroma/stem cells. *Mol Cancer*. 2017;16(1):28.
 56. Jiang WG, Sanders AJ, Katoh M, Ungefroren H, Gieseler F, Prince M i sur. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Semin Cancer Biol*. 2015;35:244-75.
 57. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669-92.
 58. Dumars C, Ngyuen JM, Gaultier A, Lanel R, Corradini N, Gouin F i sur. Dysregulation of macrophage polarization is associated with the metastatic process in osteosarcoma. *Oncotarget*. 2016;7(48):7834-54.
 59. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-64.
 60. Liu J, Mi J, Zhou BP. Metabolic rewiring in cancer-associated fibroblasts provides a niche for oncogenesis and metastatic dissemination. *Mol Cell Oncology*. 2015;3(1):e1056331.
 61. Geary LA, Nash KA, Adisetiyo H, Liang M, Liao CP, Jeong JH i sur. CAF-Secreted Annexin A1 Induces Prostate Cancer Cells to Gain Stem Cell-like Features. *Mol Cancer Res*. 2014;12(4):607–21.
 62. Bodo M, Lilli C, Bellucci C, Carinci P, Calvitti M, Pezzetti F i sur. Basic fibroblast growth factor autocrine loop controls human osteosarcoma phenotyping and differentiation. *Mol Med*. 2002;8(7):393-404.
 63. Wikipedia: the free encyclopedia [Internet]. Wikimedia Foundation, Inc. Metabolism; [ažurirano 25.02.2022; pristupljeno 03.03.2022.]. Dostupno na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Metabolism>
 64. Schmidt-Rohr K. Oxygen Is the High-Energy Molecule Powering Complex Multicellular Life: Fundamental Corrections to Traditional Bioenergetics. *ACS Omega*. 2020;5(5):2221-33.
 65. Biologydictionary.net Editors, Biology dictionary. Electron Transport Chain and Oxidative Phosphorylation [slika s interneta]. 2018 Aug 21 [pristupljeno 20.04.2022.]. Dostupno na:

- <https://biologydictionary.net/electron-transport-chain-and-oxidative-phosphorylation/>.
66. Wikipedia: the free encyclopedia. Mitochondrial electron transport chain [slika s interneta]. 2007 Nov 9 [pristupljeno 20.04.2022.].
Dostupno na: https://en.wikipedia.org/wiki/Oxidative_phosphorylation.
 67. Rich PR. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem Soc Trans*. 2003;31(Pt 6):1095-105.
 68. Kadenbach B, Ramzan R, Wen L, Vogt S. New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1800(3):205-12.
 69. Shafe T, Wikipedia: the free encyclopedia. Glycolysis metabolic pathway [slika s interneta]. 2015 Apr 1 [pristupljeno 21.04.2022.].
Dostupno na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Glycolysis>.
 70. Akram M. Mini-review on glycolysis and cancer. *J Cancer Educ*. 2013;28(3):454-7.
 71. Suda T, Takubo K, Semenza GL. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. 2011;9(4):298-310.
 72. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309–14.
 73. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029–33.
 74. Ciavardelli D, Rossi C, Barcaroli D, Volpe S, Consalvo A, Zucchelli M i sur. Breast cancer stem cells rely on fermentative glycolysis and are sensitive to 2-deoxyglucose treatment. *Cell Death Dis*. 2014;5(7):e1336.
 75. Liao J, Qian F, Tchabo N, Mhaweche-Fauceglia P, Beck A, Qian Z i sur. Ovarian cancer spheroid cells with stem cell-like properties contribute to tumor generation, metastasis and chemotherapy resistance through hypoxia-resistant metabolism. *PLoS One*. 2014;9(1):e84941.
 76. Palorini R, Votta G, Balestrieri C, Monestiroli A, Olivieri S, Vento R i sur. Energy metabolism characterization of a novel cancer stem cell-like line 3AB-OS. *J Cell Biochem*. 2014;115(2):368–79.
 77. Zhou Y, Zhou Y, Shingu T, Feng L, Chen Z, Ogasawara M i sur Metabolic alterations in highly tumorigenic glioblastoma cells: preference for hypoxia and high dependency on glycolysis. *J Biol Chem*. 2011;286(37):32843–53.
 78. Chen KY, Liu X, Bu P, Lin CS, Rakhilin N, Locasale JW i sur. A metabolic signature of colon cancer initiating cells. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2014;2014:4759-62.
 79. Peiris-Pagès M, Martinez-Outschoorn UE, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer stem

- cell metabolism. *Breast Cancer Res.* 2016;18(1):55.
80. Dando I, Dalla Pozza E, Biondani G, Cordani M, Palmieri M, Donadelli M. The metabolic landscape of cancer stem cells. *IUBMB Life.* 2015;67(9):687–93.
 81. Folmes CD, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Arrell DK, Lindor JZ, Dzeja PP i sur. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-de-pendent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab.* 2011;14(2):264–71.
 82. Hammoudi N, Ahmed KB, Garcia-Prieto C, Huang P. Metabolic alterations in cancer cells and therapeutic implications. *Chin J Cancer.* 2011;30(8):508–25.
 83. Koka P, Mundre RS, Rangarajan R, Chandramohan Y, Subramanian RK, Dhanasekaran A. Uncoupling Warburg effect and stemness in CD133⁺ cancer stem cells from Saos-2 (osteosarcoma) cell line under hypoxia. *Mol Biol Rep.* 2018;45(6):1653–62.
 84. De Luca A, Fiorillo M, Peiris-Pagès M, Ozsvari B, Smith DL, Sanchez-Alvarez R i sur. Mitochondrial biogenesis is required for the anchorage-independent survival and propagation of stem-like cancer cells. *Oncotarget.* 2015;6(17):14777–95.
 85. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN i sur. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature.* 2009;458(7239):780–3.
 86. Šimić Jovičić M, Pušić M, Antunović M, Ledinski M, Librenjak L, Kolundžić R i sur. *In vitro* effects of ascorbic acid on viability and metabolism of patients' osteosarcoma stem cells. *Acta Pharm.* 2022;72(4):599–613.
 87. Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(9):611–22.
 88. Bonuccelli G, Tsigirgos A, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Pestell RG, Chiavarina B i sur. Ketones and lactate “fuel” tumor growth and metastasis: evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell Cycle.* 2010;9(17):3506–14.
 89. Ren L, Hong ES, Mendoza A, Issaq S, Tran Hoang C, Lizardo M i sur. Metabolomics uncovers a link between inositol metabolism and osteosarcoma metastasis. *Oncotarget.* 2017;8(24):38541–53.
 90. Snyder V, Reed-Newman TC, Arnold L, Thomas SM, Anant S. Cancer Stem Cell Metabolism and Potential Therapeutic Targets. *Front. Oncol.* 2018;8:203.
 91. Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M i sur. Dereglulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem.* 2000;275(29):21797–800.
 92. Krishna S, Low IC, Pervaiz S. Regulation of mitochondrial metabolism: yet another facet

- in the biology of the oncoprotein Bcl-2. *Biochem J.* 2011;435(3):545-51.
93. Issaq SH, Teicher BA, Monks A. Bioenergetic properties of human sarcoma cells help define sensitivity to metabolic inhibitors. *Cell Cycle.* 2014;13(7):1152-61.
 94. Doseděl M, Jirkovský E, Macáková K, Krčmová LK, Javorská L, Pourová J i sur. Vitamin C-Sources, Physiological Role, Kinetics, Deficiency, Use, Toxicity, and Determination. *Nutrients.* 2021;13(2):615.
 95. Savini I, Rossi A, Pierro C, Avigliano L, Catani MV. SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids.* 2008;34(3):347-55.
 96. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010;49(1):1603-16.
 97. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:711-60.
 98. de Carvalho Melo-Cavalcante AA, da Rocha Sousa L, Alencar MVOB, de Oliveira Santos JV, da Mata AMO, Paz MFCJ i sur. Retinol palmitate and ascorbic acid: Role in oncological prevention and therapy *Biomed Pharmacother.* 2019;109:1394-405.
 99. Shenoy N, Creagan E, Witzig T, Levine M. Ascorbic Acid in Cancer Treatment: Let the Phoenix Fly. *Cancer Cell.* 2018;34(5):700-6.
 100. González MJ, Miranda-Massari JR, Mora EM, Guzmán A, Riordan NH, Riordan HD i sur. Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later. 2005;4(1):32-44.
 101. Mata AM, Carvalho RM, Alencar MV, Cavalcante AA, Silva BB. Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2016;62(7):680-6.
 102. González MJ, Rosario-Pérez G, Guzmán AM, Miranda-Massari JR, Duconge J, Lavergne J i sur. Mitochondria, energy and cancer: the relationship with ascorbic acid. *J Orthomol Med.* 2010;25(1):29-38.
 103. Andrisic L, Dudzik D, Barbas C, Milkovic L, Grune T, Zarkovic N. Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer. *Redox Biol.* 2018;14:47-58.
 104. Harris IS, Treloar AE, Inoue S, Sasaki M, Gorrini C, Lee KC i sur. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. *Cancer Cell.* 2015;27(2):211-22.
 105. Beatty A, Fink LS, Singh T, Strigun A, Peter E, Ferrer CM. Metabolite Profiling Reveals the Glutathione Biosynthetic Pathway as a Therapeutic Target in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2018;17(1):264-75.
 106. Doskey CM, Buranasudja V, Wagner BA, Wilkes JG, Du J, Cullen JJ i sur. Tumor cells

- have decreased ability to metabolize H₂O₂: Implications for pharmacological ascorbate in cancer therapy. *Redox Biol.* 2016;10:274-84.
107. Yun J, Mullarky E, Lu C, Bosch KN, Kavalier A, Rivera K i sur. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science*. 2015;350(6266):1391-6.
 108. Park S, Han SS, Park CH, Hahm ER, Lee SJ, Park HK i sur. L-Ascorbic acid induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells via hydrogen peroxide-mediated mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(11):2180-95.
 109. Bonuccelli G, De Francesco EM, de Boer R, Tanowitz HB, Lisanti MP. NADH autofluorescence, a new metabolic biomarker for cancer stem cells: Identification of Vitamin C and CAPE as natural products targeting “stemness.” *Oncotarget* 2015;8(13):20667-78.
 110. Uetaki M, Tabata S, Nakasuka F, Soga T, Tomita M. Metabolomic alterations in human cancer cells by vitamin C-induced oxidative stress. *Sci Rep.* 2015;5:13896.
 111. Kaźmierczak-Barańska J, Boguszevska K, Adamus-Grabicka A, Karwowski BT. Two Faces of Vitamin C-Antioxidative and Pro-Oxidative Agent. *Nutrients*. 2020;12(5):1501.
 112. Fernandes, G., Barone, A. W. and Dziak, R. The effect of ascorbic acid on bone cancer cells in vitro. *Cogent Biology.* 2017;3(1):1288335.
 113. Valenti MT, Zanatta M, Donatelli L, Viviano G, Cavallini C, Scupoli MT i sur. Ascorbic acid induces either differentiation or apoptosis in MG-63 osteosarcoma lineage. *Anticancer Res.* 2014;34(4):1617-27.
 114. Bose S, Sarkar N, Vahabzadeh S. Sustained release of vitamin C from PCL coated TCP induces proliferation and differentiation of osteoblast cells and suppresses osteosarcoma cell growth. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;105:110096.
 115. Oka N, Komuro A, Amano H, Dash S, Honda M, Ota K i sur. Ascorbate sensitizes human osteosarcoma cells to the cytostatic effects of cisplatin. *Pharmacol Res Perspect.* 2020;8(4):e00632.
 116. Čimbora Zovko T. MTT test. U: Ambriović Ristov A, ur. *Metode u molekularnoj biologiji*. Zagreb: Institut Ruđer Bošković; 2007. Str.98-9.
 117. Abcam Limited. Counting cells using a hemocytometer [Internet]. Cambridge (UK): Abcam Limited. 2021 Mar - [pristupljeno 04.07.2022.]. Dostupno na: <https://www.abcam.com/protocols/counting-cells-using-a-haemocytometer>.
 118. Reiniers MJ, van Golen RF, Bonnet S, Broekgaarden M, van Gulik TM, Egmond MR i

- sur. Preparation and Practical Applications of 2',7'- Dichlorodihydrofluorescein in Redox Assays. *Anal. Chem.* 2017;89(7):3853–7.
119. Vujaklija D., Sabolić I, Mikoč A. Western analiza. U: Ambriović Ristov A, ur. Metode u molekularnoj biologiji. Zagreb: Institut Ruđer Bošković; 2007. Str.583-94.
 120. Antica M. Utvrđivanje i mjerenje apoptoze protočnim citometrom. U: Ambriović Ristov A, ur. Metode u molekularnoj biologiji. Zagreb: Institut Ruđer Bošković; 2007. Str.792-3.
 121. Agilent. How to run an assay [Internet]. Santa Clara (US): Agilent. 2005 Jul - [pristupljeno 24.05.2022.]. Dostupno na:
<https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/how-to-run-an-assay>.
 122. Agilent. Agilent Seahorse XF Mito Stress Test Kit User Guide Kit 103015-100 [Internet]. 2. izd. Wilmington: Agilent Technologies, Inc (US); 2019 - [pristupljeno 25.05.2022.] Dostupno na:
https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Cell_Mito_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf.
 123. Agilent. Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Test Kit User Guide Kit 103020-100 [Internet]. 2. izd. Wilmington: Agilent Technologies, Inc (US); 2019 - [pristupljeno 25.05.2022.] Dostupno na:
https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Glycolysis_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf
 124. Librenjak L. The effects of ascorbic acid on viability and metabolism of osteosarcoma stem cells [diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2021.
 125. Zhang JY, Zhang F, Hong CQ, Giuliano AE, Cui XJ, Zhou GJ i sur. Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. *Cancer Biol Med.* 2015;12(1):10-22.
 126. Hwang NR, Yim SH, Kim YM, Jeong J, Song EJ, Lee Y i sur. Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions. *Biochem J.* 2009;423(2):253-64.
 127. Dvorak P, Dvorakova D, Hampl A. Fibroblast growth factor signaling in embryonic and cancer stem cells. *FEBS Lett.* 2006;580(12):2869–74.
 128. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(3):235–53.
 129. Marie PJ, Coffin JD, Hurley MM. FGF and FGFR signaling in chondrodysplasias and

- craniosynostosis. *J Cell Biochem.* 2005;96(5):888–96.
130. Mansukhani A, Bellosta P, Sahni M, Basilico C. Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J Cell Biol.* 2000;149(6):1297–308.
 131. Mansukhani A, Ambrosetti D, Holmes G, Cornivelli L, Basilico C. Sox2 induction by FGF and FGFR2 activating mutations inhibits Wnt signaling and osteoblast differentiation. *J Cell Biol.* 2005;168(7):1065–76.
 132. Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(2):233–47.
 133. Go MJ, Takenaka C, Ohgushi H. Effect of forced expression of basic fibroblast growth factor in human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Biochem.* 2007;142(6):741–8.
 134. Wiedlocha A, Falnes PO, Rapak A, Munoz R, Klingenberg O, Olsnes S. Stimulation of proliferation of a human osteosarcoma cell line by exogenous acidic fibroblast growth factor requires both activation of receptor tyrosine kinase and growth factor internalization. *Mol Cell Biol.* 1996;16(1):270–80.
 135. Baird K, Davis S, Antonescu CR, Harper UL, Walker RL, Chen Y i sur. Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer Res.* 2005;65(20):9226–35.
 136. Shimizu T, Ishikawa T, Iwai S, Ueki A, Sugihara E, Onishi N i sur. Fibroblast Growth Factor-2 Is an Important Factor that Maintains Cellular Immaturity and Contributes to Aggressiveness of Osteosarcoma. *Mol Cancer Res.* 2012;10(3):454–68.
 137. Basu-Roy U, Seo E, Ramanathapuram L, Rapp TB, Perry JA, Orkin SH i sur. Sox2 maintains self renewal of tumor-initiating cells in osteosarcomas. *Oncogene.* 2011;31(18):2270–82.
 138. Yamada K, Yoshitake Y, Norimatsu H, Nishikawa K. Roles of various growth factors in growth of human osteosarcoma cells which can grow in protein-free medium. *Cell Struct Funct.* 1992;17(1):9–17.
 139. Bae SH, Ryu H, Rhee KJ, Oh JE, Baik SK, Shim KY i sur. L-ascorbic acid 2-phosphate and fibroblast growth factor-2 treatment maintains differentiation potential in bone marrow-derived mesenchymal stem cells through expression of hepatocyte growth factor. *Growth Factors.* 2015;33(2):71–8.
 140. Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E i sur. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in

- response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;288(2):413-9.
141. Zhong Z, Mao S, Lin H, Li H, Lin J, Lin JM. Alteration of intracellular metabolome in osteosarcoma stem cells revealed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2019;204:6–12.
 142. Mizushima E, Tsukahara T, Emori M, Murata K, Akamatsu A, Shibayama Y i sur. Osteosarcoma-initiating cells show high aerobic glycolysis and attenuation of oxidative phosphorylation mediated by LIN28B. *Cancer science*. 2020;111(1):36–46.
 143. Zhang D, Wang Y, Shi Z, Liu J, Sun P, Hou X i sur. Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by IDH3alpha downregulation. *Cell Rep* 2015;10(8):1335–48.
 144. Brown HK, Tellez-Gabriel M, Heymann D. Cancer stem cells in osteosarcoma. *Cancer Lett*. 2017;386:189-95.
 145. Lamonte G, Tang X, Chen JL, Wu J, Ding CK, Keenan MM i sur. Acidosis induces reprogramming of cellular metabolism to mitigate oxidative stress. *Cancer Metab*. 2013;1(1):23.
 146. Chano T, Avnet S, Kusuzaki K, Bonuccelli G, Sonveaux P, Rotili D i sur. Tumour-specific metabolic adaptation to acidosis is coupled to epigenetic stability in osteosarcoma cells. *Am J Cancer Res*. 2016;6(4):859-75.
 147. Cui J, Wang W, Li Z, Zhang Z, Wu B, Zeng L. Epigenetic changes in osteosarcoma. *Bull Cancer*. 2011;98(7):62-8.
 148. Maekawa T, Miyake T, Tani M, Uemoto S. Diverse antitumor effects of ascorbic acid on cancer cells and the tumor microenvironment. *Front Oncol*. 2022;12:981547.
 149. Yang G, Yan Y, Ma Y, Yang Y. Vitamin C at high concentrations induces cytotoxicity in malignant melanoma but promotes tumor growth at low concentrations. *Mol Carcinog*. 2017;56(8):1965-76.

11. KRATKA BIOGRAFIJA

Marijana Šimić Jovičić je rođena 06.10.1981 u Livnu, a djetinjstvo je provela u Kupresu (Bosna i Hercegovina). Od 1992. godine živi u Zagrebu gdje je dovršila osnovnu školu. Godine 2000. je završila prirodoslovno-matematičku gimnaziju (V. gimnazija) te je iste godine upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 2006. godine. Pripravnički staž za doktore medicine u trajanju od jedne godine je obavila u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, a tijekom i nakon staža se zainteresirala za ortopediju. Nakon položenog stručnog ispita pred komisijom Ministarstva zdravstva 2008. godine, dvije godine je radila u Specijalnoj bolnici za ortopediju i traumatologiju „Akromion“. Od 2012. godine je zaposlena u Klinici za dječje bolesti Zagreb, gdje je 2013. godine započela specijalističko usavršavanje. Specijalistički ispit iz ortopedije i traumatologije je položila 2018. godine. Godine 2024. je započela uže specijalističko usavršavanje iz dječje ortopedije i dio je liječničkog tima Odjela za dječju ortopediju Klinike za dječje bolesti Zagreb.

PRILOG I

Obavijest o istraživanju za roditelje/skrbnike maloljetne osobe

„Selektivno ciljanje matičnih stanica sarkoma askorbinskom kiselinom“

Poštovani/poštovana,

Informiramo Vas o znanstvenom istraživanju „**Selektivno ciljanje matičnih stanica sarkoma askorbinskom kiselinom**“ u kojemu, isključivo uz Vašu suglasnost, može sudjelovati Vaše dijete/štićenik u svojstvu ispitanika.

Sarkomi su agresivni tumori koji su unatoč operaciji i kemoterapiji u određenom postotku slučajeva skloni ponovnom javljanju. Ako bismo pronašli način da djelujemo na stanice koje su odgovorne za ponovno javljanje tumorske bolesti, mogli bismo potpuno uništiti sve tumorske stanice i tako više ne bi bilo mogućnosti ponovne pojave bolesti.

Istraživanje provodi prof.dr.sc. Inga Urlić s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu zajedno sa svojim suradnicima.

Sudjelovanje Vašeg djeteta/štićenika u istraživanju treba se temeljiti na jasnom razumijevanju ciljeva navedenog istraživanja, načina i postupaka za njegovo provođenje te mogućih koristi ili rizika za Vaše dijete/štićenika kao ispitanika. Stoga Vas molimo da prije donošenja odluke pažljivo pročitate i proučite ovu obavijest. Ako u njoj naiđete na bilo kakve nejasnoće, nepoznate riječi i izraze, slobodni ste pitati istraživača i liječnike koji sudjeluju u istraživanju da Vam ih razjasne. Oni su naime spremni odgovoriti na svako Vaše pitanje vezano za navedeno istraživanje.

Napomena: Termin ispitanik odnosi se jednako na osobe muškog i ženskog spola.

OPIS KLJUČNOG PROBLEMA I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Sarkom je vrsta zloćudne bolesti-raka, koji ako se ne liječi, završi smrtnim ishodom. Zbog niske učestalosti i velikog broja podvrsta, sarkomi su u terapijskom smislu zahtjevna bolest. Upravo zato, potrebno je ciljati njihovu zajedničku osobinu, a to je postojanje matičnih stanica sarkoma. One predstavljaju mali udio u staničnoj populaciji tumora koje imaju sposobnost započinjanja zloćudnog procesa. Otporne su na terapije i zadržavaju sposobnost obnavljanja tumora. Zbog specifičnosti matičnih stanica sarkoma, za njihovo uništenje potrebno je ciljati njihove molekularne različitosti. Matične stanice sarkoma se, kao i druge matične stanice, smatraju mirujućima te imaju karakterističan metabolički profil.

Naši preliminarni rezultati ukazuju da askorbinska kiselina (AK), koja je inače poznata i pod nazivom vitamin C, ima jak toksični učinak na matične stanice sarkoma, ali ne utječe toksično na druge stanice. Stoga bi željeli pobliže istražiti utjecaj AK na matične stanice

sarkoma. Nakon što proučimo utjecaj AK na matične stanice sarkoma, istražili bi na koji način primijeniti AK u ljudskom organizmu, a da bude djelotvorna u uništavanju tumorskih stanica i neštetna za zdrave stanice.

Matične stanice sarkoma i primarne stanice osteosarkoma dobili bi od oboljelih osoba-ispitanika, a osim njih ispitat ćemo i mezenhimske matične stanice i stanične linije U2OS i HEK293. Mezenhimske matične stanice su one stanice iz kojih se razvija dio tkiva našeg organizma, međuostalim i kosti. Stanične linije su stanice koje se koriste u laboratorijima za različita ispitivanja. Dakle, navedene mezenhimske matične i linijske stanice ne dobivamo od ispitanika uključenih u istraživanje.

Kod svih navedenih vrsta stanica odredit ćemo jesu li stanice, nakon tretiranja AK-om žive (vijabilnost). Ako nisu, odredit ćemo o kojoj vrsti stanične smrti se radi i koje je optimalno doziranje AK. Ako je osjetljivost na AK specifična za matične stanice osteosarkoma, postoji mogućnost da je specifična i za matične stanice drugih tumora. Stoga bi ovi rezultati mogli imati velik klinički značaj jer bi se AK mogla koristiti kao pomoćna terapija uz standardne lijekove s ciljem uništenja matične populacije stanica unutar tumora.

SVRHA ISTRAŽIVANJA

Proučiti utjecaj AK na matične stanice sarkoma radi poboljšanja terapijskog pristupa sarkomima.

ULOGA VAŠEG DJETETA/ŠTIĆENIKA KAO ISPITANIKA U ISTRAŽIVANJU

Istraživanje bi uključilo djecu i adolescente koji se liječe u Klinici za dječje bolesti Zagreb i punoljetne osobe koje se liječe u Klinici za traumatologiju KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu zbog različitih sarkoma sustava za kretanje pa tako i osteosarkoma. Nakon učinjene biopsije ili odstranjenja tumora, izdvojio bi se jedan manji uzorak tumorskog tkiva za istraživanje. Veličina uzorka tkiva za istraživanje biti će podređena intraoperativnom nalazu, a iznosi 0,5-1,5 cm³. Uzorak će izdvojiti liječnik operater te će se po uzimanju označeni uzorak proslijediti voditeljici istraživanja u posebnom mediju, da bi se nakon odgovarajuće obrade podvrgao uzgoju tumorskih matičnih stanica i djelovanju AK kako je gore opisano. Analize će se provesti na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Osim uzimanja uzorka za vrijeme operativnog zahvata, koristit će se podaci o bolesti dobiveni patohistološkom analizom i podaci o primijenjenom liječenju. Tijekom istraživanja dijete neće morati mijenjati životne navike niti tijekom liječenja.

KOJE SU MOGUĆE KORISTI OD SUDJELOVANJA VAŠEG DJETETA/ŠTIĆENIKA U ISTRAŽIVANJU?

Moguća korist je da ćete sudjelovanjem Vašeg djeteta/štićenika u istraživanju omogućiti da se dođe do novih spoznaja koje bi mogle doprinijeti razvoju novih medicinskih postupaka usmjerenih liječenju sarkoma.

KOJI SU MOGUĆI RIZICI ZA VAŠE DIJETE/ŠTIĆENIKA KOJE SUDJELUJE U ISTRAŽIVANJU?

Uzorak će uzeti liječnik operater samo ako procijeni da je uzorkovanje sigurno i da neće utjecati na uobičajene dijagnostičke i terapijske postupke.

PRIMIJEŃUJU LI SE ZBOG ISTRAŢIVANJA DODATNI LIJEKOVI, DODATNE DIJAGNOSTIČKE METODE ILI DRUGAČIJI OPERACIJSKI PRISTUPI?

Zbog svoje bolesti djeteta treba operativni zahvat neovisno o istraŢivanju. IstraŢivanje ne uključuje nikakve dodatne dijagnostičke obrade niti uvođenje lijekova. Uzimanje uzorka neće mijenjati liječenje niti operativnu tehniku. Naime, svaki roditelj/skrbnik je u sklopu uobičajene procedure informiranja i potpisivanja suglasnosti za operativni zahvat i anesteziološke postupke, upoznat od strane operatera odnosno anesteziologa o operativnom zahvatu, te prednostima i mogućim rizicima koje sa sobom nose liječenje i anesteziološki postupci. Stoga se ovaj informirani pristanak odnosi na sastavnice koje uključuje samo istraŢivanje.

MORA LI VAŠE DIJETE/ŠTIĆENIK SUDJELOVATI U ISTRAŢIVANJU?

Vi ćete u potpunosti slobodno i samostalno odlučiti hoće li Vaše dijete/štićenik sudjelovati u ovom istraŢivanju. Sudjelovanje je dragovoljno i u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga, imate pravo bez ikakvih posljedica odlučiti da se dijete povlači iz istraŢivanja. I u tom slučaju dijete će se nastaviti dalje liječiti na način koji je uobičajen. Ako odlučite prekinuti sudjelovanje djeteta u istraŢivanju, lijepo Vas molimo da o tome na vrijeme obavijestite voditeljicu istraŢivanja ili njezine suradnike liječnike. Možete izabrati za Vaše dijete/štićenika: sudjelovanje ili nesudjelovanje, ili odustajanje od sudjelovanja u bilo kojem trenutku istraŢivanja. Vaše nepristajanje ili odluka o odustajanju od sudjelovanja neće imati nikakve negativne posljedice na daljnje liječenje Vašeg djeteta/štićenika.

POVJERLJIVOST I PRAVO UVIDA U DOKUMENTACIJU

Svi osobni podaci djeteta biti će pohranjeni i obrađivani u elektroničkom obliku, a voditeljica istraŢivanja i njezini suradnici su duŢni u potpunosti poštivati propisane postupke za zaštitu osobnih podataka. Podaci će biti uneseni pomoću posebne oznake pridružene svakom ispitaniku. Pristup medicinskoj dokumentaciji djeteta mogu imati liječnici suradnici u istraŢivanju, članovi Etičkog povjerenstva Klinike za dječje bolesti Zagreb u kojoj se liječi dijete i voditeljica istraŢivanja. Po završenom istraŢivanju uzorci se neće bez Vaše suglasnosti koristiti u druge istraŢivačke svrhe.

ZA ŠTO ĆE SE KORISTITI REZULTATI DOBIVENI U OVOM ZNANSTVENOM ISTRAŢIVANJU?

Dobiveni rezultati će se, bez otkrivanja osobnih podataka o ispitanicima, koristiti za izradu doktorskih disertacija i objaviti u znanstvenim časopisima u obliku znanstvenih članaka, radi dostupnosti rezultata istraŢivanja ostalim istraŢivačima i liječnicima koji se bave problematikom liječenja sarkoma, ali i kritičkoj prosudbi šire znanstvene zajednice.

TKO ORGANIZIRA I FINANCIRA OVO ISTRAŢIVANJE?

IstraŢivanje organizira tim molekularnih biologa Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u suradnji s liječnicima Klinike za dječje bolesti Zagreb i Klinike za traumatologiju KBC Sestre milosrdnice. Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ) je odobrila sredstva za financiranje ovog istraŢivanja, nakon detaljnog uvida u sadržaj istraŢivanja. Stoga će HRZZ detaljno biti obaviještena o tijeku i rezultatima istraŢivanja. IstraŢivači koji provode ovo istraŢivanje neće primiti nikakvu osobnu financijsku naknadu. Liječnici

operateri i njihovi asistenti također neće primiti nikakvu financijsku naknadu za prikupljanje uzoraka potrebnih za istraživanje.

TKO JE ODOBRILO OVO ISTRAŽIVANJE?

Ovo istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Klinike za dječje bolesti Zagreb (za maloljetne osobe) i Etičko povjerenstvo KBC Sestre milosrdnice nakon temeljite analize dostavljenog prijedloga istraživanja te prateće dokumentacije. Istraživanje se provodi u skladu sa svim primjenjivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja te sigurnost osoba koje u njemu sudjeluju, uključujući Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske i Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske.

KOGA MOŽETE KONTAKTIRATI ZA DODATNE OBAVIJESTI I UPUTE?

Kao roditelji sudionika/sudionice istraživanja imate pravo na informacije o istraživanju. Možete pitati u vezi istraživanja bilo kada tijekom sudjelovanja u istraživanju. Ako imate bilo kakvih pitanja slobodno možete kontaktirati:

Voditeljicu istraživanja: prof. Ingu Urlić, tel. 01 4606 275, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb;

Operatera svog djeteta: osobno ili na broj telefona Odjela za dječju ortopediju s dnevnim bolnicom Klinike za dječje bolesti Zagreb 01 4600 211;

Suradnicu u istraživanju dr. Marijanu Šimić Jovičić, osobno ili na broj telefona Odjela za dječju ortopediju s dnevnim bolnicom Klinike za dječje bolesti Zagreb 01 4600 211.

POTPISANA SUGLASNOST ZA SUDJELOVANJE U OVOM ISTRAŽIVANJU

Ako pristajete na sudjelovanje Vašeg djeteta/štićenika u ovom istraživanju trebate potpisati „Suglasnost roditelja/skrbnika za sudjelovanje maloljetne osobe u znanstvenom istraživanju“, a presliku ćete dobiti Vi i voditeljica istraživanja. Izvorni primjerak dokumenta će se zadržati i čuvati u Klinici za dječje bolesti Zagreb.

Ispitanicima se neće se isplaćivati naknada za sudjelovanje u istraživanju.

Vama kao roditeljima se neće isplaćivati naknada za sudjelovanje Vašeg djeteta/štićenika u istraživanju.

Hvala Vam što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili mogućnost sudjelovanja Vašeg djeteta u ovom znanstvenom istraživanju.

Ova obavijest je sastavljena u skladu s odredbama Zakona o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakona o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

PRILOG II

Suglasnost roditelja /skrbnika za sudjelovanje maloljetne osobe u znanstvenom istraživanju

„Selektivno ciljanje matičnih stanica sarkoma askorbinskom kiselinom“

Ako je ispitanik u znanstvenom istraživanju maloljetna osoba (osoba mlađa od 18 godina), pristanak za sudjelovanje u istraživanju treba dati roditelj ili zakonski zastupnik to jest skrbnik.

1. Potvrđujem da sam dana _____ u Zagrebu pročitao/pročitala Obavijest za roditelje/zakonskog zastupnika ispitanika za gore navedeno znanstveno istraživanje te sam imao/imala priliku postavljati pitanja.
2. Razumijem da je sudjelovanje mog djeteta/mog štićenika dragovoljno i da se iz sudjelovanja u istraživanju može povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i bez ikakvih posljedica za svoje zdravstveno stanje ili pravni status.
3. Razumijem da medicinskoj dokumentaciji mog djeteta/mog štićenika pristup imaju samo odgovorne osobe, to jest voditeljica istraživanja i njezini suradnici liječnici te članovi Etičkog povjerenstva ustanove u kojoj se istraživanje obavlja. Tim osobama dajem dopuštenje za pristup medicinskoj dokumentaciji mog djeteta/mog štićenika.
4. Želim i pristajem da moje dijete/moj štićenik sudjeluje u navedenom znanstvenom istraživanju.

Ime i prezime roditelja/zakonskog zastupnika/skrbnika:

Vlastoručni potpis

U Zagrebu, _____

Ime i prezime istraživača koji je vodio/la razgovor s roditeljem /zakonskim zastupnikom/skrbnikom

Vlastoručni potpis

U Zagrebu, _____

PRILOG III

Obavijest o istraživanju za maloljetnu osobu

„Selektivno ciljanje matičnih stanica sarkoma askorbinskom kiselinom“

Poštovani/poštovana,

Informiramo te o znanstvenom istraživanju **„Selektivno ciljanje matičnih stanica sarkoma askorbinskom kiselinom“** u kojemu možeš sudjelovati isključivo uz svoju suglasnost i suglasnost svojih roditelja/skrbnika.

Sarkomi sustava za kretanje su izrasline (tumori) koje se unatoč operaciji i lijekovima u određenom postotku slučajeva mogu ponovno javiti. Ako bismo pronašli stanice koje su odgovorne za ponovno javljanje tumorske bolesti i utjecali na njih da postanu osjetljive na liječenje kemoterapijom i zračenjem, mogli bismo potpuno uništiti sve tumorske stanice i tako više ne bi bilo mogućnosti ponovne pojave bolesti. Te stanice bi mogle biti uništene i izlaganjem određenim molekulama, kao što je primjerice askorbinska kiselina (vitamin C), no potrebno je istražiti njihovu osjetljivost na vitamin C.

Istraživanje provodi profesorica Inga Urlić s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu zajedno sa svojim suradnicima.

Tvoje sudjelovanje u istraživanju treba se temeljiti na jasnom razumijevanju ciljeva navedenog istraživanja, načina i postupaka za njegovo provođenje te mogućih koristi ili rizika za tebe kao ispitanika. Stoga te molimo da prije donošenja odluke pažljivo pročitaš i proučiš ovu obavijest. Ako u njoj naiđeš na bilo kakve nejasnoće, nepoznate riječi i izraze, slobodan/slobodna si pitati istraživača i liječnike koji sudjeluju u istraživanju da ti ih razjasne. Oni su naime spremni odgovoriti na svako tvoje pitanje vezano za navedeno istraživanje.

Napomena: Termin ispitanik odnosi se jednako na osobe muškog i ženskog spola.

OPIS KLJUČNOG PROBLEMA I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Kao i ostali tumori, sarkomi se sastoje od različitih stanica različitog stupnja zrelosti. Dio stanica odgovornih za rast i širenje tumora su tzv. tumorske matične stanice. Nova saznanja govore da su upravo te stanice tumora uzrokom otpornosti na zračenje i kemoterapiju, a time i uzrokom ponovne pojave bolesti. Većina lijekova koji se koriste u liječenju tumora djeluje na tumorske stanice koje se brzo umnožavaju, međutim ne umnožavaju se sve stanice u tumoru jednako brzo. Tumor se sastoji i od stanica koje se ne umnožavaju brzo. To su matične stanice tumora koje su odgovorne za rast i širenje tumora i otporne su na standardne lijekove koji se koriste u liječenju tumora. Te stanice izolirane iz sarkoma bi se podvrgnule djelovanju askorbinske kiseline (u nastavku teksta AK). Naši preliminarni rezultati ukazuju da AK, koja je inače poznata i pod nazivom

vitamin C, uništava matične stanice sarkoma, ali ne šteti drugim stanicama. Stoga bi željeli pobliže istražiti utjecaj AK na matične stanice sarkoma. Nakon što proučimo utjecaj AK na matične stanice sarkoma, istražili bi na koji način primijeniti AK u ljudskom organizmu, a da bude djelotvorna u uništavanju tumorskih stanica i neštetna za zdrave stanice.

Matične stanice sarkoma i primarne stanice osteosarkoma dobili bi od oboljelih osoba-ispitanika, a osim njih ispitat ćemo i mezenhimske matične stanice i stanične linije U2OS i HEK293. Mezenhimske matične stanice su one stanice iz kojih se razvija dio tkiva našeg organizma, međuostalim i kosti. Stanične linije su stanice koje se koriste u laboratorijima za različita ispitivanja. Dakle, navedene mezenhimske matične i linijske stanice ne dobivamo od ispitanika uključenih u istraživanje.

Kod svih navedenih vrsta stanica odredit ćemo jesu li stanice, nakon tretiranja AK-om žive. Ako nisu, odredit ćemo o kojoj vrsti stanične smrti se radi i koje je najbolje doziranje AK. Ako su matične stanice osteosarkoma osjetljive na AK, postoji mogućnost da su matične stanice i drugih sličnih tumora osjetljive na AK. Stoga bi ovi rezultati mogli imati velik značaj, jer bi se AK mogla koristiti kao pomoćna terapija uz standardne lijekove s ciljem uništenja matičnih stanica sarkoma.

SVRHA ISTRAŽIVANJA

Proučiti utjecaj AK na matične stanice sarkoma radi poboljšanja terapijskog pristupa sarkomima.

TVOJA ULOGA KAO ISPITANIKA U ISTRAŽIVANJU

Istraživanje bi uključilo djecu i adolescente koji se liječe u Klinici za dječje bolesti Zagreb i punoljetne osobe koje se liječe u Klinici za traumatologiju KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu zbog različitih sarkoma sustava za kretanje pa tako i osteosarkoma. Nakon učinjene biopsije ili odstranjenja tumora, izdvojio bi se jedan manji uzorak tumorskog tkiva za istraživanje. Veličina uzorka tkiva za istraživanje ovisit će nalazu tijekom operacije, a iznosi 0,5-1,5 cm³. Uzorak će izdvojiti liječnik operater te će se po uzimanju označeni uzorak proslijediti voditeljici istraživanja u posebnoj epruveti, da bi se nakon odgovarajuće obrade podvrgao uzgoju tumorskih matičnih stanica i djelovanju AK kako je gore opisano. Analize će se provesti na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Osim uzimanja uzorka za vrijeme operativnog zahvata, koristit će se podaci o bolesti dobiveni analizom tumorskog tkiva i podaci o primijenjenom liječenju. Tijekom istraživanja nećeš morati mijenjati životne navike niti tijekom liječenja.

KOJE SU MOGUĆE KORISTI OD TVOG SUDJELOVANJA U ISTRAŽIVANJU?

Moguća korist je u tome da ćeš sudjelovanjem u istraživanju omogućiti da se dođe do novih spoznaja koje bi mogle doprinijeti razvoju novih medicinskih postupaka usmjerenih liječenju sarkoma sustava za kretanje.

KOJI SU ZA MOGUĆI ZA TEBE AKO SUDJELUJEŠ U ISTRAŽIVANJU?

Uzorak će uzeti liječnik operater samo ako procijeni da uzorkovanje neće utjecati na uobičajene dijagnostičke i terapijske postupke. Liječnik te neće izlagati nikakvim rizicima radi istraživanja.

PRIMIJEŃUJU LI SE ZBOG ISTRAŃIVANJA DODATNI LIJEKOVI, DODATNE DIJAGNOSTIČKE METODE ILI DRUGAČIJI OPERACIJSKI PRISTUPI?

Zbog svoje bolesti trebaš operativni zahvat neovisno o istraŃivanju. IstraŃivanje ne uključuje nikakve dodatne dijagnostičke obrade niti uvođenje lijekova. Uzimanje uzorka neće mijenjati liječenje niti operativnu tehniku. Naime, tvoj roditelj/zakonski skrbnik je u sklopu uobičajene procedure informiranja i potpisivanja suglasnosti za operativni zahvat i anesteziološke postupke, upoznat od strane operatera odnosno anesteziologa o operativnom zahvatu, te prednostima i mogućim rizicima koje sa sobom nose liječenje i anesteziološki postupci. Stoga se ovaj informirani pristanak odnosi na sastavnice koje uključuje samo istraŃivanje.

MORAŠ LI SUDJELOVATI U ISTRAŃIVANJU?

Ti ćeš u potpunosti slobodno i u dogovoru sa svojim roditeljima/skrbnicima odlučiti hoćeš li sudjelovati u ovom istraŃivanju. Sudjelovanje je dragovoljno i u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga, imaš pravo bez ikakvih posljedica odlučiti da se povlačiš iz istraŃivanja. I u tom slučaju ćeš se nastaviti dalje liječiti na način koji je uobičajen. Ako odlučiš prekinuti sudjelovanje u istraŃivanju, lijepo te molimo da o tome na vrijeme kažeš roditeljima/skrbnicima ili svom liječniku. Možeš dakle izabrati sudjelovati ili ne sudjelovati ili možeš odustati od sudjelovanja u bilo kojem trenutku istraŃivanja. Tvoje nepristajanje ili odustajanje od sudjelovanja neće imati nikakve negativne posljedice na tvoje daljnje liječenje.

POVJERLJIVOST I PRAVO UVIDA U DOKUMENTACIJU

Svi tvoji osobni podaci biti će pohranjeni i obrađivani u elektroničkom obliku, a voditeljica istraŃivanja i njezini suradnici će u potpunosti poštivati propisane postupke za zaštitu osobnih podataka. Podaci će biti uneseni pomoću posebne oznake pridružene svakom ispitaniku. Tvoju medicinsku dokumentaciju će pregledavati samo voditeljica istraŃivanja i liječnici koji sudjeluju u tvom liječenju. Pristup dokumentaciji mogu imati i predstavnici Etičkog povjerenstva Klinike za dječje bolesti Zagreb u kojoj se liječiš. Po završenom istraŃivanju uzorci se neće bez tvog pristanka, odnosno tvojih roditelja/skrbnika koristiti u drugu svrhu.

ZA ŠTO ĆE SE KORISTITI REZULTATI DOBIVENI U OVOM ZNANSTVENOM ISTRAŃIVANJU?

Dobiveni rezultati će se, bez otkrivanja tvojih osobnih podataka koristiti, za izradu doktorskih disertacija i objaviti u znanstvenim časopisima u obliku znanstvenih članaka, radi dostupnosti rezultata istraŃivanja ostalim istraŃivačima i liječnicima koji se bave istraŃivanjem i liječenjem sarkoma.

TKO ORGANIZIRA I FINANCIRA OVO ISTRAŃIVANJE?

IstraŃivanje organizira grupa molekularnih biologa Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u suradnji s liječnicima Klinike za dječje bolesti Zagreb i Klinike za traumatologiju KBC Sestre milosrdnice. Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ) je odobrila sredstva za financiranje ovog istraŃivanja, nakon detaljnog uvida u sadržaj istraŃivanja. Stoga će HRZZ detaljno biti obaviještena o tijeku i rezultatima istraŃivanja. IstraŃivači koji

provode ovo istraživanje neće primiti nikakvu osobnu financijsku naknadu. Liječnici operateri i njihovi asistenti također neće primiti nikakvu financijsku naknadu za prikupljanje uzoraka potrebnih za istraživanje.

TKO JE ODOBRILO OVO ISTRAŽIVANJE?

Ovo istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Klinike za dječje bolesti Zagreb (za maloljetne osobe) i Etičko povjerenstvo KBC Sestre milosrdnice nakon temeljite analize dostavljenog prijedloga istraživanja te prateće dokumentacije. Istraživanje se provodi u skladu sa svim primjenjivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja te sigurnost osoba koje u njemu sudjeluju, uključujući Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske i Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske.

KOGA MOŽEŠ KONTAKTIRATI ZA DODATNE OBAVIJESTI I UPUTE?

Kao sudionik/sudionica u istraživanju imaš pravo na informacije o istraživanju. Možeš pitati u vezi istraživanja bilo kada tijekom sudjelovanja u istraživanju. Ako imaš bilo kakvih pitanja slobodno možeš kontaktirati:

Voditeljicu istraživanja: profesoricu Ingu Urlić, tel. 01 4606 275, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb;

Liječnika koji će te operirati: osobno ili na broj telefona Odjela za dječju ortopediju Klinike za dječje bolesti Zagreb 01 4600 211;

Suradnicu u istraživanju dr. Marijanu Šimić Jovičić, osobno ili na broj telefona Odjela za dječju ortopediju Klinike za dječje bolesti Zagreb 01 4600 211.

SUGLASNOST ZA SUDJELOVANJE U OVOM ISTRAŽIVANJU

Dokument pod naslovom „Suglasnost maloljetne osobe za sudjelovanje u znanstvenom istraživanju“ trebaš potpisati u dogovoru sa svojim roditeljima/skrbnicima ako pristaješ sudjelovati u ovom istraživanju, a njegov preslik će dobiti tvoji roditelji/skrbnici i voditeljica istraživanja. Izvorni primjerak dokumenta će se zadržati i čuvati u Klinici za dječje bolesti Zagreb.

Ispitanicima se neće se isplaćivati naknada za sudjelovanje u istraživanju.

Roditeljima se neće isplaćivati naknada za sudjelovanje njihovog djeteta/štićenika u istraživanju.

Hvala što si pročitao/pročitala ovaj dokument i razmotrio/razmotrila mogućnost sudjelovanja u ovom znanstvenom istraživanju.

Ova obavijest je sastavljena u skladu s odredbama Zakona o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakona o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

PRILOG IV

Suglasnost maloljetne osobe za sudjelovanje u znanstvenom istraživanju

„Selektivno ciljanje matičnih stanica sarkoma askorbinskom kiselinom“

Istraživači su dužni s maloljetnim osobama u dobi od 12-17 godina razgovarati o predloženom znanstvenom istraživanju i uzeti u obzir njihovu želju i odluku o sudjelovanju u istraživanju.

1. Potvrđujem da sam dana _____ u Zagrebu pročitao/pročitala Obavijest za ispitanika za gore navedeno znanstveno istraživanje te sam imao/imala priliku postavljati pitanja.
2. Razumijem da je moje sudjelovanje u istraživanju dragovoljno i da se iz sudjelovanja u istraživanju mogu povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i bez ikakvih posljedica za svoje zdravstveno stanje ili pravni status.
3. Razumijem da mojoj medicinskoj dokumentaciji pristup imaju samo odgovorne osobe, to jest voditeljica istraživanja i njezini suradnici liječnici te članovi Etičkog povjerenstva ustanove u kojoj se istraživanje obavlja. Tim osobama dajem dopuštenje za pristup mojoj medicinskoj dokumentaciji.
4. Želim i pristajem sudjelovati u navedenom znanstvenom istraživanju.

Ime i prezime ispitanika (za ispitanike iznad 12 godina kojima se prethodno u prisutnosti roditelja/skrbnika razumljivo objasni istraživanje).

Vlastoručni potpis

U Zagrebu, _____

Ime i prezime osobe koja je vodila postupak Obavijesti za ispitanika i Suglasnosti za sudjelovanje:

Vlastoručni potpis

U Zagrebu, _____