

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Karla Ostojić

Karakterizacija tumorskih matičnih stanica tijekom progresije osteosarkoma

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Inga Urlić

Zagreb, 2026.

Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Science

Department of Biology

Karla Ostojić

Characterization of tumor stem cells during osteosarcoma progression

DOCTORAL DISSERTATION

Mentor: Professor Inga Urlić, PhD

Zagreb, 2026

Ovaj doktorski rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Inge Urlić u sklopu doktorskog studija Biologija pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Informacije o mentoru

INGA URLIĆ je završila studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje je 1997. stekla zvanje diplomirane inženjerke molekularne biologije. Doktorirala je 2004. godine na istom fakultetu u području prirodnih znanosti, polju biologije. Doktorsko istraživanje provela je na University of Connecticut Health Centre u Sjedinjenim Američkim Državama, radeći na genskoj regulaciji diferencijacije koštanih stanica i genskoj terapiji bolesti koštanog tkiva.

Na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu zaposlena je od 2004. godine. Trenutačno je redovita profesorica i znanstvena savjetnica u području prirodnih znanosti, polju biologije. U nastavnom radu nositeljica je niza kolegija iz molekularne i stanične biologije na preddiplomskomm i diplomskomm studiju molekularne biologije te na interdisciplinarnim programima poput BioMedMath studija te je vanjska suradnica na Fakulteti elektrotehnike i računarstva.

Znanstveni rad prof. Urlić usmjeren je na biologiju matičnih stanica, tumorsku biologiju, regeneraciju kosti i hrskavice te razvoj biomaterijala i tkivnog inženjerstva. Voditeljica je ili suvoditeljica niza nacionalnih i međunarodnih projekata, uključujući projekte financirane iz programa Horizon Europe i Horizon 2020, Hrvatske zaklade za znanost i industrijskih partnera.

Na PMF-u obnaša brojne stručne funkcije, među ostalim kao koordinatorica za studente s invaliditetom i ranjive skupine, članica Gospodarskog savjeta i Odbora za bioetiku i dobrobit životinja. Posebnu pozornost posvećuje mentorskom radu s mladim istraživačima te je mentorirala osam doktorskih disertacija iz područja molekularne biologije, tumorske biologije i tkivnog inženjerstva.

Zahvale

Prije svega, neizmjerno sam zahvalna svojoj mentorici, *prof. dr. sc. Ingi Urlić*, na pruženoj prilici za izradu ove doktorske disertacije. Hvala ti na stručnom vodstvu, svim savjetima i podršci tijekom ovog razdoblja. Posebno sam zahvalna na mentorstvu kakvo bi svatko mogao samo poželjeti – na tvojoj opuštenosti, pravednosti, razumijevanju i povjerenju koje si mi pružala. Na ovom putu naučila sam mnogo više od onoga što se može pronaći u znanstvenoj literaturi, a na tome sam ti posebno zahvalna.

Od srca zahvaljujem dragoj *dr. sc. Katarini Caput Mihalić* na svakoj lijepoj riječi, nesebičnoj podršci, korisnom savjetu i svakoj ispijenoj kavi. Hvala Ti što si svojim prisustvom, razumijevanjem i spremnošću da saslušaš učinila ovaj put ljepšim i lakšim.

Posebno sam zahvalna na svim poznanstvima i prijateljstvima koja su se rodila tijekom ovog razdoblja, a koja su ovom iskustvu dala vrijednost daleko veću od same znanstvene spoznaje.

Veliko hvala mojoj kolegici *dr. sc. Maji Ledinski*, koja me od samih početaka uvela u sve ono što izrada doktorata sa sobom nosi. Hvala Ti na nesebičnoj pomoći, podršci i prijateljstvu koje mi je mnogo značilo tijekom ovog puta.

Posebno mjesto u ovim zahvalama pripada mojoj dragoj prijateljici i kolegici, *dr. sc. Pauli Gršković.* Hvala Ti na svim dugim razgovorima, savjetima, pojedenim čokoladama i pogledanim utakmicama. Hvala Ti što si bila tu i u ozbiljnim i u onim manje ozbiljnim trenucima, kada je upravo malo smijeha bilo ono što je najviše trebalo. Nadam se da nam takvih trenutaka, razgovora i utakmica nikada neće nedostajati.

Hvala mojim dragim *BioMed Juniorima Marti Protrki, mag. biol. mol.* i *Anji Krstulović, mag. biol. mol.,* na svim vedrim trenucima, smijehu i lijepim uspomenama, ali i podijeljenim brigama. Posebno Vam hvala na podršci tijekom posljednje faze izrade ove disertacije, koja mi je u tom razdoblju zaista mnogo značila.

Zahvalna sam i na prijateljstvu *dr. sc. Ive Bazine*. Hvala Ti na svakom osmijehu, podršci i dobroj energiji kojom uvijek uspiješ stvoriti pozitivnu atmosferu.

Hvala i *dr. sc. Diana Culej Bošnjak, dr. med., spec. ginekologije i opstetricije*, na tvojoj smirenosti, podršci i lijepim trenucima koje smo podijelile.

Zahvaljujem *dr. sc. Pauli Brayer* na bioinformatičkoj pomoći, suradnji i lijepim trenutcima.

Zahvaljujem *prof. dr. sc. Petri Korać* na svim znanstvenim savjetima, korisnim informacijama i lijepim trenucima. Hvala ti na susretljivosti, spremnosti da podijeliš svoje znanje i na svemu čime si pridonijela mom znanstvenom razvoju.

Hvala i *prof. dr. sc. Maji Matulić* na korisnim znanstvenim savjetima, susretljivosti i spremnosti na pomoć kada je to bilo potrebno.

Veliko hvala *prof. dr. sc. Ivici Rubelju.* Zahvaljujem na susretljivosti i spremnosti na suradnju, a *prof. dr. sc. Miljenku Huzaku* na svoj pomoći, strpljenju, smirenosti i ustrajnosti, osobito u trenucima kada mi je to bilo najpotrebnije. Hvala Vam što ste svojim znanjem, razumijevanjem i podrškom pomogli da i oni zahtjevniji dijelovi ovog puta postanu lakši.

Zahvaljujem *izv. prof. dr. sc. Anamariji Rogini* na svim zajedničkim suradnjama i pruženim prilikama. Zahvaljujući tebi, otvorila mi se prilika za odlazak u Valenciju, koja mi je ostala u lijepom sjećanju i na poseban način obilježila ovo razdoblje.

Veliko hvala i mojim diplomantima, Andriji, Vanni, Jakovu i Jakobu, na trudu, predanosti i strpljenju tijekom našeg zajedničkog rada. Bilo mi je zadovoljstvo surađivati s vama, dijeliti izazove i uspjehe koje istraživački proces donosi.

Posebno hvala mojim dragim prijateljicama *Nelli i Mariji*, hvala vam što ste uvijek tu, za razgovore, smijeh, savjete i sve one male trenutke koji život čine ljepšim. Hvala vam na podršci, zajedničkim radostima i prijateljstvu koje je i one zahtjevnije dane činilo lakšima.

Mojoj obitelji, mami, tati i bratu blizancu, od srca hvala na bezuvjetnoj ljubavi, vjeri u mene i podršci koju mi pružate u svakom trenutku. Hvala vam što ste uvijek uz mene, što vjerujete u moje mogućnosti čak i onda kada ja sama posumnjam u njih i što ste mi oduvijek bili sigurno mjesto kojem se mogu vratiti. Vaša ljubav i podrška temelj su na kojem gradim sve svoje uspjehe, a ovaj je jedan od onih koje posebno želim podijeliti s vama. Posebno hvala mojoj baki na svoj ljubavi, brizi i toplini koju mi pruža. Tvoja prisutnost i briga imaju posebno mjesto u mom srcu.

I na kraju, mome Zvoni – hvala Ti na ljubavi, miru i podršci. Hvala Ti što si moje sigurno mjesto, što mi pružaš mir onda kada je najpotrebniji i što vjeruješ u mene i onda kada je put težak. Uz Tebe sve je lakše, a uz Tvoju ljubav i podršku i ono što mi se činilo nemogućim postaje moguće. Hvala Ti što si bio uz mene na ovom putu i što ga svojom prisutnošću činiš ljepšim.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Hipoteza i cilj znanstvenog rada 4

2. LITERATURNI PREGLED 5

2.1. Tumori i njihova klasifikacija 5
2.2. Progresija maligne bolesti 7
2.3. Tumorska heterogenost 9
2.4. Obilježja tumorskih stanica 10
2.5. Neograničen proliferativni potencijal tumora 13
2.5.1. Produljenje telomera aktivacijom telomeraze 15
2.5.2. Alternativni mehanizam produljenja telomera 18
2.6. Sposobnost migracije tumorskih stanica 21
2.6.1. Epitelno–mezenhimska tranzicija 23
2.6.2. Procesi slični epitelno–mezenhimskoj tranziciji 24
2.6.3. Vrste migracije 26
2.7. Osteosarkom 27
2.7.1. Hondroblastični osteosarkom 30
2.7.2. Povijesni pregled i standardni terapijski pristupi liječenja osteosarkoma 30
2.7.3. Molekularna pozadina osteosarkoma 36
2.8. Tumorske matične stanice 40
2.8.1. Signalni putevi tumorskih matičnih stanica 43
2.8.2. Mehanizmi otpornosti tumorskih matičnih stanica na terapije 43
2.8.3. Identifikacija i izolacija tumorskih matičnih stanica 45
2.8.4. Trodimenzionalne stanične kulture 47

3. MATERIJALI I METODE 50

3.1. Uzorci 50
3.2. Uzgoj stanica u staničnoj kulturi 51
3.2.1. Uspostava parentalne kulture stanica iz uzorka osteosarkoma 51
3.2.2. Izolacija tumorskih matičnih stanica iz parentalne kulture stanica 51
3.2.3. Uzgoj staničnih linija 52
3.3. Analiza transkriptoma na razini jedne stanice 53
3.3.1. Priprema knjižnice 53
3.3.2. Obrada podataka sekvenciranja na razini jedne stanice 54
3.3.3. Kontrola kvalitete stanica i analiza transkriptoma 56
3.4. Analiza morfoloških karakteristika tumorskih matičnih stanica tijekom progresije bolesti 58
3.4.1. Gravimetrijska analiza tumorskih sferoida 58
3.4.2. Holografsko snimanje adherentnih tumorskih matičnih stanica 59
3.5. Funkcionalna karakterizacija tumorskih matičnih stanica tijekom progresije bolesti 59
3.5.1. Analiza potencijala inicijacije tumora testom formiranja sferoida 59
3.5.2. Analiza migratorne sposobnosti stanica testom zacjeljivanja rane 60
3.5.3. Imunocitokemijska detekcija markera epitelno-mezenhimske tranzicije 60
3.6. Karakterizacija mehanizama replikacijeske besmrtnosti tumorskih matičnih stanica 61
3.6.1. Određivanje ekspresije gena *hTERT* metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze s reverznom transkripcijom u stvarnom vremenu 61
3.6.2. Određivanje relativne duljine telomera metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu 62
3.6.3. Imunocitokemijska detekcija tijela promijelocitne leukemije povezanih s alternativnim produljenjem telomera 63
3.7. Ispitivanje rezistencije na kemoterapeutike u tumorskim matičnim stanicama i tumorskim sferoidima 64
3.8. Statistička obrada rezultata 65

4. REZULTATI 66

4.1. Promjene u zastupljenosti staničnih subpopulacija i transkriptomskih obilježja tijekom progresije osteosarkoma 66

4.2. Morfološke promjene tumorskih matičnih stanica tijekom progresije osteosarkoma 70

4.2.1. Promijenjenja biofizička karakterizacija tumorskih sferoida tijekom progresije bolesti 70

4.2.2. Povećana ekspresija gena povezanih s remodeliranjem citoskeleta i staničnom adhezijom u recidivu osteosarkoma 71

4.2.3. Morfološka obilježja tumorskih matičnih stanica upućuju na promijenjenu staničnu plastičnost 73

4.3. Zastupljenost stanica koje iniciraju razvoj tumora i povećana migratorna aktivnost stanica u recidivu osteosarkoma 75

4.4. Smanjenje relativne duljine telomera i nalazi koji upućuju na alternativne mehanizme njihova održavanja u osteosarkoma 80

4.5. Povećana osjetljivost stanica na doksorubicin 83

5. RASPRAVA 88

5.1. Specifična pojavnost subpopulacije stanica s obilježjima matičnosti u uzorku recidiva osteosarkoma 88

5.2. Fenotipska plastičnost tumorskih matičnih stanica očituje se kroz različite obrasce stanične organizacije i rasta 91

5.3. Pojačan migracijski potencijal ostvaren visokom plastičnosti i procesima sličnim epitelno-mezenhimskoj tranziciji 95

5.4. Neograničen replikacijski potencijal ostvaren alternativnim mehanizmima produljenja telomera 100

5.5. Recidiv bolesti obilježen povećanom osjetljivošću na doksorubicin i rezistencijom na cisplatinu i metotreksat 104

6. ZAKLJUČAK 108

7. LITERATURA 110

8. ŽIVOTOPIS 129

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diktorska disertacija

KARAKTERIZACIJA TUMORSKIH MATIČNIH STANICA TIJEKOM PROGRESIJE OSTEOSARKOMA

KARLA OSTOJIĆ

Zavod za molekularnu biologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Osteosarkom je najčešći primarni maligni tumor kostiju, koji unatoč napretku u dijagnostici i liječenju i dalje predstavlja značajan terapijski izazov zbog čestih recidiva i razvoja kemorezistencije. U ovom istraživanju provedena je usporedna stanična i molekularna karakterizacija tumorskih matičnih stanica (TMS) iz uzoraka osteosarkoma prikupljenih pri dijagnozi i recidivu. U uzorku recidiva utvrđena je jedinstvena populacija stanica s obilježjima tumorske matičnosti, koju su karakterizirali promijenjena morfologija, povećana migracijska aktivnost i izražena stanična plastičnost, što upućuje na potencijalno invazivniji fenotip. Utvrđene su i razlike u biofizičkim svojstvima sferoida, ekspresiji gena povezanih s organizacijom citoskeleta i interakcijama s izvanstaničnim matriksom te obilježja kompatibilna s mogućim alternativnim mehanizmima održavanja telomera. Funkcionalna ispitivanja pokazala su osjetljivost stanica na doksorubicin te smanjenu osjetljivost na cisplatin i metotreksat, osobito u 3D sferoidnim kulturama. Uočena stanična plastičnost i povećana migracijska aktivnost mogle bi odražavati prilagodbu tumorskih stanica selekcijskom pritisku tijekom liječenja, potencijalno pogodujući opstanku i obogaćivanju populacija s invazivnijim obilježjima koja mogu pridonijeti ponovnoj uspostavi tumora i razvoju recidiva.

(141 stranica, 39 slika, 276 referenci, jezik izvornika: hrvatski)
Ključne riječi: osteosarkom; tumorske matične stanice; stanična plastičnost; kemorezistencija; migracija tumorskih stanica; procesi slični epitelno-mezenhimskoj tranziciji; telomere
Mentorica: prof. dr. sc. Inga Urlić
Ocjenitelji: prof. dr. sc. Petra Korać
izv. prof. dr. sc. Rosa Karlić
doc. dr. sc. Petar Ozretić

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral Dissertation

CHARACTERIZATION OF TUMOR STEM CELLS DURING OSTEOSARCOMA PROGRESSION

KARLA OSTOJIĆ

Division of Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb

Osteosarcoma is the most common primary malignant bone tumor and remains a significant therapeutic challenge despite advances in diagnosis and treatment, particularly because of frequent recurrence and the development of chemoresistance. This study compared the cellular and molecular characteristics of tumor stem cells (TSCs) in osteosarcoma samples collected at diagnosis and recurrence. A distinct cell population exhibiting stem-like properties was identified in the recurrence sample, characterized by altered morphology, increased migratory activity, and pronounced cellular plasticity, suggesting a potentially more invasive phenotype. Differences were also observed in the biophysical properties of spheroids and in the expression of genes associated with cytoskeletal organization and interactions with the extracellular matrix, along with features compatible with potential alternative telomere maintenance mechanisms. Functional assays demonstrated cellular sensitivity to doxorubicin and reduced sensitivity to cisplatin and methotrexate, particularly in 3D spheroid cultures. The observed cellular plasticity and increased migratory activity may reflect tumor cell adaptation to treatment-induced selective pressure, potentially favoring the survival and enrichment of cell populations with more invasive characteristics that may contribute to tumor regrowth and recurrence.

(141 pages, 39 figures, 276 references; language of the original: Croatian)
Keywords: osteosarcoma; tumor stem cells; cellular plasticity; chemoresistance; tumor cell migration; epithelial–mesenchymal transition-like processes; telomeres
Supervisor: Professor Inga Urlić, PhD
Reviewers: Petra Korać, Full Professor, PhD
Rosa Karlić, Associate Professor, PhD
Petar Ozretić, Assistant Professor, PhD

1. UVOD

Osteosarkom predstavlja najčešći primarni maligni tumor kostiju, koji prvenstveno pogađa djecu i mlade, s vrhuncem incidencije oko 18. godine života. Njegova pojava u ovoj dobi povezana je s pubertetom, fazom intenzivne proliferacije i rasta kostiju, zbog čega se tumor najčešće razvija u metafizama dugih kostiju udova, poput potkoljenice, podlaktice i bedrene kosti. Za razliku od primarnog osteosarkoma, koji nastaje u prethodno zdravom koštanom tkivu, sekundarni osteosarkomi javljaju se pretežito kod osoba starijih od 60 godina, u kostima koje su već bile patološki promijenjene. Takve promjene mogu biti posljedica terapijskog ozračivanja, Pagetove bolesti kostiju, teškog koštanog infarkta ili benignih tumora kostiju, poput osteohondroma ili osteoblastoma [1].

Trenutni standard liječenja osteosarkoma uključuje kombinaciju kirurške resekcije tumora i sustavne kemoterapije. Ovakvo kombinirano liječenje rezultiralo je poboljšanjem petogodišnje stope preživljavanja kod lokaliziranog osteosarkoma, međutim prognoza bolesnika s metastatskim ili rekurentnim oblikom bolesti i dalje je ostala nepovoljna, pri čemu stopa preživljavanja ostaje ispod 20 % [2]. Izuzetno visoka smrtnost ovakvog tipa osteosarkoma povezana je s ranom pojavom metastaza koje se često javljaju već pri postavljanju dijagnoze te s čestim razvojem kemorezistencije. Takvo agresivno biološko ponašanje tumora može se, između ostalog, objasniti izraženom staničnom, genskom i epigenetskom heterogenošću, koja otežava identifikaciju univerzalnih molekularnih meta i razvoj standardiziranih protokola za ciljanu terapiju. Takva heterogenost je rezultat klonalne evolucije, procesa razvoja tumora. Inicijacija i progresija tumora vođene su akumulacijom genetskih mutacija i epigenetičkih promjena koje uključuju dva važna događaja: inaktivaciju gena za tumorske supresore te aktivaciju ili prekomjernu ekspresiju onkogena. Tijekom evolucije tumora, od početnog do metastatskog stadija, mutirane stanice prolaze kroz proces klonalne evolucije i stvaraju heterogene subklonove. Posljedično, dolazi do selektivnog preživljavanja klonova s funkcionalnim prednostima kao što su: samodostatnost u signalima rasta, neosjetljivost na inhibicijske signale rasta, izbjegavanje programirane stanične smrti, sposobnost indukcije angiogeneze te aktivacija invazije i metastaziranja. Ova obilježja predstavljaju promjene koje omogućuju tumorskim stanicama kontinuirani rast, preživljavanje i širenje u organizmu [3,4].

Uz navedeno jedno od ključnih obilježja mutiranih stanica je neograničen replikacijski potencijal koji je povezan s očuvanjem telomera, ponavljajućim nekodirajućim slijedom nukleotida na krajevima kromosoma koje štite genetski materijal od oštećenja. Tijekom diobe, telomere se postupno skraćuju, što naposljetku dovodi do senescencije ili apoptoze. Takav

obrazac ima protutumorsko djelovanje jer tijekom velikog broja dioba dolazi do akumulacije različitih mutacija. Međutim, neke stanice koje su stekle određene mutacije mogu izbjeći ovaj proces aktivacijom mehanizama produljenja telomera koji će im omogućiti besmrtnost. Najčešći mehanizam produljenja telomera je reaktivacija telomeraze, enzima prisutnog u većini tumora epitelnog podrijetla, dok manji broj tumora koristi alternativni mehanizam produljenja (engl. *Alternative Lengthening of Telomeres*, ALT), temeljen na rekombinaciji telomernih sekvenci. ALT je dominantno prisutan u tumorima mezenhimskog podrijetla kao što je osteosarkom [5].

Migracija tumorskih stanica drugo je ključno obilježje malignosti i važan korak u metastatskoj kaskadi, osobito kod osteosarkoma, gdje se metastaze najčešće razvijaju u plućima. Sposobnost stanica da aktivno mijenjaju oblik, preuređuju citoskelet i reagiraju na mehaničke i biokemijske signale iz mikrookoliša tumora izravno je povezana s invazivnim potencijalom tumora i kliničkim ishodom bolesti. U tom kontekstu, posebna se pozornost posvećuje programima stanične plastičnosti koji omogućuju dinamične i reverzibilne promjene u migracijskom ponašanju stanica. Jedan od glavnih procesa koji omogućuje tumorima epitelnog porijekla stjecanje pokretljivosti i invazivnosti je epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT), tijekom koje epitelne stanice gube međustanične kontakte i polaritet te stječu mezenhimske karakteristike. Međutim, u tumorskom tkivu mezenhimskog podrijetla, EMT se ne manifestira klasično, već kao program sličan EMT-u koji dodatno pojačava već postojeće mezenhimalne osobine [6]. Ovi programi obuhvaćaju promjene u ekspresiji molekula koje posreduju staničnu adheziju, preuređenje citoskeleta, modulaciju signalnih puteva te aktivaciju proteolitičkih enzima kao što su metaloproteinaze matriksa. To su cink-ovisne endopeptidaze koje sudjeluju u remodeliranju izvanstaničnog matriksa, razgradnji staničnih adhezijskih molekula i modulaciji interakcija između stanica i izvanstaničnog matriksa [7].

Stanja slična EMT-u često su povezana s obogaćenom populacijom tumorskih matičnih stanica (TMS), male subpopulacije stanica unutar tumorske mase koja se smatraju odgovornima za inicijaciju tumora, progresiju bolesti i terapijsku rezistenciju [8]. Karakterizira ih sposobnost samoobnavljanja, diferencijacije u različite tumorske stanice te izražena tumorigenost. Visoka stanična plastičnost, učinkoviti mehanizami popravka DNA, izbjegavanja apoptoze, sporiji stanični ciklusi i interakcije s mikrookolišem doprinose terapijskoj rezistenciji ove subpopulacije stanica [9].

Polazeći od navedenih spoznaja, hipoteza ovog istraživanja jest da tijekom progresije osteosarkoma i primjene kemoterapije dolazi do promjena u sastavu i molekularnim obilježjima tumorskih staničnih subpopulacija, što može pogodovati opstanku stanica s izraženim

obilježjima stanične plastičnosti, povećane migracijske sposobnosti, potencijalno telomerazno-neovisnog održavanja telomera i smanjene osjetljivosti na kemoterapeutike. Radi provjere ove hipoteze provedena je usporedna karakterizacija tumorskih matičnih stanica izoliranih iz uzoraka različitih stadija osteosarkoma istog pacijenta, uključujući morfološku i biofizičku analizu stanica i sferoida, ispitivanje migracijske sposobnosti, analizu mehanizama održavanja telomera te procjenu osjetljivosti na doksorubicin, cisplatin i metotreksat. Analizom transkriptoma na razini pojedinačnih stanica istražene su promjene u sastavu staničnih subpopulacija i ekspresiji gena povezanih sa staničnom plastičnošću, migracijom, održavanjem telomera i odgovorom na kemoterapiju. Ovim istraživanjem nastoji se pridonijeti boljem razumijevanju staničnih i molekularnih promjena povezanih s progresijom osteosarkoma te prepoznati potencijalna obilježja TMS-a koja bi mogla biti povezana s njihovim opstankom tijekom liječenja i razvojem recidiva. Dobiveni rezultati mogu poslužiti kao osnova za daljnja istraživanja mehanizama tumorske evolucije i prepoznavanje mogućih terapijskih ciljeva usmjerenih na stanične populacije povezane s progresijom bolesti.

1.1. Hipoteza i cilj znanstvenog rada

Hipoteza ovog istraživanja glasi da primarni tumor tijekom kemoterapije prolazi evolucijske promjene koje rezultiraju selekcijom i preživljavanjem klonova s izraženim obilježjima besmrtnosti, povećane migracijske sposobnosti i kemorezistencije. Ovi klonovi, stečeni tijekom tumorske evolucije, doprinose progresiji bolesti i potencijalnom nastanku recidiva.

Glavni cilj ovog istraživanja je molekularno okarakterizirati razvoj i progresiju osteosarkoma s fokusom na subpopulaciju tumorskih matičnih stanica. Specifični ciljevi istraživanja koji će doprinijeti postizanju glavnog cilja su:

1. Iz uzorka tumorskog tkiva različitih stadija jednog pacijenta koji boluje od osteosarkoma (biopsija pri uspostavi dijagnoze, resekcija nakon kemoterapije, resekcija recidiva) uspostaviti primarnu parentalnu staničnu kulturu i izolirati populacije tumorskih matičnih stanica.

2. Morfološki okarakterizirati tumorske matične stanice iz različitih stadija istog osteosarkoma.

3. Morfološki okarakterizirati tumorske sferoide iz različitih stadija istog osteosarkoma.

4. Analizirati metastatski potencijal tijekom progresije osteosarkoma metodom generiranja sferoida, testom zarastanja rane te imunocitokemijskom analizom prisutnosti proteina epitelno-mezenhimske tranzicije.

5. Analizirati mehanizme besmrtnosti tijekom progresije osteosarkoma metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze za analizu duljine telomera i kvantitativnom lančanom reakcijom telomeraze nakon reverzne transkripcije za analizu ekspresije enzima telomeraze.

6. Analizirati kemorezistenciju tijekom progresije osteosarkoma procjenom vijabilnosti nakon tretmana doksorubicinom, cisplatinom i metotreksatom.

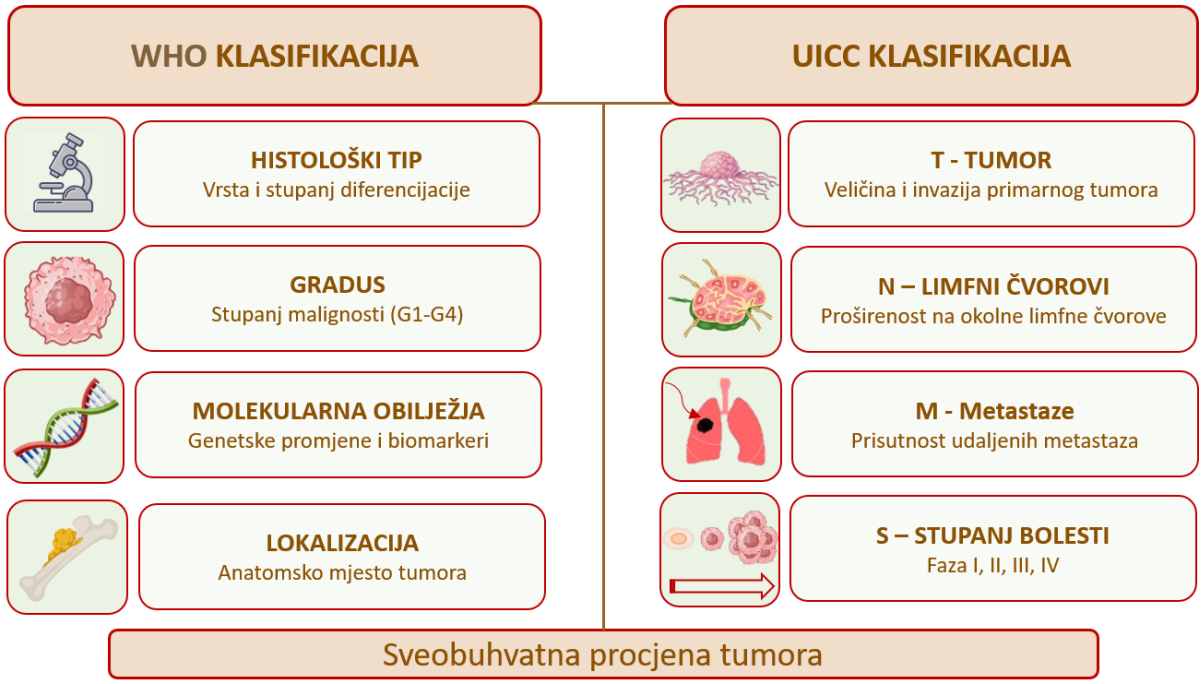
7. Analizom transkriptoma na razini jedne stanice utvrditi promjene u sastavu subpopulacija stanica tijekom progresije osteosarkoma i odrediti molekularne mehanizme besmrtnosti, invazivnosti i kemorezistencije.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Tumori i njihova klasifikacija

Stanica predstavlja osnovnu strukturnu i funkcionalnu jedinicu svih živih organizama. Svaka stanica prolazi kroz vlastiti životni ciklus koji uključuje rast, diobu, diferencijaciju, obavljanje specifičnih fizioloških funkcija te konačno staničnu smrt [10]. U normalnim uvjetima ti su procesi strogo regulirani kako bi se održala ravnoteža između proliferacije i odumiranja stanica te očuvala homeostaza tkiva. Poremećaji u bilo kojem od ovih mehanizama mogu dovesti do različitih patoloških stanja, među kojima je i maligna transformacija stanica koja predstavlja temelj razvoja malignih bolesti i nastanka tumora [11]. Tumori nastaju kao posljedica niza genetskih i epigenetskih promjena koje postupno mijenjaju normalne stanice i pretvaraju ih u stanice s malignim obilježjima. U molekularnoj osnovi tumorigeneze često se nalaze dvije ključne skupine promjena: aktivacija protoonkogena u onkogene, što rezultira dominantnim dobivanjem funkcije, te inaktivacija gena za tumorske supresore, koja dovodi do gubitka njihove zaštitne uloge u kontroli staničnog rasta. Takve promjene uzrokuju poremećaj regulacije staničnog ciklusa, proliferacije i diferencijacije, čime se stvaraju uvjeti za nekontrolirani rast stanica [12].

Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*, WHO) i Unija za međunarodnu kontrolu raka (engl. *Union for International Cancer Control*, UICC) klasificiraju tumore na više skupina prema različitim kriterijima (Slika 1).



Slika 1. Sveobuhvatna klasifikacija tumora prema WHO i UICC. WHO klasificira tumore prema biološkom ponašanju, histološkom tipu, gradusu te molekularnim biomarkerima dok UICC klasifiricira tumore prema stadiju odnosno prema raširenosti bolesti. Shematski prikaz izrađen u programu Microsoft PowerPoint.

S obzirom na tkivo koje zahvaćaju tumori se mogu podijeliti na pet glavnih skupina: tumore epitelnog tkiva (karcinomi), tumore mezenhimskog tkiva (sarkomi), tumore koji potječu iz krvotvornih stanica (hematološki), tumori živčanog tkiva i tumori germinativnih stanica. Uz ove glavne tipove, definirano je još mnogo podtipova [13].

Nakon grube klasifikacije na histološki tip, slijedi prognostička procjena tumora prema citološkim (stanična diferencijacija i displazija) i morfološkim značajkama (npr. broj mitoza i nekroza) [14]. Procjena stupnja diferencijacije (gradusa) tumorskih stanica temelji se na tome koliko one nalikuju normalnim, zdravim stanicama. Oznake se kreću od G1, koja označava dobro diferencirane stanice, preko G2 za umjereno diferencirane, G3 za slabo diferencirane, do G4, koja označava nediferencirane ili anaplastične stanice. Općenito, što je stupanj diferencijacije niži, to je tumor agresivniji i skloniji bržem rastu i diseminaciji. No, neke vrste tumora ocjenjuju se posebnim sustavom kao primjerice karcinom prostate [13].

Zatim slijedi klasifikacija prema stadiju oboljenja odnosno prema proširenosti bolesti. Uglavnom se koristi TNM-klasifikacija koja opisuje T- veličinu primarnog tumora, N- zahvaćenost limfnih čvorova, M- prisutnost metastazi. Ovaj sustav definira stadij uznapredovalosti bolesti I-IV. Trenutno se dijagnoza i liječenje tumora temelje na utvrđivanju njegove malignosti, mjesta podrijetla, histološkog tipa, stupnja diferencijacije te proširenosti bolesti u organizmu [15]. Međutim, s obzirom na sve složeniju integraciju molekularnih i

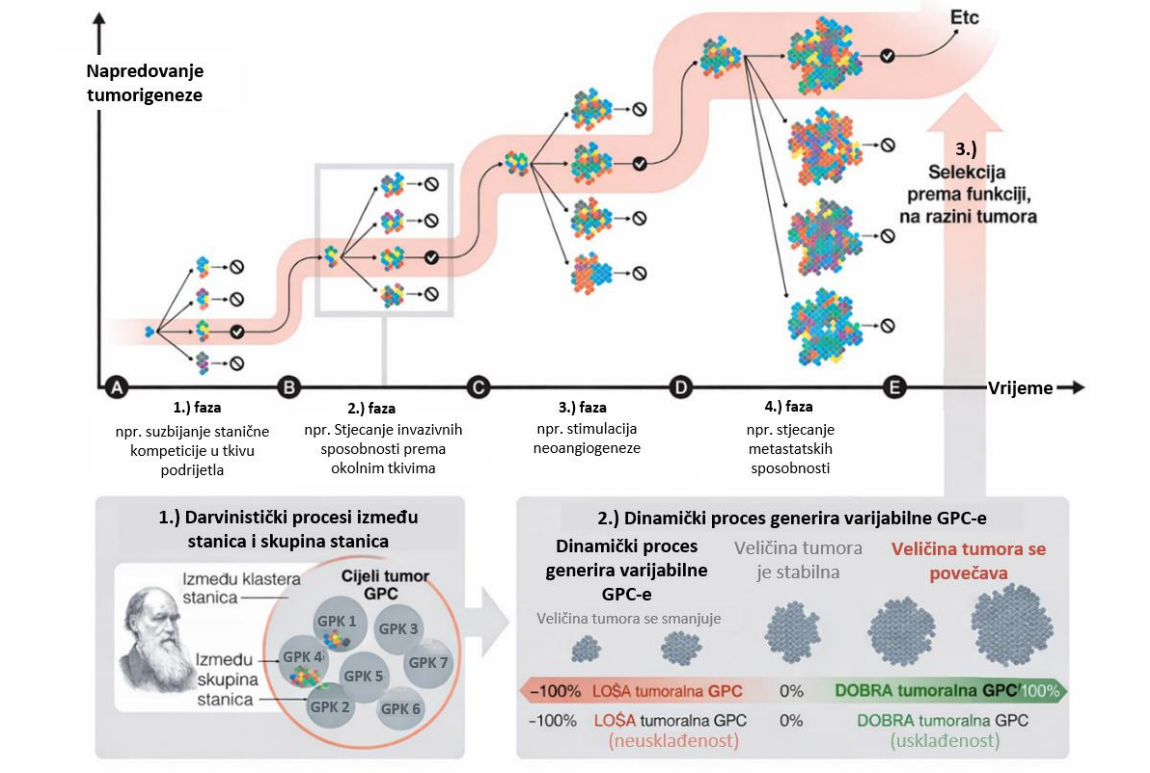
genetskih čimbenika u kliničku praksu, potrebno je jasno definirati i standardizirati pojmove povezane sa stadiranjem tumora kako bi se osigurala dosljedna klasifikacija bolesti te olakšala komunikacija i razumijevanje među stručnjacima [16].

2.2. Progresija maligne bolesti

Progresija tumora prema metastatskoj bolesti odvija se postupno i uključuje evolucijski mehanizam nalik Darwinovoj selekciji [17]. Uobičajeni proces karcinogeneze može se podijeliti na tri faze: inicijaciju, promociju i progresiju [18]. U fazi inicijacije dolazi do akumulacije genetskih i epigenetskih promjena u normalnoj stanici. Djelovanjem različitih enzima, potencijalni pro-mutageni mogu se pretvoriti u mutagene koji reagiraju s DNA i uzrokuju nepovratna oštećenja poput mutacija, tranzicija, transverzija ili malih delecija. Ove promjene često zahvaćaju gene uključene u regulaciju staničnog ciklusa, popravak DNA i apoptozu te narušavaju genomsku stabilnost stanice. U fazi promocije dolazi do promjena u ekspresiji genoma koje potiču rast i proliferaciju iniciranih stanica, što dovodi do njihove klonalne ekspanzije putem aktivacije proliferacijskih i antiapoptotskih signalnih puteva. Tijekom progresije tumorske stanice prolaze kroz dodatne genske promjene i izložene su različitim selekcijskim pritiscima, poput nedostatka nutrijenata, djelovanja imunološkog sustava ili terapije, pri čemu preživljavaju najadaptabilniji subklonovi. Ovu fazu karakteriziraju nestabilnost kariotipa, nekontrolirani rast stanica i te trajno uspostavljen maligni fenotip [19]. Iako ovaj model uspješno opisuje akumulaciju genskih promjena i selekciju najadaptabilnijih klonova, ne objašnjava u potpunosti kompleksnu organizaciju i funkcionalnu dinamiku tumora.

Međutim, novija istraživanja proširuju ovaj klasični model tumorske evolucije te naglašavaju da selekcija ne djeluje isključivo na razini pojedinačnih stanica i mutacija, već i na razini funkcionalne organizacije tumora kao cjeline (Slika 2). To znači da nije presudna samo prisutnost „najuspješnijih" mutacija u pojedinim stanicama, već način na koji različite tumorske stanice međusobno surađuju, natječu se i zajedno doprinose opstanku tumora. Prema konceptu selekcije za funkciju, tumor napreduje kada uspostavi stabilnu i funkcionalno učinkovitu kombinaciju različitih staničnih populacija i njihovih međusobnih interakcija, koje zajedno omogućuju prilagodbu mikrookolišu, osiguravanje opskrbe nutrijentima, modulaciju imunološkog odgovora i potporu invazivnom rastu. U tom kontekstu, selekcija favorizira čitave „funkcionalne sklopove" stanica, a ne nužno pojedinačne najbrže rastuće klonove. Takve kolektivne fenotipske konfiguracije mogu se održavati čak i u uvjetima stalne genetske

nestabilnosti, što objašnjava sposobnost tumora da brzo reorganizira svoju strukturu i funkciju pod terapijskim ili okolišnim pritiscima. Ovakav pristup dodatno pojašnjava zašto tumori mogu biti izrazito heterogeni, ali istovremeno funkcionalno stabilni i prilagodljivi [20]. Iako klasični model i model selekcije za funkciju različito opisuju razvoj tumora, oba vode prema fazi progresije. U ovoj fazi tumor počinje aktivno oblikovati vlastiti mikrookoliš, koji dodatno podržava njegov rast [21]. Tijekom napredovanja bolesti tumori postaju sve heterogeniji, a stanice postupno stječu invazivna svojstva kroz promjene u staničnoj adheziji, reorganizaciji citoskeleta i razgradnji izvanstaničnog matriksa, često uz aktivaciju programa sličnih EMT-i. Ove promjene omogućuju lokalno širenje tumora i prodiranje u okolna tkiva. Invazivne stanice zatim ulaze u krvne ili limfne žile, gdje se suočavaju s mehaničkim stresom i imunološkim nadzorom. Mali, ali dovoljan broj stanica preživi zahvaljujući aktivaciji mehanizama otpornosti na apoptozu i imunološke evazije. Nakon cirkulacije, tumorske stanice napuštaju krvotok i koloniziraju udaljene organe, gdje se prilagođavaju novom mikrookolišu, potiču angiogenezu i ponovno uspostavljaju proliferativni kapacitet, što u konačnici dovodi do razvoja metastatskih lezija [22].

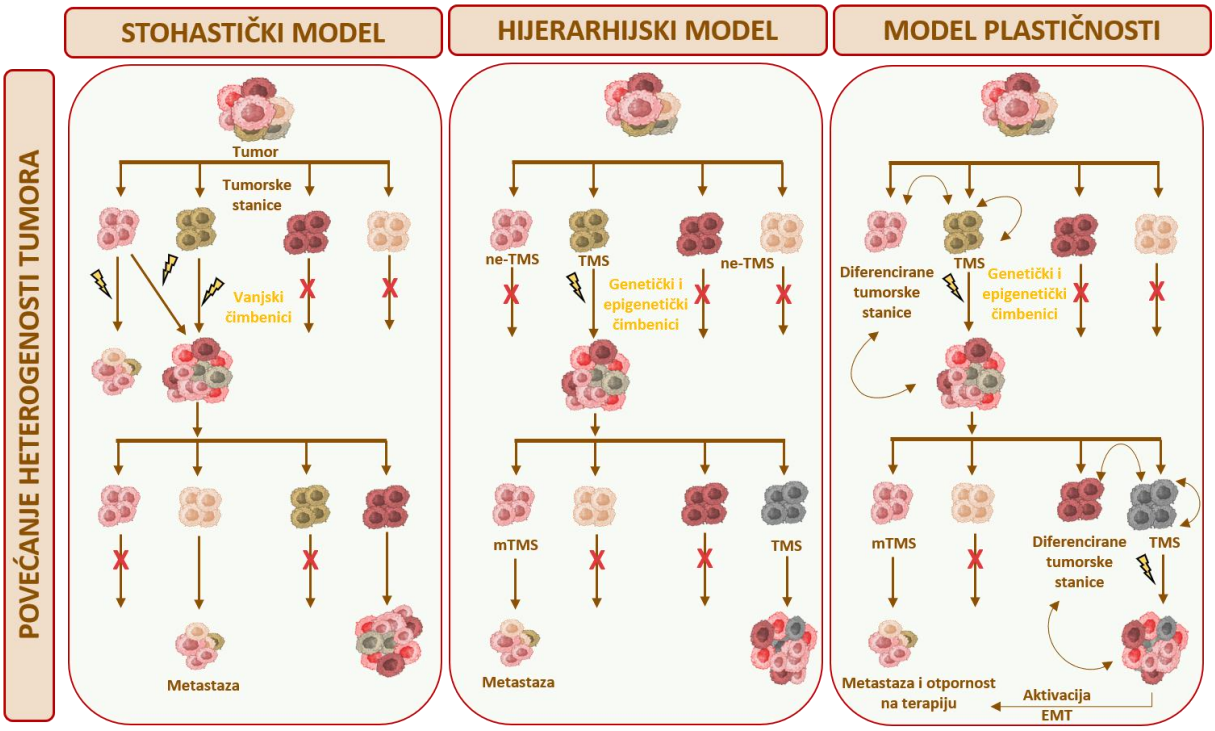


Slika 2. Dugoročni razvoj tumora uvjetovan je višeslojnim i međusobno povezanim selektivnim procesima. Primjer prikazuje jedan od mogućih načina stjecanja maligniteta. 1.) Početne faze tumorskog nastanka oblikuju Darwinovski procesi koji djeluju na razini pojedinačnih stanica i njihovih skupina. 2.) Ti procesi neprestano stvaraju raznolike genetsko-proteinske konfiguracije (GPK) unutar tumora, čime se povećava heterogenost stanica. 3) Nastanak različitih GPK pokreće novu fazu u kojoj selekcija funkcionalnosti postaje ključna. Dolazi do napretka

tumor kada njegove funkcionalne sposobnosti, određene GPK, odgovaraju zahtjevima mikrookoliša u kojem se nalazi. Slika preuzeta i prilagođena iz [21].

2.3. Tumorska heterogenost

Razvoj malignog tumora, temelji se na složenim biološkim procesima koji obuhvaćaju genetske mutacije, epigenetske promjene i interakcije tumorskih stanica s njihovim mikrookolišem. Povijesno su za objašnjenje nastanka tumora postavljena dva vodeća koncepta tumorigeneze: stohastični (klonalni) model i hijerarhijski model (model tumorskih matičnih stanica) (Slika 3). Prema stohastičkom modelu, skoro svaka stanica unutar tumora ima potencijal postati tumorigenična ako tijekom vremena akumulira dovoljan broj mutacija koje joj omogućuju proliferacijsku prednost, otpornost na staničnu smrt i sposobnost formiranja nove tumorske mase. Ovaj model pretpostavlja da je maligna transformacija posljedica nasumičnog niza genskih događaja koji omogućuju nastanak agresivnih subklonova [23].



Slika 3. Modeli tumorigeneze i podrijetla heterogenosti tumora. Stohastički ili klonalni model tumorigeneze. Svaka stanica izolirana iz heterogene tumorske mase tumorigenična je i ima sposobnost proliferirati dajući novi tumor. Model matičnih stanica ili hijerarhijski model tumorigeneze. Samo određena subpopulacija stanica unutar heterogene tumorske mase ima svojstva nužna za inicijaciju, promociju i širenje tumora. Tu populaciju čine tumorske matične stanice (TMS). Model plastičnosti koji objedinjuje prijašnja dva modela uvodeći fenotipsku plastičnost kao svojstvo diferenciranih i matičnih tumorskih stanica da se reprogramiraju jedne u druge. Shematski prikaz izrađen u programu Microsoft PowerPoint.

Suprotno tomu, model tumorskih matičnih stanica polazi od ideje da samo manja, funkcionalno specijalizirana subpopulacija stanica unutar tumora ima sposobnost samoobnavljanja i generiranja heterogenih potomaka, čime održava rast tumora [9]. Te stanice posjeduju obilježja slična odraslim matičnim stanicama kao što su dugovječnost i visoku sposobnost regeneracije što ih čini ranjivijima na nakupljanje oštećenja, ali i otpornijima na terapiju [24]. Osim toga, specifični mikrookoliš nazvan niša tumorskih matičnih stanica pomaže im u očuvanju matičnih svojstava, pruža zaštitu od imunološkog nadzora te potiče razvoj metastatskog potencijala [25].

Međutim, noviji koncept fenotipske plastičnosti dodatno povezuje ova dva nekoć suprotstavljena modela gdje diferencirane stanice mogu pod određenim okolnostima ponovno poprimiti matična svojstva, dok se matične stanice mogu diferencirati i time mijenjati hijerarhijsku organizaciju tumora. Time se stvara dinamičan sustav u kojem oba modela mogu istodobno djelovati [26,27].

Bez obzira na razlike između ovih modela, oba pristupa naglašavaju proces postupnog nakupljanja molekularnih promjena koje dovode do razvoja ključnih bioloških svojstava tumorskih stanica. U suvremenoj biologiji tumora ta su obilježja objedinjena u koncept poznat kao obilježja tumora (engl. *hallmarks of cancer*), koji opisuje funkcionalne sposobnosti koje stanice moraju steći kako bi postale maligne [12].

2.4. Obilježja tumorskih stanica

Koncept *Hallmarks of Cancer,* kojeg su 2000. godine predstavili Douglas Hanahan i Robert Weinberg, postavio je temelje modernog razumijevanja malignih tumora. U prvoj verziji, autori su identificirali šest temeljnih obilježja: samodostatnost u signalima rasta, neosjetljivost na inhibicijske signale rasta, izbjegavanje programirane stanične smrti, neograničen replikacijski potencijal, sposobnost indukcije angiogeneze te aktivacija invazije i metastaziranja. Ova obilježja predstavljaju funkcionalne promjene koje omogućuju tumorskim stanicama kontinuirani rast, preživljavanje i širenje u organizmu [12].

Jedno od temeljnih obilježja tumorskih stanica jest njihova samodostatnost u signalima rasta. Za razliku od normalnih stanica čija proliferacija ovisi o vanjskim signalima, poput faktora rasta koji se vežu na receptore na površini stanice, tumorske stanice mogu same generirati ili trajno aktivirati proliferacijske signale. To se može ostvariti autokrinom produkcijom faktora rasta, povećanom ekspresijom receptora za faktore rasta ili mutacijama

koje uzrokuju njihovu konstitutivnu aktivaciju. Mutacije u signalnim proteinima unutar stanice, primjerice u proteinima signalnog puta Ras, također mogu trajno aktivirati proliferativne signalne putove [12].

Drugo važno obilježje je neosjetljivost na inhibitorne signale rasta. U normalnim tkivima proliferacija stanica strogo je kontrolirana signalima koji zaustavljaju stanični ciklus kada je to potrebno. Ključnu ulogu u tom procesu imaju geni za tumorske supresore poput *RB1* i *TP53* koji reguliraju prolazak kroz kontrolne točke staničnog ciklusa, osobito prijelaz iz faze G1 u S. Kada su ovi geni mutirani ili inaktivirani, stanice gube sposobnost reagiranja na inhibitorne signale te nastavljaju proliferirati. Tumorske stanice često gube i sposobnost kontaktne inhibicije, što znači da ne prestaju rasti kada dođu u kontakt s drugim stanicama [12,18].

Treće obilježje malignih stanica jest izbjegavanje programirane stanične smrti, apoptoze. Apoptoza je važan obrambeni mehanizam organizma kojim se uklanjaju oštećene ili genetski nestabilne stanice. Tumorske stanice razvijaju različite mehanizme kojima izbjegavaju ovaj proces. Jedan od najčešćih je mutacija gena *TP53,* koji ima ključnu ulogu u detekciji oštećenja DNA i pokretanju apoptoze. Osim toga, tumorske stanice često povećavaju ekspresiju antiapoptotskih proteina poput Bcl-2 ili smanjuju aktivnost proapoptotskih regulatora [12].

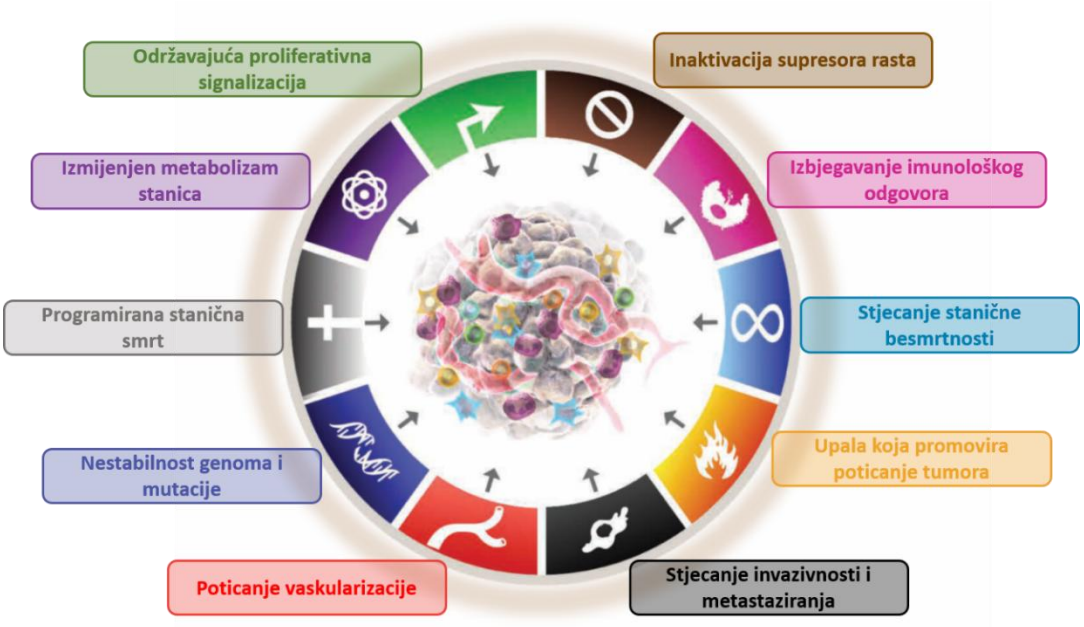
Još jedno obilježje tumorskih stanica jest neograničen replikacijski potencijal. Normalne somatske stanice mogu se podijeliti samo ograničen broj puta, što je poznato kao Hayflickovo ograničenje [28]. Razlog tomu je postupno skraćivanje telomera, ponavljajućih sekvenci DNA na krajevima kromosoma, tijekom svake stanične diobe. Kada telomere postanu kritično kratke, stanica ulazi u stanje senescencije ili odlazi u apoptozu. Tumorske stanice zaobilaze to ograničenje aktivacijom enzima telomeraze ili alternativnim mehanizmima produljenja telomera (engl. *alternative lengthening of telomeres,* ALT), čime omogućuju neograničenu proliferaciju [12].

Za daljnji rast tumora nužna je i indukcija angiogeneze, odnosno stvaranje novih krvnih žila. Difuzija kisika i hranjivih tvari može opskrbiti tkivo samo do određene veličine, zbog čega rast tumora ovisi o razvoju vlastite vaskularne mreže. Tumorske stanice stoga potiču angiogenezu ispuštanjem različitih proangiogenih faktora, među kojima je najvažniji vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF). Hipoksični uvjeti unutar tumora aktiviraju signalne putove koji dodatno potiču sintezu ovih molekula [29].

Jedno od najopasnijih obilježja malignih tumora jest sposobnost invazije i metastaziranja. Metastaziranje uključuje niz složenih koraka tijekom kojih tumorske stanice

napuštaju primarni tumor, prodiru u okolno tkivo, ulaze u krvne ili limfne žile te se šire u udaljene organe gdje stvaraju sekundarne tumore [30].

Kasnija istraživanja dodatno su proširila koncept obilježja tumora objavljena kao *Hallmarks of Cancer Next Generation 2011* [31]. Osim što nadopunjuju već spomenuta obilježja, uvode dvije nove karakeristike: reprogramiranje staničnog metabolizma te izbjegavanje imunološkog nadzora. Tumorske stanice često mijenjaju način proizvodnje energije i preferiraju glikolizu čak i u prisutnosti kisika, fenomen poznat kao Warburgov efekt. Takvo metaboličko reprogramiranje omogućuje brzo stvaranje energije i biosintetskih intermedijera potrebnih za intenzivnu proliferaciju [32]. Istodobno, tumorske stanice razvijaju različite mehanizme kojima izbjegavaju djelovanje imunološkog sustava. Oni uključuju smanjenu prezentaciju tumorskih antigena, ispuštanjem imunosupresivnih molekula te aktivaciju imunoloških kontrolnih točaka. Osim navedenih obilježja, dva procesa dodatno omogućuju razvoj tumorske bolesti: genomska nestabilnost i upala koja potiče rast i razvoj tumora. Genomska nestabilnost povećava stopu mutacija i omogućuje brzu evoluciju tumorskih stanica, dok kronična upala u tumorskom mikrookolišu potiče proliferaciju, angiogenezu i daljnju akumulaciju genetskih promjena (Slika 4) [31].

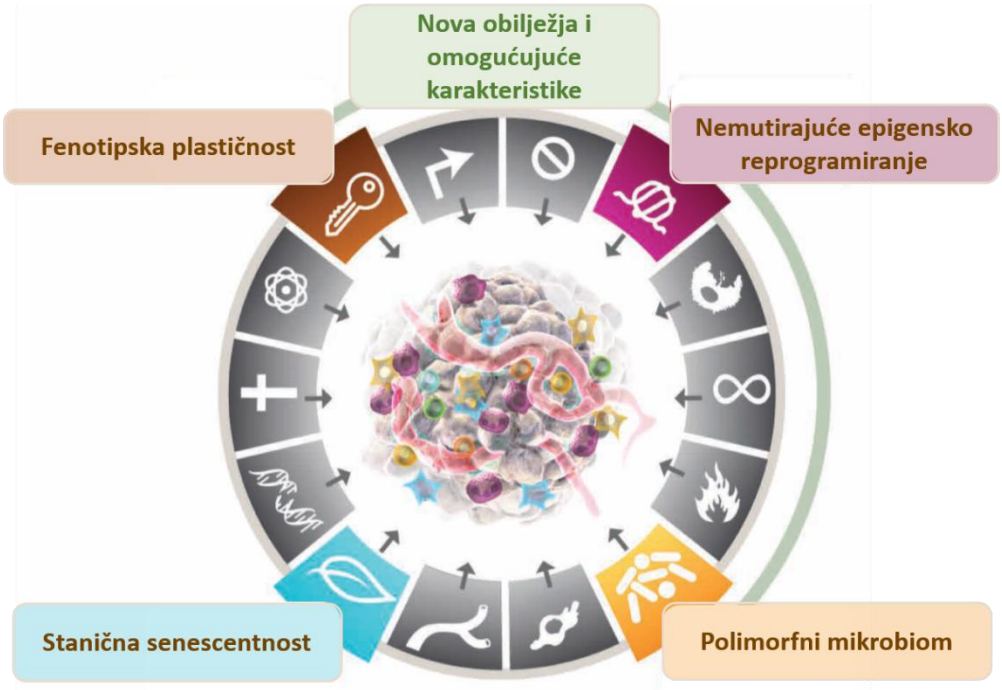


Slika 4. Proširena prikaz *Hallmarks of Cancer: New Generation* (2011.), koji nadograđuje prvotnu verziju iz 2000. godine. Prikazuje temeljna obilježja tumorskih stanica zajedno s dodatnim sposobnostima i „omogućujućim karakteristikama" koje podupiru rast, širenje i evoluciju tumora. Slika preuzeta i prilagođena iz [31].

Najnovija istraživanja, objavljena kao *Hallmarks of Cancer: New dimensions*, dodatno naglašavaju složenost tumorske biologije te ističu važnost fenotipske plastičnosti tumorskih

stanica, epigenetskog reprogramiranja, promjena u diferencijaciji stanica i interakcija tumora s mikrookolišem i imunološkim sustavom (Slika 5) [33]. Tumori nisu sastavljeni isključivo od malignih stanica, već uključuju složenu mrežu stromalnih stanica, fibroblasta, krvnih žila, imunoloških stanica i izvanstaničnog matriksa koji zajedno oblikuju tumorski mikrookoliš i značajno utječu na progresiju bolesti.

U kontekstu ovog rada posebna će se pažnja posvetiti dvama obilježjima koji imaju važnu ulogu u dugoročnom održavanju rasta tumorskih stanica te njihovom širenju u organizmu, a to su neograničen proliferativni potencijal i sposobnost migracije.



Slika 5. Najnovija saznanja o obilježjima tumorskih stanica prema *Hallmarks of Cancer: New Dimensions* iz 2022. godine. Slika ističe prošireni skup ključnih sposobnosti tumora i „omogućujućih karakteristika" koje podupiru rast, adaptaciju i preživljavanje tumorskih stanica u dinamičnom mikrookolišu. Slika preuzeta i prilagođena iz [33].

2.5. Neograničen proliferativni potencijal tumora

Tijekom životnog vijeka stanice prolaze kroz niz dioba, pri čemu se telomere postupno skraćuju. Telomere su specijalizirane nukleoproteinske strukture građene od nekodirajućeg slijeda nukleotidnog ponavljanja 5'-TTAGGG-3' u kralježnjaka, zajedno s brojnim pridruženim proteinima koji štite krajeve kromosoma od degradacije, rekombinacije i međusobnih fuzija[34,35]. Razlog procesivnog skraćivanja leži u nemogućnosti DNA polimeraze da u potpunosti replicira krajnje dijelove linearne DNA nakon uklanjanja RNA početnice na

zaostajućem lancu [36]. Ovaj problem završne replikacije rezultira gubitkom približno 50-200 baznih parova po ciklusu. Svaka stanična dioba dovodi do postupnog skraćivanja telomera, ali i akumulacije mutacija, oksidativnog stresa te oštećenja DNA, koja stanica u normalnim uvjetima prepoznaje i popravlja [37]. U somatskim stanicama, koje nemaju aktivne mehanizme produljenja telomera, njihovo progresivno skraćivanje s vremenom dovodi do kritične duljine telomera i aktivacije odgovora na oštećenje DNA. Pri tome nastaju disfunkcijom telomera-inducirana žarišta (engl. *telomere dysfunction-induced foci*, TIF), koja označavaju nakupljanje proteina uključenih u odgovor na oštećenje DNA na krajevima kromosoma. Kritično skraćene telomere gube svoju zaštitnu funkciju pa krajevi kromosoma mogu biti pogrešno prepoznati kao dvolančani lomovi DNA, što može dovesti do fuzija kromosoma, kromosomske nestabilnosti i daljnjeg nakupljanja genetskih oštećenja. Ako stanica ne uspije popraviti nastala oštećenja, aktiviraju se zaštitni mehanizmi koji sprječavaju umnažanje genomski nestabilnih stanica. Najčešće se aktivira replikacijska senescencija, stanje trajnog zaustavljanja stanične diobe uz očuvanje osnovnih metaboličkih funkcija. Ako su oštećenja prevelika ili je senescencija onemogućena, stanica ulazi u apoptozu [38,39].

Međutim, tumorske stanice imaju sposobnost prevladati ovu barijeru senescencije uslijed aktivacije različitih onkogena ili inaktivacije ključnih gena za tumorske supresore, poput *TP53* ili *RB*, nastavljajući prolaziti kroz stanične diobe unatoč kritično kratkim telomerama [40]. Takvo stanje dovodi do spajanja kromosoma, povećane učestalosti lomova i rekombinacija, što stanicu uvodi u disfunkcionalnu fazu tzv. krizu. Kriza je obilježena masivnom genskom nestabilnošću i aktivacijom staničnih mehanizama smrti, što u većine stanica rezultira apoptozom [41]. Međutim, vrlo mala populacija stanica (<1 %) uspijeva prevladati i ovu barijeru, zahvaljujući akumulaciji onkogena i drugih molekularnih promjena stečenih tijekom prethodnih dioba. Takve stanice ulaze u fazu besmrtnosti, pri čemu dolazi do produljenja telomera putem reaktivacije telomeraze ili alternativnog mehanizma produljenja telomera. Ovi mehanizmi besmrtnosti imaju različite izraze i prognoze u tumorima mezenhimskog i epitelnog podrijetla. U tumorima epitelnog podrijetla, poput karcinoma dojke, pluća ili debelog crijeva, glavni mehanizam produljenja telomera je aktivacija proteina telomeraze dok tumori mezenhimskog podrijetla besmrtnost ostvaruju alternativnim mehanizmima [42].

2.5.1. Produljenje telomera aktivacijom telomeraze

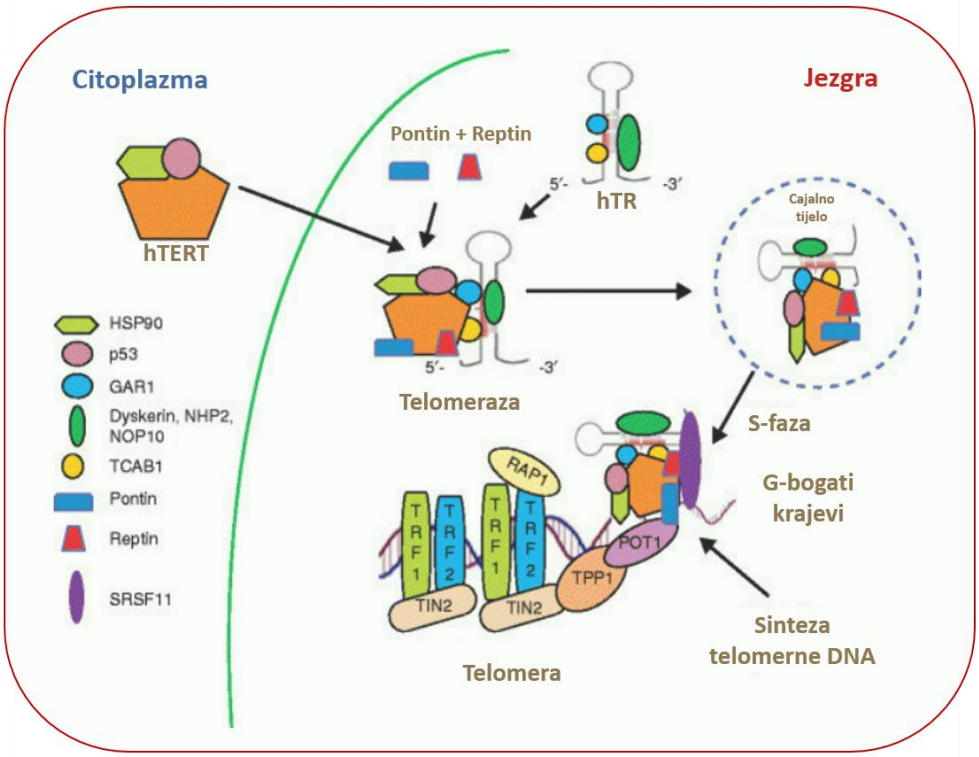
Telomeraza je ribonukleoprotein čija je glavna funkcija produljivanje telomera [43]. U zdravom ljudskom tkivu telomeraza je strogo regulirana i aktivna u vrlo ograničenom broju stanica. Prisutna aktivnost nalazi se u embrionalnim matičnim stanicama kako bi se omogućila brza proliferacija tijekom razvoja, zametnim stanicama (germinalnim linijama) kako bi se očuvao integritet kromosoma za nasljeđivanje i određenim tkivnim matičnim stanicama koje trebaju dugoročno održavati funkciju tkiva, primjerice u krvotvornom sustavu. U većini diferenciranih somatskih stanica, uključujući epitelne, mišićne i vezivne, aktivnost telomeraze je inhibirana, čime se ograničava broj staničnih dioba i sprječava nekontrolirana proliferacija [44]. U tumorima može doći do reaktivacije telomeraze, što predstavlja jedan od ključnih događaja u staničnoj transformaciji i razvoju maligniteta. Aktivnost telomeraze prisutna je u 85-90 % svih malignih oboljenja.

Telomeraza je enzim koji se sastoji od dvije ključne funkcionalne komponente: katalitičke podjedinice hTERT (engl. human *telomerase reverse transcriptase*, TERT) i RNA komponente TERC (engl. *telomerase RNA component*, TERC). hTERT pripada skupini reverznih transkriptaza te katalizira sintezu telomerne DNA, pri čemu koristi TERC kao unutarnji kalup za dodavanje telomernih ponavljajućih sekvenci na 3′ kraj kromosoma. Osim što služi kao predložak za sintezu telomerne DNA, TERC doprinosi pravilnom sklapanju i stabilnosti telomeraznog kompleksa te regulaciji njegove aktivnosti. TERT se sintetizira na ribosomima u citoplazmi dok se hTERC transkribira u jezgri [45]. Uz hTERT i hTERC, funkcionalni telomerazni kompleks sadrži i niz pomoćnih proteina koji sudjeluju u njegovu sazrijevanju, stabilizaciji, lokalizaciji i regrutaciji na telomere. Sklapanje i aktivacija telomeraze predstavljaju višestupanjski i koordinirani proces. To omogućuje dugotrajnu proliferaciju, stvaranje velikih klonova tumorskih stanica i akumulaciju dodatnih mutacija koje pogoduju malignom fenotipu.

U tumorskim stanicama aktivacija telomeraze najčešće nastaje povećanjem ekspresije njezine katalitičke podjedinice hTERT-a. To se može dogoditi zbog aktivirajućih mutacija promotora gena za hTERT, osobito supstitucija C>T koje stvaraju nova vezna mjesta za transkripcijske faktore ETS, poput GABP-a, čime se povećava transkripcija gena. Aktivacija hTERT-a može biti posljedica i poremećaja regulatornih signalnih putova, primjerice pojačane aktivnosti onkogena MYC ili puta PI3K/AKT/mTOR, kao i epigenetičkih promjena koje povećavaju dostupnost promotorske regije. Nakon sinteze, protein hTERT ulazi u jezgru gdje započinje složen proces sastavljanja funkcionalnog enzima telomeraze. Molekula diskerina

veže se na TERC i štiti je od razgradnje, dok proteini NOP10, NHP2 i GAR1 sudjeluju u pravilnom savijanju RNA te doprinose stabilizaciji cijelog ribonukleoproteinskog kompleksa. Nakon toga hTERT se povezuje s molekulom TERC, čime nastaje katalitički aktivan kompleks sposoban prepoznati i produživati 3' krajeve telomera [42,46].

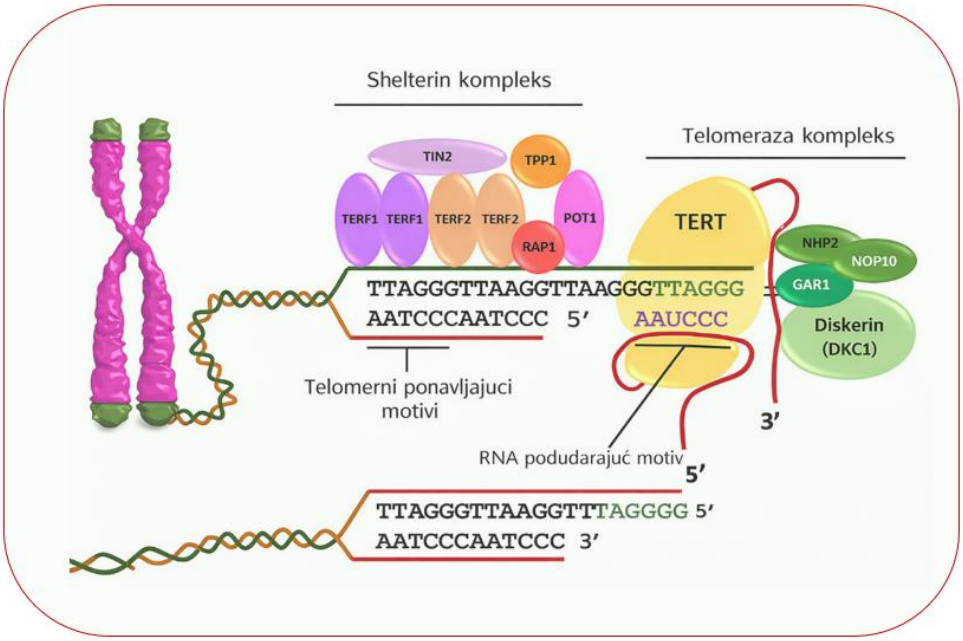
Formirani kompleks telomeraze često se nakuplja u specijaliziranim nuklearnim strukturama poznatim kao Cajalova tijela, koja imaju važnu ulogu u sazrijevanju, organizaciji i aktivaciji telomeraze. Aktivnost ovog enzima strogo je regulirana i najvećim se dijelom odvija tijekom faze S staničnog ciklusa, kada je telomerna DNA dostupna za produživanje (Slika 6) [42].



Slika 6. Koraci sklapanja i regrutacije telomeraze na telomere. Sastavljanje telomeraze uključuje spajanje hTERT, hTERC i pomoćnih proteina (diskerin, NOP10, NHP2, GAR1), te njihovo transportiranje u jezgru. TCAB1 usmjerava kompleks u Cajal tijela, a regrutacija na telomere događa se u S-fazi kroz interakciju hTERT-a s komponentama kompleksa shelterin (TPP1 i POT1). Na poslijetku, SRSF11 stabilizira vezu telomernog kompleksa s telomerom tijekom sinteze DNA. Slika preuzeta i prilagođena iz [42].

Telomeraza se nakon sklapanja regrutira na telomere, koje su zaštićene specijaliziranim proteinskim kompleksom nazvanim shelterin. Kompleks Shelterin sastoji se od šest glavnih proteina: TRF1, TRF2, POT1, TPP1, TIN2 i RAP1, a njegova glavna uloga je razlikovanje telomernih krajeva od oštećenja DNA te regulacija pristupa telomeraze telomerama. TRF1 i TRF2 izravno se vežu na dvolančanu telomernu DNA te sudjeluju u održavanju pravilne

organizacije telomera i formiranju zaštitne strukture koja sprječava aktivaciju odgovora na oštećenje DNA (Slika 7) [42,47]. POT1 se veže na krajnji jednolančani, G-bogati 3′ telomerni kraj, dok TPP1 djeluje kao poveznica između telomerne DNA i telomeraze te olakšava regrutaciju telomeraznog kompleksa na telomere. Osim toga, TPP1 ima važnu ulogu u regulaciji procesivnosti telomeraze, odnosno sposobnosti enzima da nakon vezanja za DNA nastavi dodavati velik broj telomernih ponavljanja bez odvajanja od supstrata. Veća procesivnost omogućuje učinkovitije produljenje telomera jer TERT može uzastopno sintetizirati više ponavljajućih DNA sekvenci tijekom jednog ciklusa vezanja [48]. TIN2 povezuje komponente shelterina koje vežu jednolančanu i dvolančanu DNA te stabilizira cijeli kompleks, dok RAP1 djeluje u suradnji s TRF2 i dodatno pridonosi zaštitnoj funkciji telomera. Iako ti proteini nisu dio katalitičkog mjesta telomeraze, njihova uloga je ključna jer kontroliraju strukturu telomera, reguliraju pristup telomeraze i održavaju ravnotežu između zaštite telomera i njihove elongacije [49].



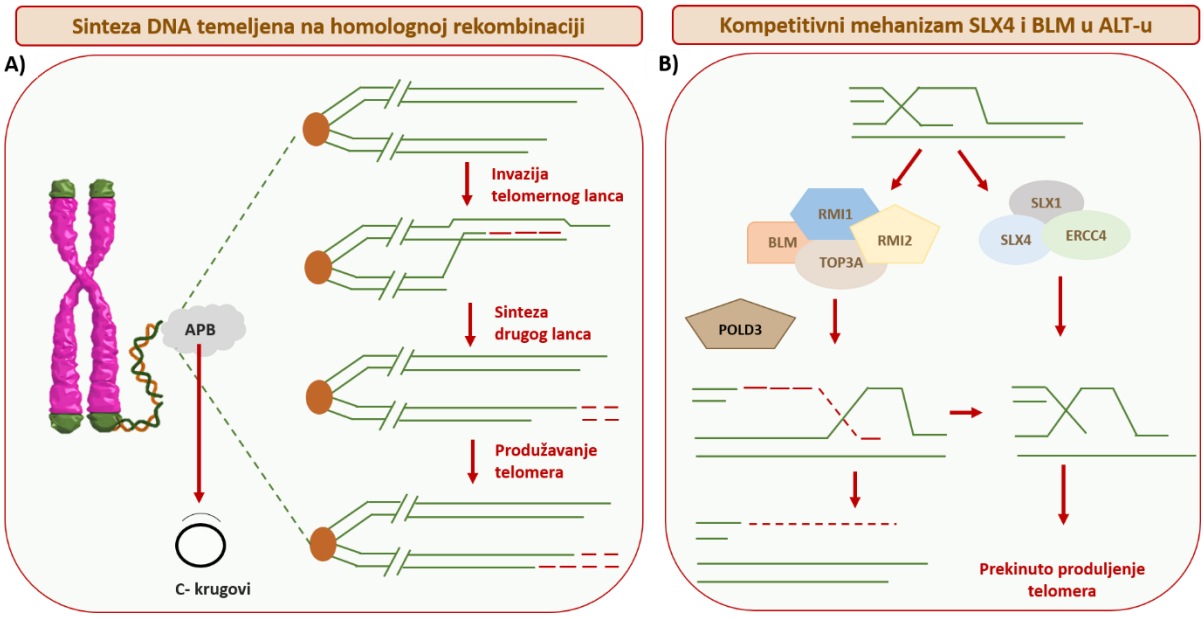
Slika 7. Shematski prikaz kromosomskih telomera i pripadajuće telomeraze, uključujući sve komponente kompleksa Shelterin. Proteini TRF1 i TRF2 vežu dvostruku DNA telomera i održavaju strukturalnu stabilnost, POT1 prepoznaje jednolančanu G-rich telomernu sekvencu, te TIN2, TPP1 i RAP1 povezuju proteine TRF s POT1 i reguliraju pristup telomerazi. Telomeraza, sastavljena od katalitičke podjedinice TERT i RNA komponente TERC, prikazana je kako sintetizira telomernu DNA na krajevima kromosoma. Kompleks Shelterin osigurava zaštitu telomera od DNA oštećenja i nepoželjnog spajanja kromosoma, dok TPP1 posreduje regrutaciju telomeraze na telomere, omogućujući održavanje telomernog integriteta. Slika preuzeta i prilagođena iz [42].

2.5.2. Alternativni mehanizam produljenja telomera

Alternativni mehanizam produljenja telomera predstavlja mehanizam održavanja duljine telomera neovisan o aktivnosti telomeraze. Za razliku od telomeraze, koja produljuje telomere dodavanjem telomernih ponavljanja pomoću enzima, ALT se temelji na homolognoj rekombinaciji, prirodnom mehanizmu popravka DNA kojim se telomerne sekvence koriste kao predložak za produljenje skraćenih telomera. ALT je prisutan u približno 10–15 % svih tumora, a osobito je učestao u tumorima mezenhimskog podrijetla, poput osteosarkoma, liposarkoma te određenih glioma [50]. Iako ovaj mehanizam omogućuje tumorskim stanicama neograničenu proliferaciju, istodobno je povezan s povećanom genomskom nestabilnošću, heterogenošću duljine telomera i učestalijom pojavom kromosomskih rekombinacija, što može pridonijeti progresiji tumora i njihovoj evoluciji [51].

ALT-pozitivne stanice sadrže specifične strukture koje karakteriziraju njegovu prisutnost. Pretpostavlja se da stres tijekom replikacije telomerne DNA može uzrokovati dvolančane lomove, nakon čega nastali telomerni fragmenti mogu stvarati kružne strukture. Među njima se ističe nakupljanje izvankromosomske telomerne DNA uključujući kružnu telomernu DNA bogatu citozinom (C-krugovi) ili telomernu DNA bogatu gvaninom (G-krugovi). One predstavljaju nusprodukt procesa rekombinacijskog mehanizma i nakupljaju se u jezgri unutar nuklearnih tjelešca promijelocitne leukemije povezanih s alternativnim produljenjem telomera, APB-ova (engl. *alternative lengthening of telomeres–associated promyelocytic leukemia nuclear bodies, ALT-associated PML bodies,* APB) [52]. Riječ je o nuklearnim, membranskim neovisnim strukturama koje se uglavnom sastoje od proteina PML i SP100 te služe kao mjesta nakupljanja telomerne DNA, proteina uključenih u održavanje telomera i čimbenika odgovora na oštećenje DNA. APB-ovi stvaraju mikrookoliš pogodan za odvijanje homologne rekombinacije i popravak telomera [53]. Osim navedenog, ALT-pozitivne stanice karakterizira i povećana učestalost insercija, izmjene sestrinskih kromatida i naposlijetku genomske nestavilnosti jer uključuje rekombinaciju između telomernih krajeva i različitih izvora homolognog predloška DNA, uključujući nesestrinske kromatide, druge telomere ili ekstrakromosomske telomerne strukture [54]. Dodatno obilježje ALT-pozitivnih stanica je prisutnost molekula TERRA (engl. *Telomeric Repeat-Containing RNA*), RNA transkripata nastalih iz telomernih regija. TERRA može stvarati hibride RNA/DNA (R-petlje) s telomernom DNA, čime potiče rekombinacijske događaje potrebne za produljenje telomera. Međutim, nastanak R-petlji može uzrokovati replikacijski stres, koji dodatno pridonosi aktivaciji mehanizma ALT i održavanju telomera putem homologne rekombinacije [55].

Proces ALT može biti potaknut replikacijskim stresom i nastankom dvolančanih lomova DNA u telomernim regijama ili pojavom nestabilnih telomernih 3′ G-bogatih krajeva, što dovodi do aktivacije mehanizama homologne rekombinacije. Tijekom tog procesa slobodni 3′ kraj telomerne DNA invadira homolognu telomernu sekvencu drugog kromosoma, koja služi kao predložak za sintezu novih telomernih ponavljanja. Ovaj proces, poznat kao sinteza DNA potaknuta lomom (engl. break-induced replication, BIR), omogućuje produljenje telomera neovisno o aktivnosti telomeraze. U njegovu odvijanju sudjeluju ALT-povezana PML-tijela (APB, engl. ALT-associated PML bodies), nuklearne strukture koje okupljaju telomernu DNA i proteine uključene u rekombinaciju te omogućuju odvijanje procesa sinteze telomerne DNA. Uz njih se povezuju i ekstrakromosomski C-kružnici (engl. C-circles), kružne molekule telomerne DNA bogate C-lancem, koje predstavljaju karakterističan biljeg ALT-pozitivnih stanica (Slika 8A). U regulaciji ALT-mehanizma važnu ulogu imaju proteini uključeni u obradu rekombinacijskih međuprodukata, među kojima se posebno ističu helikaza BLM i kompleks SLX4. BLM djeluje kao sastavni dio kompleksa BTR, koji uz BLM uključuje topoizomerazu IIIα (TOP3A) te proteine RMI1 i RMI2. Ovaj kompleks sudjeluje u remodeliranju i razdvajanju rekombinacijskih međuprodukata, čime omogućuje nastavak sinteze telomerne DNA. U tom procesu sudjeluje i DNA polimeraza δ, odnosno njezina podjedinica POLD3, koja doprinosi sintezi novih telomernih sekvenci. Nasuprot tome, SLX4 djeluje kao organizacijska platforma za regrutaciju nukleaza, uključujući SLX1 i ERCC4, koje sudjeluju u cijepanju i razrješavanju rekombinacijskih struktura. Takva obrada može dovesti do izmjene telomerne DNA između sestrinskih kromatida (T-SCE, engl. telomere sister-chromatid exchange), bez neto produljenja telomera. Stoga kompetitivna aktivnost BTR i SLX4 kompleksa utječe na ishod rekombinacijskih procesa, odnosno na ravnotežu između sinteze i produljenja telomerne DNA te njezine izmjene između sestrinskih kromatida (Slika 8B). Osim čimbenika uključenih u homolognu rekombinaciju, važnu ulogu u regulaciji ALT-fenotipa imaju kromatinski remodelatori ATRX i DAXX, koji sudjeluju u održavanju telomerne kromatinske organizacije i ugradnji histonske varijante H3.3. Gubitak funkcije ATRX-a i/ili DAXX-a često se pojavljuje u ALT-pozitivnim tumorima te je povezan s promjenama u organizaciji telomernog kromatina koje mogu pogodovati aktivaciji rekombinacijskih mehanizama. Zbog česte povezanosti s ALT-fenotipom, gubitak ekspresije proteina ATRX i DAXX smatra se važnim molekularnim obilježjem brojnih ALT-pozitivnih tumora [56].



Slika 8. Mehanizmi sinteze telomerne DNA temeljeni na homolognoj rekombinaciji tijekom alternativnog produljenja telomera (ALT). A) Sinteza telomerne DNA putem homologne rekombinacije, uz prikaz ALT-povezanih PML-tijela (engl. *ALT-associated PML bodies*, APB; PML – promijelocitna leukemija) i ekstrakromosomskih C-kružnika (engl. *C-circles*). B) Kompetitivna uloga BTR kompleksa (BLM–TOP3A–RMI1–RMI2; BLM – Bloomov sindrom helikaza, TOP3A – topoizomeraza IIIα, RMI1 i RMI2 – proteini koji održavaju stabilnost rekombinacijskih međuprodukata) i kompleksa SLX4 (SLX4 – strukturno specifični čimbenik 4, SLX1 – strukturno specifična endonukleaza 1, ERCC4 – ekscizijski popravak DNA 4) u obradi rekombinacijskih međuprodukata. Prikazana je i uloga DNA polimeraze δ, odnosno njezine podjedinice POLD3 (engl. *DNA polymerase delta 3*, POLD3), u sintezi telomerne DNA. Ravnoteža aktivnosti navedenih kompleksa utječe na ishod rekombinacijskih procesa, odnosno na produljenje telomera ili izmjenu telomerne DNA između sestrinskih kromatida bez neto produljenja telomera [57].

Genomska nestabilnost karakteristična za ALT-pozitivne tumore nije samo posljedica poremećaja održavanja telomera, već aktivno pridonosi evoluciji i prilagodbi tumorskih stanica. Povećana telomerna rekombinacijska aktivnost i nestabilnost kromosomskih krajeva mogu dovesti do kromosomskih preraspodjela, gubitka ili aktivacije određenih gena te stvaranja genetske heterogenosti unutar tumorske populacije Ove promjene mogu pogodovati selekciji agresivnijih subpopulacija stanica i pridonijeti invazivnom ponašanju te progresiji tumora. ALT-pozitivne stanice također mogu pokazivati povećanu otpornost na određene terapijske pristupe koji uzrokuju oštećenje DNA, djelomično zbog aktivacije mehanizama odgovora na oštećenje DNA. Putevi povezani s homolognom rekombinacijom, uključujući proteine poput RAD51 i kompleksa MRN (MRE11-RAD50-NBS1), sudjeluju u popravku DNA i mogu doprinijeti preživljenju stanica pod genotoksičnim stresom. Iako ALT omogućuje tumorskim stanicama izbjegavanje replikacijske senescencije održavanjem duljine telomera, ovaj proces

zahtijeva preciznu regulaciju rekombinacijskih mehanizama kako bi se održala ravnoteža između učinkovitog produljenja telomera i očuvanja genomske stabilnosti takve da tumroska stanica ne završi u apoptozi. U većini tumora mehanizmi održavanja telomera uglavnom su međusobno isključivi, pri čemu stanice najčešće koriste ili telomerazu ili put ALT. Ipak, u rijetkim slučajevima tumorske stanice mogu tijekom razvoja bolesti ili pod terapijskim pritiskom aktivirati ALT kao alternativni način održavanja telomera, što može predstavljati jedan od mogućih mehanizama razvoja otpornosti na terapije usmjerene protiv telomeraze [58].

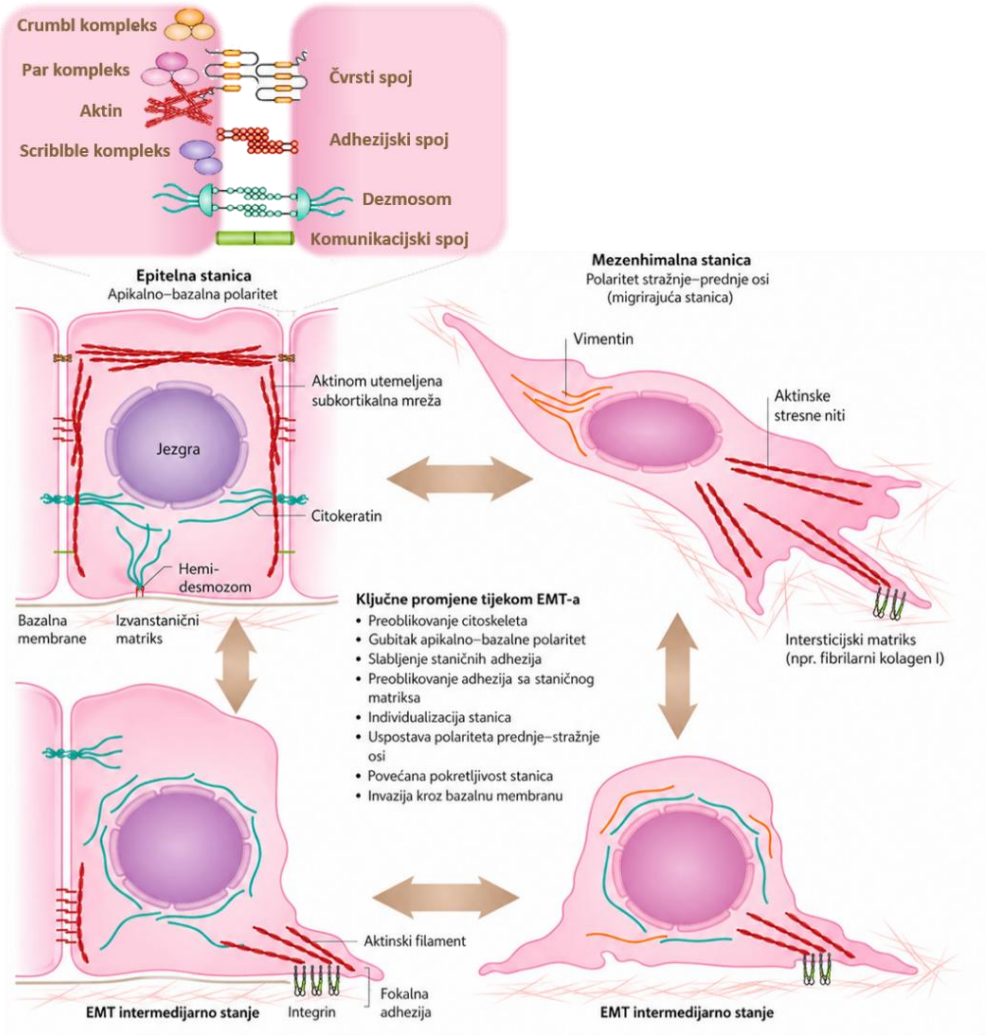
2.6. Sposobnost migracije tumorskih stanica

Migracija stanica predstavlja temeljni biološki proces kojim stanice mijenjaju svoj položaj unutar tkiva kao odgovor na različite fiziološke i patološke podražaje. Ovaj proces neophodan je za brojne biološke funkcije, uključujući embrionalni razvoj, oblikovanje tkiva, regeneraciju nakon ozljede te pravilno funkcioniranje imunološkog sustava. S druge strane, poremećena regulacija migracije stanica ima ključnu ulogu u razvoju patoloških procesa, osobito u progresiji tumora [59,60].

Sposobnost migracije stanica nije jednaka u svim staničnim populacijama, već ovisi o njihovoj strukturi, razini međustanične povezanosti, organizaciji citoskeleta te sposobnosti interakcije s izvanstaničnim matriksom. U tom kontekstu, epitelne i mezenhimske stanice predstavljaju dva različita fenotipska stanja koja se značajno razlikuju prema stupnju pokretljivosti i načinu na koji ostvaruju migraciju [61].

Epitelne stanice međusobno su povezane različitim vrstama međustaničnih spojeva, uključujući adhezijske spojeve, dezmosome, komunikacijske i čvrste spojeve koje osiguravaju ograničenu migracijsku sposobnost stanica. Adhezijski spojevi povezani su s kortikalnim snopovima aktina i važni su za mehaničku povezanost i signalizaciju između stanica, dok su dezmosomi povezani sa citokeratinskim intermedijarnim filamentima te osiguravaju dodatnu mehaničku čvrstoću tkiva. Čvrsti spojevi smješteni su na apikalno-lateralnim kontaktima između stanica i ključni su za održavanje epitelnog polariteta i barijerne funkcije epitela. Apikalno-bazalni polaritet omogućuje pravilnu organizaciju svih ovih spojeva unutar epitelnih stanica. Taj polaritet reguliraju specifični proteinski kompleksi, uključujući komplekse Par, Crumbs i Scribble, koji određuju razliku između apikalne i bazolateralne domene stanice te time osiguravaju pravilnu prostornu organizaciju i funkciju epitela. Epitelne stanice također su pričvršćene za bazalnu membranu putem hemidezmosoma, koji sadrže integrine. Oni

omogućuju vezanje stanice za izvanstanični matriks, dok su s unutarnje strane povezani s citokeratinskim filamentima, čime dodatno stabiliziraju staničnu strukturu (Slika 9) [60,62].



Slika 9. Različiti stanični fenotipovi u spektru epitelno-mezenhimskih stanja. Prikaz ključne strukturne i funkcionalne karakteristike stanica, uključujući stanične spojeve, polaritet, citoskelet i migracijski potencijal, te pokazuje kako stanice mogu zauzimati parcijalna ili hibridna stanja između potpuno epitelnog i potpuno mezenhimskog fenotipa. Slika preuzeta i prilagođena iz [63].

Nasuprot tome, mezenhimske stanice karakterizira veća plastičnost i sposobnost aktivnog kretanja kroz tkivne strukture. One pokazuju smanjenu razinu međustanične adhezije, gubitak izražene polarizacije te promjene u organizaciji citoskeleta, uz povećanu ekspresiju migratornih proteina. Takve značajke omogućuju stvaranje dinamičnih kontakata s izvanstaničnim matriksom, remodeliranje okolnog prostora i učinkovitiju migraciju [61].

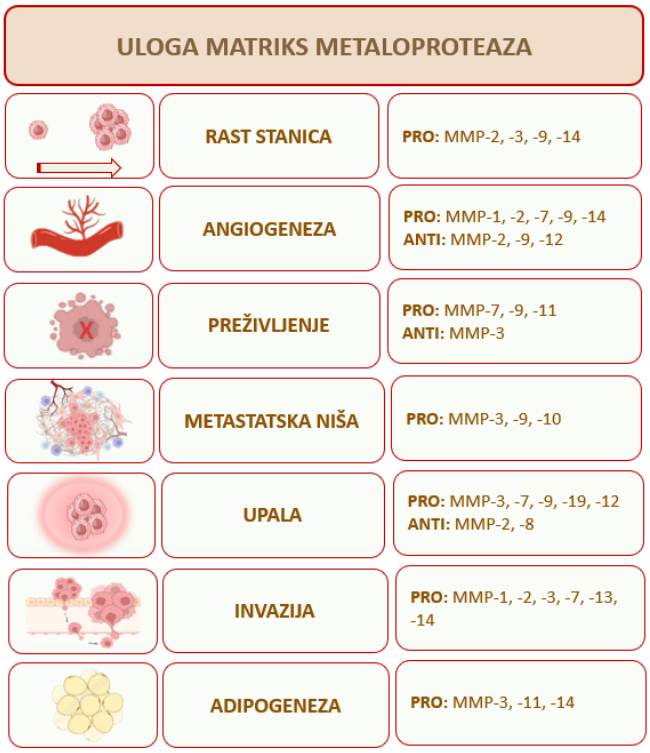
2.6.1. Epitelno–mezenhimska tranzicija

Jedan od glavnih procesa koji tumorskim stanicama omogućuje stjecanje pokretljivosti i invazivnosti jest EMT [59]. Ona predstavlja dinamičan i reverzibilan proces tijekom kojeg epitelne stanice mijenjaju svoj fenotip te postupno stječu karakteristike mezenhimskih stanica. Ovaj proces uključuje opsežne molekularne i strukturne promjene koje dovode do smanjenja epitelne organizacije, gubitka međustanične povezanosti i povećanja migracijskog potencijala stanica. Pod regulacijom je brojnih signalnih puteva, uključujući TGF-β, Wnt/β-katenin, Notch i receptorske tirozin kinaze, koji aktiviraju transkripcijske čimbenike kao što su SNAIL, SLUG, TWIST i obitelj proteina ZEB [60]. Ovaj proces nije binaran već stanice često zauzimaju tzv. parcijalna ili hibridna stanja u kojima istovremeno zadržavaju epitelne značajke dok stječu mezenhimske. Ta stanja nalaze se između potpuno epitelnog i potpuno mezenhimskog fenotipa te predstavljaju kontinuum promjena, a ne nagli prijelaz što povećava njihovu adaptabilnost. U karcinomima, tumorima epitelnog podrijetla, EMT uzrokuje stjecanje mezenhimskih karakteristika što rezultira odvajanjem stanica od primarnog tumora, odlazak u krvotok ili limfatički sustav, diseminaciju do udaljenih organa i ponovno poprimanje epitelnih karakteristika, obrnutim procesom koji nazivamo mezenhimsko-epitelna tranzicije, kako bi se tumorske stanice usidrile na novo mjesto. EMT povećava staničnu plastičnost odnosno sposobnost reverzibilnog mijenjanja fenotipskog identiteta u odgovoru na signale iz mikrookoliša bez potrebe za genetskim promjenama [64,65].

Za uspješnu invaziju okolnog tkiva nije dovoljna samo promjena staničnog fenotipa, već je potrebna i sposobnost aktivnog remodeliranja izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matix,* ECM). Upravo u tom procesu ključnu ulogu imaju metaloproteinaze matriksa (MMP), obitelj cink-ovisnih endopeptidaza koje reguliraju razgradnju i reorganizaciju komponenti ECM-a.

Do danas je identificirano 23 MMP-a kod ljudi, koji se dijele u nekoliko podgrupa prema strukturi i specifičnosti supstrata. Kolagenaze poput MMP-1, MMP-8 i MMP-13 razgrađuju fibrilarne kolagene tipa I, II i III, dok želatinaze MMP-2 i MMP-9 ciljaju denaturirani kolagen i želatinske proteine. Ostale skupine uključuju stromelizine (MMP-3, MMP-10), matrilizine (MMP-7, MMP-26) i membranski vezane MMP-ove (MT-MMP, npr. MMP-14), koji imaju specijalizirane funkcije u remodeliranju ECM-a. MMP-ova aktivnost u zdravim tkivima strogo je regulirana. Sintentiziraju se kao neaktivni proenzimi koji se aktiviraju samo kada je potrebno, a njihova aktivnost inhibira skupina proteina nazvana TIMP-ovi (engl. *tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMP) [66].

Osim izravnog remodeliranja matriksa, MMP-ovi oslobađaju različite signalne molekule i faktore rasta, poput TGF-β i EGF-a, koji dodatno potiču proliferaciju, preživljenje i migracijski kapacitet tumorskih stanica. Posebno važnu ulogu imaju MMP-ovi poput MMP-3, MMP-7 i MMP-14, koji mogu potaknuti programe slične EMT-u kroz promjene u staničnoj adheziji, reorganizaciju citoskeleta i aktivaciju signalnih puteva povezanih s invazivnim ponašanjem. U tumorskom mikrookolišu MMP-ovi dodatno doprinose metastatskom potencijalu kroz regulaciju angiogeneze i limfangiogeneze. Razgradnjom ECM-a oslobađaju se vaskularni faktori poput VEGF-a, čime se potiče stvaranje novih krvnih i limfnih žila koje omogućuju lakši ulazak tumorskih stanica u cirkulaciju. Istovremeno, MMP-ovi moduliraju interakciju tumorskih stanica s imunološkim sustavom mijenjajući dostupnost citokina i kemokina te stvarajući mikrookoliš pogodan za preživljenje i širenje tumora (Slika 10) [67,68].



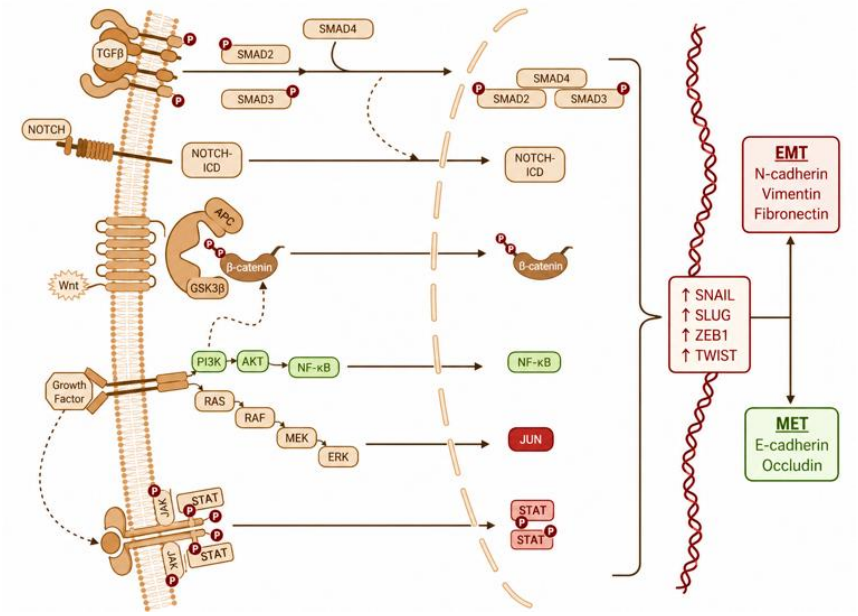
Slika 10. Različite funkcije matriksnih metaloproteinaza (MMP) u tumorskom mikrookruženju. Shematski prikaz izrađen u programu Microsoft PowerPoint.

2.6.2. Procesi slični epitelno–mezenhimskoj tranziciji

U tumorskom tkivu mezenhimskog podrijetla, EMT se ne manifestira klasično, već kao programi slični EMT-u koji dodatno pojačava već postojeće mezenhimske osobine stanica. Ovi programi obuhvaćaju promjene u ekspresiji molekula koje reguliraju staničnu adheziju,

preuređenje citoskeleta, aktivaciju proteolitičkih enzima te modulaciju signalnih puteva koji reguliraju migraciju stanica [65].

Procese slične EMT-i regulira niz signalnih puteva, uključujući TGF-β/Smad, Wnt/β-katenin, Notch, PI3K/Akt i STAT3, koji aktiviraju transkripcijske faktore Snail, Twist i ZEB. Snail smanjuje ekspresiju E-kadherina i povećava N-kadherin, vimentin i fibronektin, čime se pojačava migracija i invazivnost stanica. Twist i ZEB djeluju na sličan način, potičući mezenhimske markere i olakšavajući migraciju te metastatski potencijal. Koordinirana aktivnost ovih faktora jača mezenhimski fenotip i otpornost stanica na terapiju, što ih čini važnim ciljevima za potencijalne terapijske intervencije (Slika 11) [65,69].



Slika 11. Procesi slični EMT-i regulira niz signalnih puteva.Signalni putevi kao što su TGF-β/Smad, Wnt/β-katenin, Notch, PI3K/Akt i STAT3, aktiviraju transkripcijske faktore Snail, Twist i ZEB. Snail smanjuje ekspresiju E-kadherina i povećava N-kadherin, vimentin i fibronektin, čime se pojačava migracija i invazivnost stanica. Slika preuzeta i prilagođena iz [70].

Stanja slična EMT-i često su povezana s obogaćenom populacijom tumorskih matičnih stanica, koje se odlikuju sposobnošću samoumnožavanja, visokom staničnom plastičnošću, otpornosti na apoptozu te razvoju otpornosti na terapijske postupke. Ova svojstva dodatno pojačavaju agresivnost tumora i mogu imati značajan utjecaj na klinički ishod bolesti [71].

2.6.3. Vrste migracije

Tumorske stanice mogu migrirati na različite načine, prilagođavajući se mikrookolišu i mehaničkim svojstvima tkiva. Najčešći oblici migracije uključuju mezenhimsku, ameboidnu i kolektivnu migraciju, koji se razlikuju prema načinu interakcije stanice s izvanstaničnim matriksom, organizaciji citoskeleta i stupnju stanične adhezije.

Mezenhimsku migraciju karakteriziraju polarizacija stanice, stvaranje protruzija, formiranje fokalnih adhezija i aktivna interakcija s izvanstaničnim matriksom. Stanice koriste integrine za vezanje za ECM te reorganizaciju aktinskog citoskeleta za stvaranje sile potrebne za kretanje. Ovaj oblik migracije često uključuje razgradnju matriksa čime se omogućuje prolazak kroz tkivne strukture. Povezana je s programima EMT-a tijekom kojih stanice gube epitelna obilježja i stječu mezenhimske karakteristike poput povećane pokretljivosti i invazivnosti.

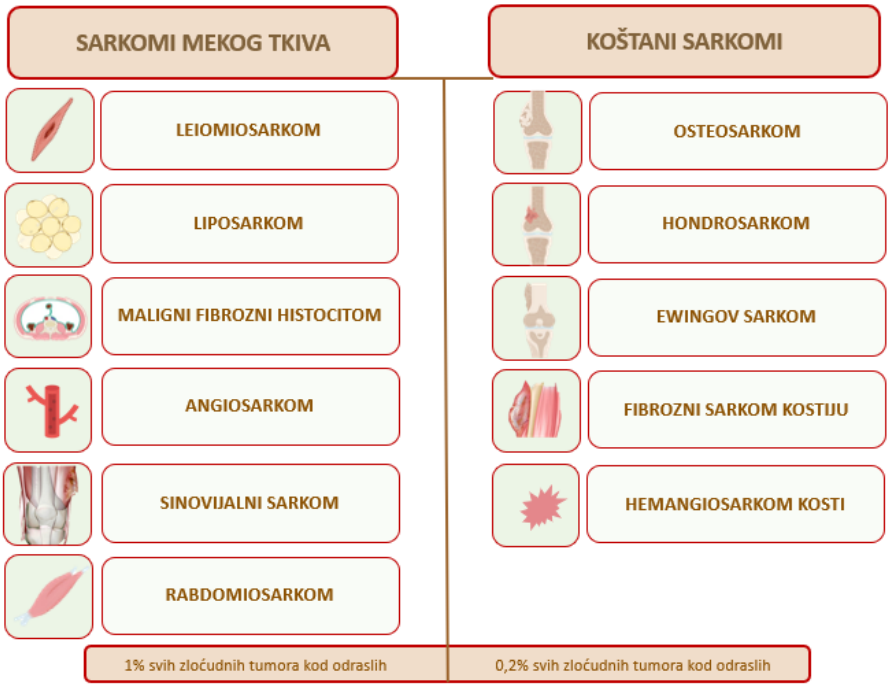
Ameboidna migracija predstavlja oblik kretanja pri kojem stanice mijenjaju svoj oblik i prolaze kroz postojeće prostore u tkivu bez potrebe za opsežnom razgradnjom matriksa. Ovisi prvenstveno o reorganizaciji kortikalnog aktina i kontraktilnosti stanice putem signalizacije RhoA/ROCK. Za razliku od mezenhimske migracije, stanice stvaraju manje stabilnih adhezija s ECM-om, što im omogućuje brzu prilagodbu i nastavak invazije čak i kada su proteolitički mehanizmi ograničeni [72].

Kolektivna migracija uključuje kretanje skupine stanica koje zadržavaju međusobne kontakte i dio epitelnog fenotipa. Stanice na prednjem rubu skupine usmjeravaju kretanje, dok ostale slijede njihov smjer. Ovaj oblik migracije često je povezan s parcijalnim EMT-om ili sličnim stanjima EMT-i, gdje stanice istovremeno zadržavaju određene epitelne karakteristike, ali stječu povećanu pokretljivost i sposobnost invazije [61].

Tumorske stanice imaju sposobnost prelaska između različitih oblika migracije ovisno o promjenama u mikrookolišu, sastavu ECM-a i aktiviranim signalnim putevima. Ova migracijska plastičnost omogućuje im prilagodbu različitim uvjetima, izbjegavanje ograničenja pojedinog migracijskog mehanizma te uspješnu invaziju i stvaranje metastaza. Stoga tumorska invazija nije rezultat jednog mehanizma, već kombinacije različitih migracijskih strategija koje stanice mogu dinamički mijenjati [61].

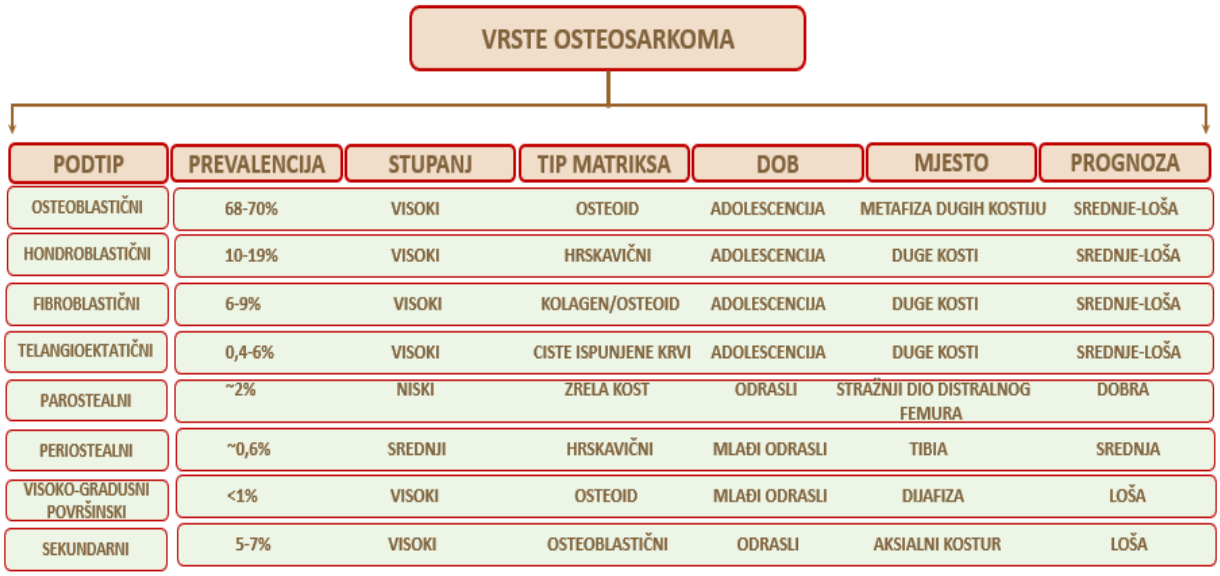
2.7. Osteosarkom

Sarkomi su rijetki maligni tumori mezenhimskog podrijetla koji nastaju iz mezoderma, embrionalnog zametnog listića iz kojeg se razvijaju vezivno, mišićno, masno, koštano i hrskavično tkivo te krvne i limfne žile. Čine svega oko 0,2 % svih malignih bolesti u odrasloj populaciji, a karakterizira ih izrazito agresivno biološko ponašanje i sklonost lokalnoj invaziji te metastatskom širenju. Unatoč napretku u dijagnostici i liječenju, prognoza bolesnika s uznapredovalom bolešću i dalje je nepovoljna. Petogodišnje preživljenje bolesnika s lokaliziranom bolešću iznosi približno 50 %, dok u metastatskom stadiju pada na manje od 10 %. Osim toga, približno trećina bolesnika razvije udaljene metastaze, a recidiv bolesti javlja se u oko 20 % slučajeva. Prema tkivu iz kojeg nastaju, sarkomi se dijele na sarkome mekih tkiva i koštane sarkome. Sarkomi mekih tkiva čine oko 75 % svih sarkoma te se mogu razviti gotovo na bilo kojem anatomskom sijelu, najčešće u odraslih osoba srednje i starije životne dobi. Nasuprot tome, koštani sarkomi nastaju isključivo u kostima te se pretežito dijagnosticiraju u djece, adolescenata i mlađih odraslih osoba. Jedna od glavnih značajki sarkoma jest njihova izrazita heterogenost. Do danas je identificirano više od 100 podtipova koji se razlikuju prema histološkim, molekularnim i kliničkim obilježjima te odgovoru na terapiju (Slika 12) [73].



Slika 12. Podjela sarkoma prema tkivu kojeg zahvaćaju. Dijele se na dvije glavne skupine: sarkome mekog tkiva i koštane sarkome. Shematski prikaz izrađen u programu Microsoft PowerPoint.

Među koštanim sarkomima posebno se ističe osteosarkom kojeg karakterizira izuzetno izražena klinička, histološka i molekularna heterogenost te agresivnost [74]. Iako je incidencija vrlo niska i iznosi 2-4 slučaja na milijun stanovnika, osteosarkomi spadaju u najčešće primarne maligne tumore kostiju [75]. Najčešće se javljaju kod djece i mladih, s vrhuncem incidencije oko 18. godine života [76]. Mogu se formirati u bilo kojoj kosti, međutim najčešće nastaju u zonama intenzivne proliferacije, osobito u metafizama dugih kostiju udova poput potkoljenice (3 %), nadlaktice (15 %) i bedrene kosti (9 %) odnosno u području oko koljena (50 %). Budući da se pojavljuje upravo u razdoblju najintenzivnijeg skeletnog rasta, pretpostavlja se da ubrzana proliferacija koštanih stanica povećava osjetljivost na genetske mutacije i onkogene čimbenike. Ovu povezanost dodatno potvrđuje činjenica da osteosarkom često ranije pogađa djevojčice, što je u skladu s njihovim ranijim pubertetskim ubrzanjem rasta [77]. Drugi, manji vrhunac incidencije javlja se u starijoj životnoj dobi (>60 godina), pri čemu osteosarkomi obično nastaju u aksijalnim regijama u već patološki promijenjenom koštanom tkivu uslijed kroničnih bolesti ili oštećenja. Takvi osteosarkomi najčešće su povezani s Pagetovom bolešću kosti, koštanim infarktima ili kumulativnom izloženošću ionizirajućem zračenju i klasificiraju se kao sekundarni tumori (Slika 13) [75].



PODTIP	PREVALENCIJA	STUPANJ	TIP MATRIKSA	DOB	MJESTO	PROGNOZA
OSTEOBLASTIČNI	68-70%	VISOKI	OSTEOID	ADOLESCENCIJA	METAFIZA DUGIH KOSTIJU	SREDNJE-LOŠA
HONDROBLASTIČNI	10-19%	VISOKI	HRSKAVIČNI	ADOLESCENCIJA	DUGE KOSTI	SREDNJE-LOŠA
FIBROBLASTIČNI	6-9%	VISOKI	KOLAGEN/OSTEOID	ADOLESCENCIJA	DUGE KOSTI	SREDNJE-LOŠA
TELANGIOEKTATIČNI	0,4-6%	VISOKI	CISTE ISPUNJENE KRVI	ADOLESCENCIJA	DUGE KOSTI	SREDNJE-LOŠA
PAROSTEALNI	~2%	NISKI	ZRELA KOST	ODRASLI	STRAŽNJI DIO DISTRALNOG FEMURA	DOBRA
PERIOSTEALNI	~0,6%	SREDNJI	HRSKAVIČNI	MLAĐI ODRASLI	TIBIA	SREDNJA
VISOKO-GRADUSNI POVRŠINSKI	<1%	VISOKI	OSTEOID	MLAĐI ODRASLI	DIJAFIZA	LOŠA
SEKUNDARNI	5-7%	VISOKI	OSTEOBLASTIČNI	ODRASLI	AKSIALNI KOSTUR	LOŠA

Slika 13. Podjela i karakteristike osteosarkoma obzirom na tip, prevalenciju, vrstu predominantog izvanstaničnog matriksa, pojavnost obzirom na dob i mjesto nastanka te obzirom na prognozu. Slika preuzeta i prilagođena iz [78].

Koštani tumori dijele se na benigne, intermedijarne i maligne oblike. Među benignim tumorima nalaze se osteom i osteoidni osteom, dok intermedijarni, lokalno agresivni oblik predstavlja osteoblastom. Maligni koštani tumori uključuju niskogradusni osteosarkom i

osteosarkom, koji obuhvaća konvencionalni osteosarkom, telangiektatični osteosarkom i osteosarkom malih stanica. U ovu skupinu ubrajaju se i parostalni osteosarkom, periostalni osteosarkom, visokogradusni površinski osteosarkom te sekundarni osteosarkom [79].

Najčešći oblik bolesti jest konvencionalni osteosarkom koji se još naziva i centralni ili medularni, jer nastaje u središnjem dijelu kosti odnosno zahvaća koštanu srž. Zbog svoje agresivnosti i brzog rasta spada u visoko gradusne tumore, a predominantno se javlja u djece i adolescenata te čini približno 85 % svih dijagnosticiranih slučajeva osteosarkoma [74].

Osteosarkome, karakterizira stvaranje osteoida, nezrelog koštanog tkiva. Osteoid predstavlja nemineralizirani dio koštanog matriksa sastavljen od kolagena i mukopolisaharida koji stvaraju maligne tumorske stanice. Upravo zbog varijabilnosti u zastupljenosti i tipu izvanstaničnog matriksa koji proizvode tumorske stanice, konvencionalni osteosarkom dodatno se dijeli prema dominantnom tipu izvanstaničnog matriksa. Razlikuju se osteoblastni tip, u kojem prevladava osteoid i koji čini 60 % svih slučajeva; hondroblastni tip, s prevladavajućom hrskavičnom komponentom, zastupljen u oko 10 % tumora; te fibroblastni tip, s matriksom nalik fibrosarkomu, također u oko četvrtine slučajeva. Iako svaki od ovih tipova pokazuje određene genske posebnosti te se mogu uočiti razlike u terapijskoj osjetljivosti i prognozi, važno je naglasiti da ova histološka podjela nema stvarnu prognostičku vrijednost i ne koristi se kao kriterij za predviđanje ishoda bolesti jer većina osteosarkoma sadrži kombinaciju svih triju tipova stanica i izvanstaničnog matriksa u različitim omjerima [77,80].

Maligni osteosarkomi se često klasificiraju i prema stupnju agresivnosti u tri glavne skupine gdje se stupanj agresivnosti smatra relativnim indikatorom rizika za razvoj metastaza. U skupinu najagresivnijih tumora spadaju konvencionalni, telangiektatični osteosarkom, kao i osteosarkomi malih stanica te površinski osteosarkom visokog gradusa. Ovi tumori spadaju u visoko gradusne, brzo rastuće tumore koji već pri postavljanju dijagnoze posjeduju potencijal stvaranja mikrometastaza. Karakteristična visoka smrtnost u velikoj mjeri posljedica je razvoja plućnih metastaza, dok se rjeđe javljaju metastaze u limfnim čvorovima ili drugim kostima. Osteosarkom se odlikuje vrlo ranim metastazama, zbog kojih mnogi pacijenti ne stignu biti podvrgnuti resekciji tumora, što ograničava dugoročni opstanak unatoč kirurškom, radioterapijskom i kemoterapijskom liječenju. U srednjem stupnju agresivnosti, tumori srednjeg gradusa nalazi se periostalni osteosarkom, koji proizvodi hondroidni matriks i širi se površinski. Agresivnost ovog tumora ovisi o dubini invazije, ali je rizik od metastaza znatno manji nego kod visokogradusnih podtipova. Najsporije rastu i najmanje su agresivni tumori niskoga gradusa, među kojima su parostealni i dobro diferencirani intramedularni osteosarkomi. Parostealni oblik ograničen je na površinu kosti i rijetko metastazira te zahtjeva

samo kirusško uklanjanje. Prognoza ovih tumora uvelike je povezana s njihovom lokacijom. Osteosarkomi smješteni u ekstremitetima imaju povoljniji ishod jer omogućuju potpuniju kiruršku resekciju, dok oni koji se razvijaju u osovinskom skeletu, osobito u zdjelici i kralježnici, općenito imaju lošiju prognozu zbog kasnijeg otkrivanja i tehnički zahtjevnijeg liječenja [78].

2.7.1. Hondroblastični osteosarkom

Hondroblastni osteosarkom spada u jedan od glavnih morfoloških podtipova konvencionalnog osteosarkoma, odmah nakon osteoblastnog. Najčešće se javlja kod djece i adolescenata, a karakterizira ga stvaranje obilnog hrskavičnog matriksa, uz prisutnost fokalnih područja koštanog ili osteoidnog tkiva, što potvrđuje osteogeni karakter tumora. Histološki se ovaj podtip klasificira kao visoko-gradusni, što odražava njegovu biološku agresivnost i visoki metastatski potencijal [81]. Vrlo česta pojava je da već pri samoj uspostavi dijagnoze djeca imaju udaljene metastaze (15–20 %), najčešće u plućima, a tijekom bolesti više od polovice bolesnika razvija metastatsku bolest. Brzo širenje i sklonost metastazama čine ovaj podtip posebno izazovnim u pedijatrijskoj populaciji, u kojoj se petogodišnje preživljenje kod lokalizirane bolesti kreće oko 65–70 %, dok se kod metastatske bolesti znatno smanjuje, na 20–30 % [82,83].

Uz prisutnost metastaza pri dijagnozi, nepovoljni prognostički čimbenici uključuju i veliku tumorsku masu te nemogućnost radikalnog kirurškog zahvata. Ovi se faktori koriste za individualizaciju terapije i predviđanje ishoda [83].

2.7.2. Povijesni pregled i standardni terapijski pristupi liječenja osteosarkoma

Razvoj kemoterapije za liječenje osteosarkoma započeo je 1960-ih godina, kada se kirurško liječenje, najčešće amputacija zahvaćenog ekstremiteta, primjenjivalo kao jedina terapijska opcija, a petogodišnje preživljenje iznosilo je manje od 20 % zbog rane pojave metastaza. Uvođenjem adjuvantne kemoterapije početkom 1970-ih godina, prvenstveno visokih doza metotreksata uz naknadnu primjenu leucovorina (folinske kiseline) radi smanjenja toksičnosti na zdrave stanice, došlo je do značajnog poboljšanja ishoda, čime je prvi put potvrđena osjetljivost osteosarkoma na citostatike [84]. Dokaz tomu je trostruko povećanje preživljenja u usporedbi s isključivo kirurškim liječenjem [85]. Adjuvantna kemoterapija imala je za cilj uništavanje preostalih tumorskih stanica i sprječavanje povrata bolesti, no sama nije

bila dovoljna za značajno povećanje preživljenja. Tijekom 1980-ih godina razvijeni su kombinirani kemoterapijski protokoli koji su uključivali metotreksat, doksorubicin, cisplatinu i kasnije ifosfamid, čime je standardizirano multimodalno liječenje uz neoadjuvantnu i adjuvantnu primjenu kemoterapije te kirurško resekciju. Multicentrična randomizirana studija započeta 1982. godine pokazala je da bolesnici liječeni kemoterapijom imaju 2-godišnje preživljenje bez progresije od 66 %, u usporedbi sa 17 % u skupini koja je bila samo kirurški liječena, čime je kemoterapija definitivno potvrđena kao ključna komponenta terapije [84,86].

Neoadjuvantna kemoterapija, primijenjena prije operacije, omogućila je smanjenje veličine primarnog tumora, uništavanje mikrometastaza te procjenu histološkog odgovora tumora, što je dodatno omogućilo razvoj poštednih kirurških zahvata zahvaljujući napretku slikovne dijagnostike (engl. *computational tomography,* CT; *magnetic resonance imaging,* MRI). Ovaj pristup doveo je do povećanja dugoročnog preživljenja na približno 60–70 % u bolesnika s lokaliziranom bolešću [87].

Unatoč tim poboljšanjima, daljnje intenziviranje ili modificiranje kemoterapijskih režima tijekom 1990-ih i 2000-ih godina nije rezultiralo značajnim dodatnim povećanjem preživljenja. Kao odgovor na potrebu za međunarodnom standardizacijom i evaluacijom terapijskih strategija, pokrenuta je studija EURAMOS-1, koja je integrirala iskustva europskih i američkih centara te uspoređivala standardnu terapiju MAP koja je podrazumijevala visoke doze metotreksata, doksorubicin te cisplatinu (engl. *methotrexate, adriamycin/doxorubicin, cisplatin*, MAP) s intenziviranim režimima prilagođenima histološkom odgovoru tumora. Rezultati EURAMOS-1 pokazali su da dodatna terapijska intenzifikacija ne poboljšava ukupno preživljenje, čime je protokol MAP potvrđen kao standard liječenja lokaliziranog osteosarkoma [88].

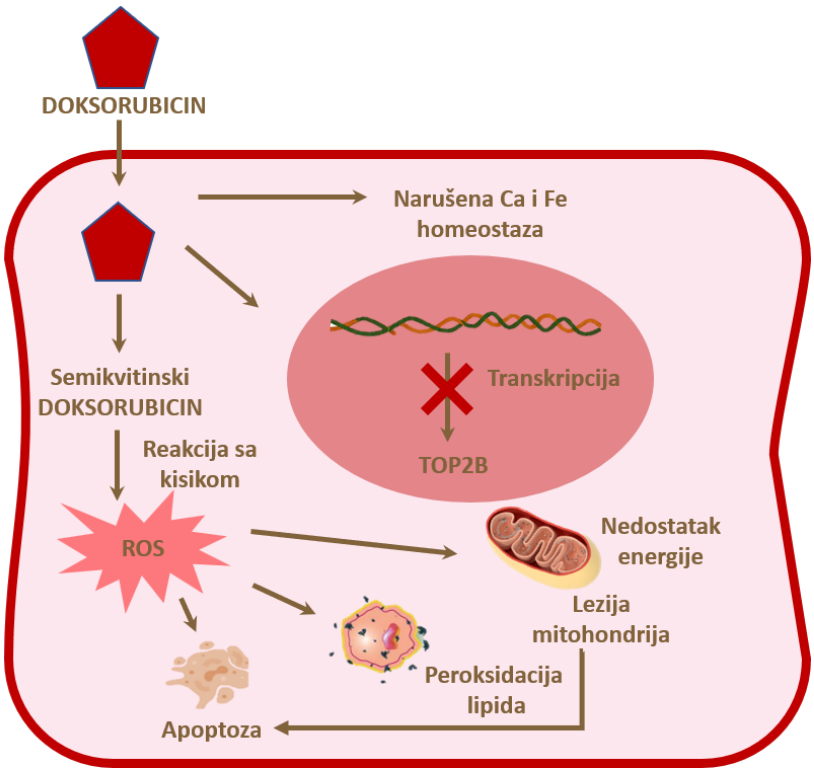
Tijekom 2010-ih godina identificirani su inhibitori tirozin-kinaza poput regorafeniba i cabozantiniba, koji su u kliničkim ispitivanjima pokazali poboljšanje ranog preživljenja bez progresije u rekurentnom osteosarkomu [89].

Osim kemoterapije, u specifičnim situacijama koristi se i radioterapija. Stanice osteosarkoma su relativno otporne na zračenje, pa su za terapijski učinak potrebne visoke doze, što povećava rizik od nuspojava. Razvijene su suvremene tehnike poput radioterapije modulirane intenzitetom (engl. *intensity-modulated radiation therapy*, IMRT) i stereotaktičke radiokirurgije (engl. *stereotactic radiosurgery*, SRS), koje omogućuju preciznije usmjeravanje zraka na tumor uz smanjenje oštećenja okolnog tkiva. Također se istražuju terapije protonskim i ugljikovim ionima, kao i radiofarmaci, s ciljem povećanja učinkovitosti zračenja [90].

U slučajevima kada kemoterapija nije dovoljno učinkovita ili tumorske stanice razviju otpornost, mogu se koristiti ciljane terapije i imunoterapija. Primjer imunomodulatornog pristupa predstavlja mifamurtid (engl. *muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine*, MTP-PE), koji je odobren u Europi za osteosarkom s povećanom vjerojatnošću razvoja metastaza ili recidiva, dok se dinutuksimab, monoklonsko protutijelo usmjereno na antigen GD2, trenutno ispituje u fazi II kliničkih studija [89].

Kemoterapijska sredstva koja se koriste u liječenju maligne bolesti klasificiraju se prema različitim kriterijima, prvenstveno prema mehanizmu djelovanja i kemijskoj strukturi. Glavne skupine uključuju alkilirajuće lijekove, antimetabolite, prirodne alkaloide i antibiotike, hormonalne lijekove te razne druge antineoplastike. Svaka od ovih skupina djeluje na specifične procese u tumorskim stanicama, bilo da ometa diobu stanica, sintezu DNA ili specifične signalne putove. Zbog komplementarnih mehanizama djelovanja i dokazane učinkovitosti, kombinacija metotreksata, doksorubicina i cisplatina postala je zlatni standard sistemske kemoterapije u liječenju osteosarkoma, čime se značajno poboljšava preživljavanje i kontrola mikrometastatske bolesti [91].

Doksorubicin pripada skupini antibiotika antraciklina i djeluje putem tri glavna mehanizma koji dovode do smrti tumorskih stanica. Prvi mehanizam je interkalacija u DNA, pri čemu se lijek umeće između baza DNA i time ometa replikaciju i transkripciju. Drugi mehanizam uključuje inhibiciju topoizomeraze II (TOP2A), enzima koji sudjeluje u razdvajanju i ponovnom spajanju DNA tijekom diobe. Stabilizacijom ovog kompleksa doksorubicin uzrokuje dvolančane lomove DNA i potiče apoptozu. Treći mehanizam je stvaranje reaktivnih kisikovih radikala (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS). Doksorubicin se oksidira u nestabilni semikinonski metabolit koji se ponovno pretvara u doksorubicin uz stvaranje ROS-ova. Oni uzrokuju oksidativni stres, oštećenje DNA i lipida te staničnih membrana, čime aktiviraju apoptotske putove i dovode do smrti tumorske stanice. Iako je doksorubicin važan lijek u medicini njegova primjena mora biti pažljivo određena jer može citotoksično djelovati na kardiovaskularni sustav te razviti rezistenciju (Slika 14) [91].



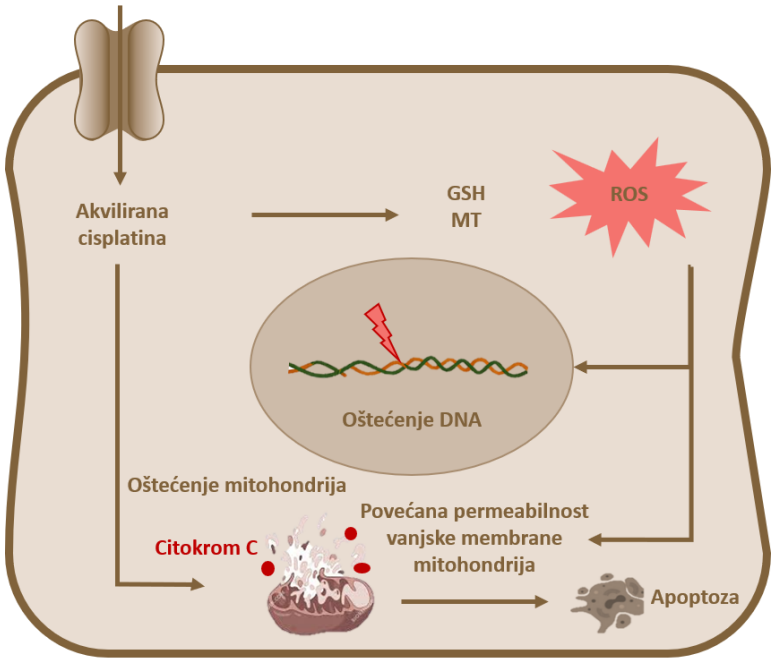
Slika 14. Mehanizam djelovanja doksorubicina u tumorskim stanicama. Direktno oštećuje DNA i blokira transkripciju preko TOP2B, te stvara ROS-ove koji uzrokuju oksidativni stres, oštećenje mitohondrija, peroksidaciju lipida i konačno apoptozu. Shematski prikaz izrađen u programu Microsoft PowerPoint.

Rezistencija na doksorubicin razvija se kroz više mehanizama koji smanjuju njegovu učinkovitost i omogućuju preživljenje tumorskih stanica. Najvažniji mehanizam je povećano izbacivanje lijeka iz stanice putem ABC-transportera, osobito ABCB1 (P-glikoprotein) i ABCC1 (MRP1), čime se smanjuje unutarstanična koncentracija doksorubicina. Osim toga, promjene u topoizomerazi II, poput smanjene ekspresije ili mutacija, mogu smanjiti stvaranje kompleksa lijek–enzim i umanjiti oštećenje DNA. Rezistenciji pridonose i pojačani mehanizmi popravka DNA, koji omogućuju uklanjanje oštećenja izazvanih lijekom, kao i poremećaji u regulaciji apoptoze, primjerice mutacije gena *TP53* ili povećana ekspresija antiapoptotskog proteina Bcl-2, koji sprječavaju smrt tumorskih stanica. Dodatno, povećana aktivnost detoksifikacijskih sustava poput GSTP1 te hipoksični uvjeti u tumoru putem aktivacije HIF-1α mogu dodatno smanjiti osjetljivost stanica na doksorubicin [92].

Cisplatin je citostatik koji djeluje prvenstveno putem jednog dominantnog mehanizma, a to je stvaranje unakrsnih veza u DNA (intra- i interlančanih), čime blokira replikaciju i transkripciju te dovodi do stanične smrti [93]. Rezistencija na cisplatin nastaje kao posljedica različitih molekularnih promjena koje smanjuju učinkovitost lijeka i mogu dovesti do neuspjeha terapije. Najvažniji mehanizmi uključuju smanjenu akumulaciju cisplatina unutar stanice,

povećano izbacivanje lijeka, njegovu inaktivaciju, pojačane mehanizme popravka DNA te promjene u signalnim putovima odgovornima za regulaciju preživljenja i apoptoze stanice. Ulazak cisplatina u tumorsku stanicu djelomično ovisi o transporteru CTR1, čija smanjena ekspresija može dovesti do smanjene koncentracije lijeka unutar stanice i slabijeg terapijskog učinka [94]. Istodobno, transporteri poput ATP7A, ATP7B i MRP2 mogu povećati uklanjanje cisplatina iz stanice, čime se dodatno smanjuje njegova citotoksičnost [95].

Jedan od mehanizama razvoja rezistencije je i inaktivacija cisplatina vezanjem za stanične molekule poput glutationa (GSH) i metalotioneina. Na taj način nastaju kompleksi koji neutraliziraju lijek i olakšavaju njegovo uklanjanje iz stanice, a povećana količina tih molekula povezuje se s većom otpornošću tumorskih stanica. Budući da cisplatin ostvaruje svoj antitumorski učinak stvaranjem oštećenja DNA, povećana aktivnost sustava za popravak DNA može omogućiti tumorskim stanicama preživljenje. Posebno je važan sustav NER (engl. *nucleotide excision repair,* NER), u kojem protein ERCC1 sudjeluje u uklanjanju oštećenja izazvanih cisplatinom. Osim toga, rezistentne stanice mogu promijeniti regulaciju procesa stanične smrti aktivacijom signalnih putova poput PI3K/Akt, Nrf2 i NF-κB, koji potiču preživljenje stanica i smanjuju osjetljivost na apoptozu. Dodatni doprinos razvoju rezistencije imaju autofagija, koja omogućuje preživljenje stanica pod stresom izazvanim lijekom, te EMT koja je povezana s povećanom invazivnošću tumora i smanjenom osjetljivošću na kemoterapiju (Slika 15) [96].

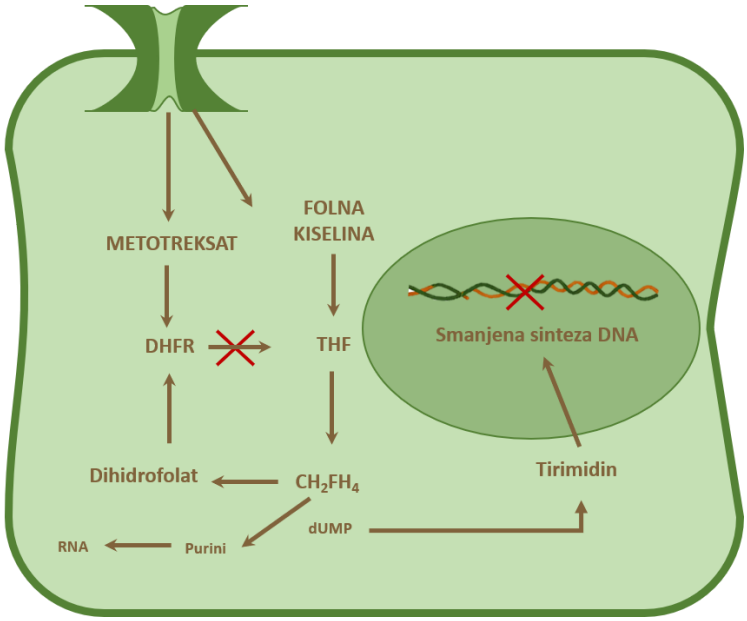


Slika 15. Mehanizam djelovanja cisplatine u tumorskim stanicama. Cisplatina ulazi u stanicu i stvara reaktivne kisikove radikala (ROS), što dovodi do oštećenja DNA i mitohondrija. Posljedično dolazi do povećanog otpuštanja

citokroma C, povećane permeabilnosti mitohondrijske membrane i aktivacije apoptotskog procesa. Shematski prikaz izrađen u programu Microsoft PowerPoint.

Metotreksat je antimetabolit specifičan za S-fazu staničnog ciklusa koji inhibira enzim dihidrofolat-reduktazu (DHFR), čime blokira sintezu purina i timidilata potrebnih za sintezu DNA i RNA te posljedično zaustavlja proliferaciju tumorskih stanica [97].

Rezistencija na metotreksat razvija se kroz nekoliko mehanizama koji smanjuju njegovu učinkovitost. Najčešći je povećana ekspresija ili amplifikacija enzima DHFR, zbog čega stanica održava sintezu nukleotida unatoč prisutnosti lijeka. Dodatno, smanjena ekspresija transportera SLC19A1 (engl. *reduced folate carrier*, RFC1) ograničava ulazak metotreksata u stanicu, dok povećana aktivnost transportera ABCC1 i ABCG2 potiče njegovo izbacivanje iz stanice. Važnu ulogu imaju i promjene u unutarstaničnom metabolizmu lijeka – smanjena aktivnost folilpoliglutamat-sintetaze (FPGS) i povećana aktivnost γ-glutamil hidrolaze (GGH) smanjuju stvaranje i zadržavanje aktivnih poliglutamatnih oblika metotreksata, čime se dodatno umanjuje njegov citotoksični učinak (Slika 16) [98].



Slika 16. Mehanizam djelovanja metotreksata u tumorskim stanicama. Mehanizam djelovanja metotreksata. Metotreksat inhibira enzim dihidrofolat reduktazu (DHFR), čime sprječava nastanak tetrahidrofolata (THF) potrebnog za sintezu purina i timidina. Posljedično dolazi do smanjene sinteze DNA i inhibicije proliferacije stanica. Shematski prikaz izrađen u programu Microsoft PowerPoint.

2.7.3. Molekularna pozadina osteosarkoma

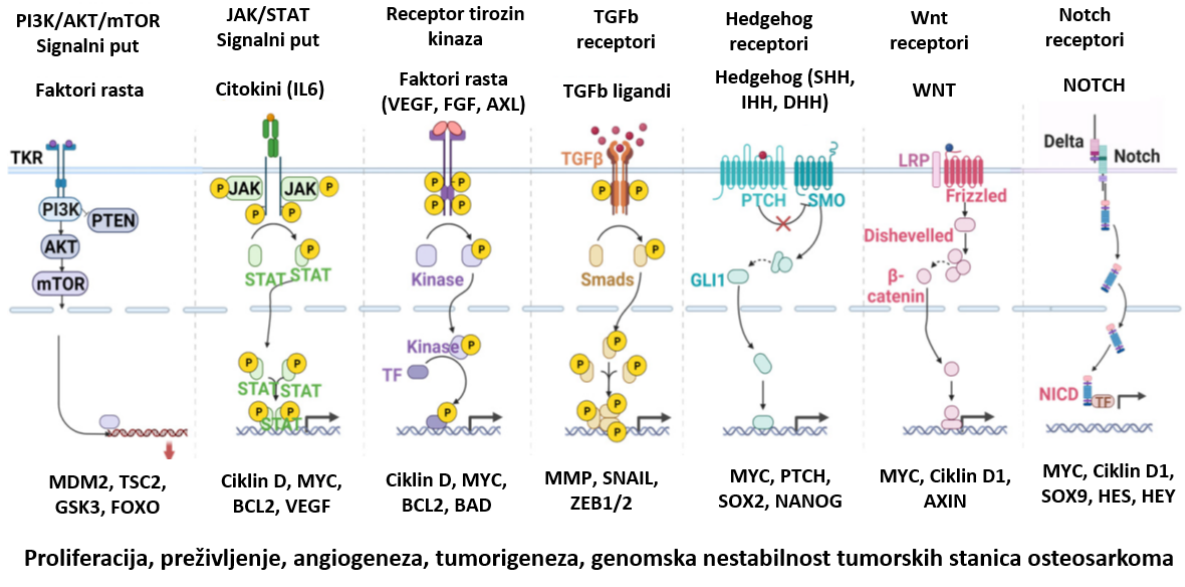
Nastanak osteosarkoma složen je i višeslojan proces koji se ne može objasniti jednom mutacijom ili jednim poremećenim signalnim putem. Umjesto toga, riječ je o bolesti koja nastaje kao posljedica postupnog nakupljanja genetskih i epigenetskih promjena koje zajedno narušavaju osnovne mehanizme kontrole rasta, diferencijacije i preživljavanja stanica. Upravo zbog toga osteosarkom karakterizira izrazita heterogenost, što znači da se tumori kod različitih bolesnika mogu značajno razlikovati na molekularnoj razini [99].

Jedna od ključnih značajki osteosarkoma je kromosomska nestabilnost, koja dovodi do promjena u broju i strukturi kromosoma, stanje poznato kao aneuploidija. Ova nestabilnost povećava agresivnost tumora i njegovu sposobnost rasta i širenja. U osteosarkomu često se javljaju različite vrste kromosomskih preuređenja, uključujući translokacije, delecije, amplifikacije te kromotripsis – ekstremni oblik nestabilnosti u kojem se kromosomi raspadaju na brojne fragmente koji se nasumično ponovno spajaju. U tumorima se pojavljuje u oko 2–3 % slučajeva, dok je u osteosarkomu prisutan u više od 77 % slučajeva i povezan je s napredovanjem bolesti. Postoji nekoliko mogućih mehanizama koji dovode do kromotripsisa, uključujući pucanje i ponovno spajanje DNA, stvaranje mikronukleusa te disfunkciju telomera. Mikronukleusi, male dodatne jezgre unutar stanice koji sadrže fragmente kromosoma, posebno doprinose oštećenju DNA i razvoju kromotripsisa. Također, smanjenje ili gubitak proteina RanGAP1, koji pomaže u kontroli diobe stanica i nadzoru oštećenja DNA, povećava rizik od genetskih pogrešaka i nastanka tumora [100].

Jedan od najranijih i ključnih događaja u razvoju osteosarkoma je gubitak funkcije važnih gena za tumorske supresore, prvenstveno *TP53* i *RB1*. *TP53*, poznat kao „čuvar genoma“, kontrolira oštećenja DNA i može zaustaviti stanični ciklus ili potaknuti apoptozu ako su oštećenja prevelika. Kada je funkcija *TP53* narušena, stanice se nastavljaju dijeliti i nakupljati mutacije. Slično, RB1 regulira prijelaz stanica iz faze G1 u S, a njegov gubitak dovodi do nekontrolirane proliferacije [99].

Na ove osnovne promjene nadovezuju se dodatne genetske abnormalnosti koje potiču rast tumora, poput amplifikacije gena *CDK4* i pojačane ekspresije ciklina D1 i E, te povećane funkcije onkogena kao što je *MYC*. Ove promjene često aktiviraju i ključne signalne puteve poput PI3K/AKT/mTOR, Wnt/β-katenin, NOTCH i Hedgehog/Gli, koji reguliraju rast, preživljavanje, invazivnost i održavanje tumorskih matičnih stanica. Aktivacija puta NF-κB dodatno potiče upalne procese i pomaže tumorima da izbjegnu staničnu smrt [101]. Budući da različiti signalni putevi sudjeluju u regulaciji brojnih staničnih procesa važnih za razvoj i

progresiju osteosarkoma, u nastavku će biti prikazani oni koji imaju osobito značajnu ulogu u njegovoj patogenezi (Slika 17).



Slika 17. Shematski prikaz dominantno disreguliranih signalnih puteva u osteosarkomu. Njihovih učinak očituje se na staničnu proliferaciju, preživljavanje, angiogenezu, tumorigenzeu i genomsku nestabilnost. Slika preuzeta i prilagođena iz [102].

Signalni put PI3K/AKT/mTOR započinje aktivacijom receptora za čimbenike rasta na površini stanice, poput VEGFR, EGFR i FGFR. Njegova aktivacija, često uzrokovana genetskim promjenama ili pojačanom stimulacijom iz tumorskog mikrookoliša, pokreće kaskadu koja potiče proliferaciju, preživljavanje stanica, invazivnost i metastaziranje. Aktivirani AKT djeluje kao centralni čvor koji povezuje niz procesa, uključujući aktivaciju mTOR-a, ciklina i MMP-ova, čime se potiče rast tumora, angiogeneza i razgradnja okolnog tkiva. Ovaj put dodatno moduliraju različite molekule i nekodirajuće RNA, koje pojačavaju proliferaciju, migraciju i otpornost na terapiju. Aktivacija PI3K/AKT/mTOR također omogućuje tumorskim stanicama da prežive unatoč kemoterapiji, čime doprinosi rezistenciji na lijekove poput cisplatina i gemcitabina.

Signalni put JAK/STAT u osteosarkomu povezuje tumorske stanice s imunološkim sustavom, a njegova deregulacija potiče rast tumora i istovremeno slabi antitumorski imunitet. Put se aktivira preko kinaza JAK (JAK1–3, TYK2) koje fosforiliraju proteine STAT , pri čemu STAT3 ima ključnu ulogu u promicanju proliferacije, preživljavanja stanica, kronične upale i imunosupresije. Povišene razine IL-6 u tumoru snažno aktiviraju STAT3, što dodatno potiče metastaziranje i otpornost stanica na smrt. Različite molekule u tumorskome mikrookolišu, uključujući serglicin i FAT10, pojačavaju signalizaciju JAK/STAT, dok nekodirajuće RNA i

mikroRNA mogu modulirati aktivnost ovog puta, bilo poticanjem ili inhibicijom rasta i invazivnosti tumorskih stanica. Zbog svoje središnje uloge, put JAK/STAT je važna terapijska meta, a inhibitori, posebno usmjereni na JAK2/STAT3, pokazuju smanjenje rasta tumora u eksperimentalnim uvjetima. Kao i drugi signalni sustavi, JAK/STAT ne djeluje izolirano već je povezan sa signalizacijom PI3K/AKT i NF-κB, što omogućuje tumorskim stanicama da zaobiđu blokadu jednog puta aktivacijom drugog. Zbog toga suvremeni terapijski pristupi sve više naglašavaju kombiniranu inhibiciju više signalnih puteva kako bi se učinkovitije suzbio rast i širenje osteosarkoma [101].

Signalni put Wnt/β-katenin u osteosarkomu, koji u normalnim uvjetima regulira razvoj i diferencijaciju stanica, često je trajno aktiviran i potiče rast, invaziju i metastaziranje tumorskih stanica. Aktivacija počinje vezanjem liganada Wnt na receptore, što stabilizira β-katenin i omogućuje mu ulazak u jezgru, gdje potiče ekspresiju gena odgovornih za proliferaciju i migraciju. Ovaj put također doprinosi EMT-u, ključnom za širenje tumora, a molekule poput CXCR9 i proteina COL5A2 dodatno pojačavaju njegov učinak. Regulacija signalizacije Wnt/β-katenin uključuje i nekodirajuće molekule RNA: određeni lncRNA potiču rast i metastaziranje, dok neke mikroRNA djeluju supresorski. Put je dio šire mreže koja uključuje signale PI3K/AKT, JAK/STAT i TGF-β, što omogućuje tumorskim stanicama da izbjegnu blokadu jednog puta aktivacijom drugog. Zbog toga Wnt/β-katenin predstavlja važnu terapijsku metu; inhibitori poput tegavivinta i prirodnih spojeva poput echinatina pokazali su sposobnost smanjenja proliferacije, metastaziranja i kemorezistencije u eksperimentalnim modelima [103].

Signalni put NOTCH, koji u normalnim uvjetima regulira razvoj i diferencijaciju stanica, u osteosarkomu je često trajno aktiviran i potiče rast, invaziju i metastaziranje tumorskih stanica. Aktivacija započinje vezanjem liganada (DLL1, DLL3, DLL4, Jagged1, Jagged2) na receptore NOTCH (NOTCH1–4), što oslobađa intracelularnu domenu NOTCH-a (NICD) koja ulazi u jezgru i aktivira gene odgovorne za proliferaciju i preživljavanje. Povećana ekspresija NOTCH3, HES1 i HEY2 povezana je s agresivnim i nezrelim fenotipom stanica, dok ligand JAG1 dodatno doprinosi metastaziranju i recidivu bolesti. Signalizacija NOTCH također sudjeluje u invaziji kroz aktivaciju gena poput MMP7 i djeluje u okviru šire mreže signalnih puteva, uključujući PI3K/AKT, Wnt/β-katenin i JAK/STAT, čime tumorske stanice postižu visoku prilagodljivost i otpornost na terapiju. Zbog svoje ključne uloge u progresiji osteosarkoma, NOTCH predstavlja važnu terapijsku metu, a inhibitori poput CB-103 i RO4929097 pokazali su sposobnost smanjenja ekspresije onkogena i klinički obećavajuće rezultate [104].

Receptori tirozin-kinaze (RTK) su ključne „ulazne točke" signalizacije koje prenose signale iz okoliša u stanicu, regulirajući proliferaciju, diferencijaciju, preživljavanje i migraciju. U osteosarkomu signalizacija RTK je često trajno aktivirana i postaje glavni pokretač rasta, invazije i metastaziranja, djelujući kroz niz signalnih puteva poput PI3K/AKT, MAPK i JAK/STAT. Među najvažnijim receptorima su VEGFR, PDGFR, IGF receptor, FGFR i AXL. Povišena ekspresija AXL-a povezana je s lošijom prognozom, dok signalizacija VEGF/VEGFR potiče angiogenezu i tumorov rast. FGFR doprinosi rezistenciji na kemoterapiju i metastaziranju, osobito u plućima [105].

Signalni sustav RANK/RANKL/OPG ključan je za ravnotežu između stvaranja i razgradnje kosti. U osteosarkomu dolazi do pomaka u korist RANKL-a, što pojačava aktivaciju osteoklasta, povećava resorpciju kosti i stvara okruženje pogodno za rast tumora, invaziju i metastaziranje. RANKL, kojeg proizvode osteoblasti i tumorske stanice, veže se na receptor RANK na osteoklastima i potiče njihov rast i preživljavanje, dok OPG djeluje kao „lažni receptor" koji blokira ovu aktivaciju. Povišen omjer RANKL/OPG povezan je s agresivnijim tumorima, dok niža ekspresija RANK-a korelira s boljim preživljenjem i odgovorom na kemoterapiju [106].

Signalni put Hedgehog/Gli regulira rast, diferencijaciju i razvoj stanica. U osteosarkomu dolazi do njegove deregulacije, pri čemu poremećaji ovog puta mogu istovremeno ukloniti zaštitne mehanizme stanica i aktivirati onkogene, potičući rast, invaziju i metastaziranje. Ključne komponente puta su ligandi SHH, IHH i DHH, receptori PTCH1/2, transkripcijski faktori GLI1–3 i protein SMO. U tumorima ovaj put često djeluje u suradnji s drugim signalnim mrežama, poput PI3K/AKT i Wnt, čime povećava agresivnost i otpornost na terapiju. Studije pokazuju povišenu ekspresiju SHH, IHH, DHH, PTCH1, SMO i faktora GLI u osteosarkomu, a inhibicija SMO ili GLI značajno smanjuje proliferaciju, migraciju i metastaziranje u prekliničkim modelima [107].

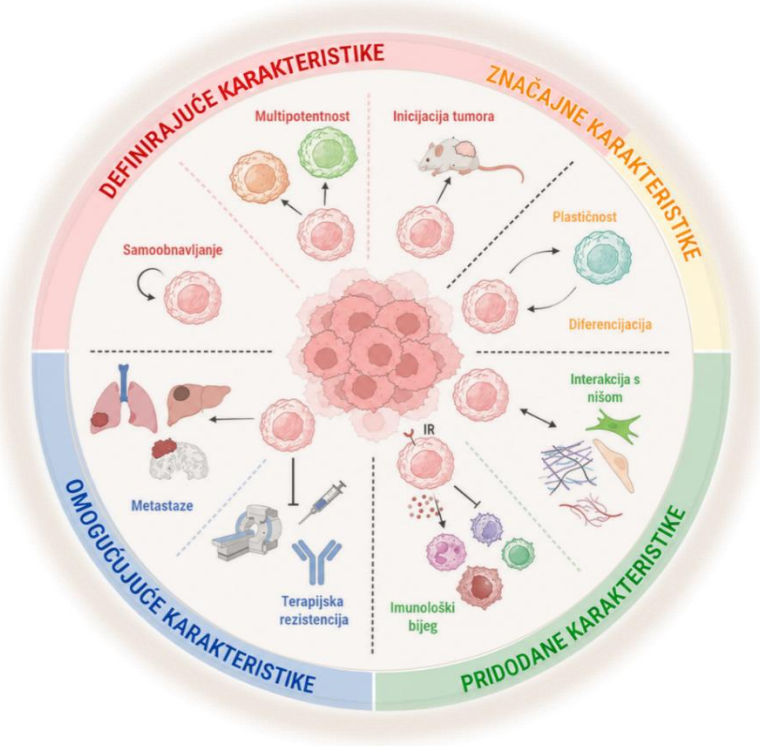
TGF-β je ključni regulator rasta, diferencijacije, migracije i interakcije stanica. U osteosarkomu djeluje primarno pro-tumorsko, potičući rast, invaziju, metastaziranje i otpornost na kemoterapiju. Povišena ekspresija TGF-β u serumu pacijenata povezana je s većim rizikom od plućnih metastaza i lošijim odgovorom na liječenje. Signalizacija TGF-β djeluje u suradnji s drugim putevima, uključujući Wnt/β-katenin i PI3K/AKT, a njezinu aktivaciju moduliraju i ne-kodirajuće molekule RNA poput miR-181c (supresorski učinak) i miR-522 (onkogeni učinak). Proteini poput COL5A2, STEAP1 i GDF15 dodatno pojačavaju pro-tumoralne učinke ovog puta [108].

2.8. Tumorske matične stanice

Matične stanice u ljudskom organizmu definiraju se kao stanice koje posjeduju sposobnost samoobnove i diferencijacijski potencijal, odnosno sposobnost stvaranja različitih staničnih tipova. Tumorske matične stanice (TMS) predstavljaju posebnu subpopulaciju stanica unutar tumorske mase koja dijeli određena svojstva s normalnim matičnim stanicama, ali se od njih razlikuje u kontekstu svoje funkcije i regulacije unutar tumorskog tkiva.

Dok tkivne matične stanice predstavljaju temelj regeneracije i očuvanja tkiva, TMS koriste iste biološke mehanizme u dereguliranom i patološkom kontekstu. U tumorigenezi, TMS funkcionalno se najčešće uspoređuju s multipotentnim matičnim ili progenitorskim stanicama, budući da posjeduju sposobnost stvaranja različitih tumorskih staničnih populacija [109]. Međutim, brojni eksperimentalni dokazi upućuju na to da TMS ne moraju nužno potjecati isključivo iz normalnih multipotentnih matičnih stanica. Diferencirane ili unipotentne stanice mogu, uslijed akumulacije genetskih i epigenetskih promjena, ponovno steći svojstva matičnosti kroz proces dediferencijacije. Ova stanična plastičnost znatno razlikuje tumorske od zdravih matičnih stanica i ukazuje na dinamičnu prirodu tumorske hijerarhije, koja nije strogo fiksirana kao u zdravim tkivima [110,111].

TMS predstavljaju malu, ali funkcionalno izrazito značajnu subpopulaciju stanica unutar tumorskog tkiva koja posjeduje obilježja slična zdravim matičnim stanicama, uključujući sposobnost samoobnove i diferencijacije. Samoobnova je poseban oblik diobe stanice pri kojem se održava stabilan broj funkcionalnih matičnih stanica i omogućuje njihovo dugoročno očuvanje te kontinuirana regeneracija tkiva. S druge strane, diferencijacija je proces tijekom kojeg se nezrele progenitorske stanice postupno pretvaraju u zrele, specijalizirane stanice aktiviranjem genetskih i epigenetskih mehanizama koji im omogućuju da preuzmu svoju specifičnu funkciju u organizmu. Međutim, za razliku od normalnih matičnih stanica, ove su značajke u tumorskim matičnim stanicama deregulirane i usmjerene prema održavanju malignog fenotipa (Slika 18) [112].



Slika 18. Glavne karakteristike tumorskih matičnih stanica koje doprinose razvoju, progresiji i povratu tumora. Slika preuzeta i prilagođena iz [113].

Jedno od temeljnih obilježja i zdravih i tumorskih matičnih stanica jest sposobnost asimetrične diobe, koja u normalnim uvjetima omogućuje istodobno održavanje matične populacije i proizvodnju diferenciranih stanica potrebnih za regeneraciju tkiva. U tkivnim matičnim stanicama asimetrična dioba strogo je regulirana signalnim putevima kao što su Wnt/β-katenin, Notch i Hedgehog/Gli te interakcijama s matičnom nišom. Suprotno tome, u tumorskih matičnih stanica ovaj je proces često poremećen, što rezultira povećanom proizvodnjom stanica s matičnim ili progenitorskim svojstvima i trajnim održavanjem tumorskih matičnih stanica unutar tumorske mase [114].

Sposobnost diferencijacije tumorskih matičnih stanica izravno doprinosi intratumorskoj heterogenosti, budući da one generiraju fenotipski i funkcionalno različite tumorske stanice. Ova heterogenost predstavlja jednu od ključnih prepreka uspješnom liječenju tumora, jer različite subpopulacije tumorskih stanica mogu pokazivati različitu osjetljivost na terapiju. U zdravim tkivima, diferencijacija matičnih stanica vodi prema jasno definiranim, funkcionalno zrelim staničnim tipovima, dok je u tumoru diferencijacija često nepotpuna, aberantna i povezana s agresivnim biološkim ponašanjem [111].

Metabolizam tumorskih matičnih stanica značajno se razlikuje od metabolizma zdravih matičnih stanica. Dok zdrave matične stanice često ovise o oksidativnoj fosforilaciji i održavaju nisku razinu glikolize kako bi smanjile oksidativni stres i očuvale dugovječnost, TMS pokazuju visoku metaboličku fleksibilnost. Sposobne su se prebacivati između glikolize i oksidativne fosforilacije ovisno o dostupnosti hranjivih tvari i kisika. Ova metabolička plastičnost podržava njihovu samoobnovu, proliferaciju i otpornost na terapiju, omogućujući im preživljavanje u hipoksičnim ili nutrientno ograničenim uvjetima tumorskog mikrookoliša. Hipoksija u tumoru stvara specifično stresno okruženje koje dodatno podupire preživljavanje i samoobnavljanje tumorskih matičnih stanica, održavajući njihove matične fenotipe. Istovremeno, hipoksične zone potiču invazivnost, otpornost na terapiju i angiogenezu, pospješujući progresiju i metastaziranje tumora [31].

Za razliku od tkivnih matičnih stanica, koje nemaju tumorigeni potencijal i djeluju isključivo u okviru fizioloških potreba organizma, TMS posjeduju izraženu sposobnost inicijacije tumora. Eksperimentalni modeli pokazali su da vrlo mali broj tumorskih matičnih stanica može dovesti do nastanka tumora koji fenotipski i molekularno odgovara izvornom tumoru, potvrđujući njihovu ključnu ulogu u održavanju tumorske mase [115]. Nadalje, one se smatraju glavnim nositeljima metastatskog potencijala, jer mogu preživjeti u nepovoljnim uvjetima cirkulacije, prilagoditi se novom mikorokolišu i ponovno inicirati tumorski rast u udaljenim organima [116].

Dodatno, TMS pokazuju visoku otpornost na kemoterapiju i radioterapiju zbog kombinacije čimbenika koji im omogućuju preživljavanje u nepovoljnim uvjetima [116]. Ove stanice često pokazuju povećanu ekspresiju ATP-vezujuće kasetne (ABC) transportere (engl. *ATP-binding cassette (ABC) transporters*), koji aktivno izbacuju citotoksične lijekove iz stanice i time smanjuju njihovu učinkovitost. Iako se ABC-transporteri nalaze i u tkivnim matičnim stanicama, gdje imaju zaštitnu ulogu u očuvanju genomske stabilnosti, njihova prekomjerna aktivnost u tumorskim matičnim stanicama doprinosi terapijskoj rezistenciji. Također, one posjeduju efikasnije mehanizme popravka DNA, što im omogućuje brzo otklanjanje oštećenja izazvanih terapijom. U tkivnim matičnim stanicama učinkoviti mehanizmi popravka DNA služe sprječavanju akumulacije mutacija i očuvanju genomske stabilnosti. U tumorskim međutim, isti mehanizmi djeluju u kontekstu već postojeće genetske i epigenetske nestabilnosti, omogućujući preživljavanje stanica koje dodatno potiču progresiju tumora. Osim toga, aktiviraju antiapoptotske programe koji sprječavaju pokretanje stanične smrti, te posjeduju sposobnost neutralizacije oksidativnog stresa, što dodatno povećava njihovu otpornost. Njihova prisutnost u specifičnoj mikrookolišnoj niši dodatno ih štiti od djelovanja lijekova, jer niša

pruža signalne i strukturne uvjete koji podržavaju preživljavanje i održavanje matičnog fenotipa. Kao rezultat toga, subpopulacije tumorskih matičnih stanica, koje bi inače bile osjetljive na terapiju, preživljavaju čime se povećava rizik od recidiva i omogućuje inicijacija metastaza, što ih čini ključnim čimbenikom terapijske otpornosti tumora [31].

Dodatno, TMS često akumuliraju metaboličke intermedijere koji se koriste za sintezu nukleotida, lipida i antioksidativnih molekula, čime se dodatno osnažuju njihova matična svojstva i invazivni potencijal. Za razliku od njih, tkivne matične stanice održavaju strogo reguliran metabolizam kako bi izbjegle genetska i oksidativna oštećenja, što predstavlja ključnu razliku u energetskim strategijama koje koriste TMS za preživljavanje i progresiju tumora [9].

2.8.1. Signalni putevi tumorskih matičnih stanica

Tumorske matične stanice održavaju svoj matični i tumorigeni fenotip putem složene mreže signalnih puteva koji u zdravim tkivima reguliraju razvoj, diferencijaciju i samoobnavljanje, dok u tumorskom okruženju postaju trajno ili aberantno aktivirani.

Signalni put Wnt/β-katenin, primjerice, u tumorskim matičnim stanicama potiče ekspresiju gena povezanih s matičnim svojstvima i blokira diferencijaciju, čime se osigurava kontinuirana proizvodnja novih matičnih stanica unutar tumora. Signalizacija Notch u tumorskih matičnih stanica koordinira odluku o sudbini stanice, balansirajući samoobnovu i diferencijaciju. Aktivacija ovog puta održava populaciju tumorskih matičnih stanica i istovremeno povećava njihovu otpornost na terapiju. Signalni put Hedgehog/Gli, također podržava proliferaciju i samoobnovu tumorskih matičnih stanica, omogućujući održavanje matičnog fenotipa i povećavajući tumorigenost. Signalizacija PI3K/AKT/mTOR pruža tumorskim matičnim stanicama mogućnost preživljavanja u nepovoljnim uvjetima mikrookoliša. Aktivacija ovog puta omogućuje metaboličku plastičnost, otpornost na terapiju i efikasnu proliferaciju. Signalni put TGF-β igra važnu ulogu u indukciji promjena sličnih EMT-u, čime TMS stječu povećanu invazivnost i migracijski potencijal [117].

Međudjelovanje svih ovih signalnih puteva u sinergiji s tumorskim mikrookolišem omogućuje visoku plastičnost tumorskih matičnih stanica.

2.8.2. Mehanizmi otpornosti tumorskih matičnih stanica na terapije

Otpornost stanica tumora proizlazi iz složene mreže molekularnih i staničnih prilagodbi koje omogućuju preživljenje tumora unatoč snažnom terapijskom pritisku. U tom kontekstu,

TMS imaju središnju ulogu, budući da zbog svoje sposobnosti samoobnavljanja, izražene stanične plastičnosti i prilagodbe tumorskom mikrookolišu pokazuju izraženu otpornost na kemoterapiju, radioterapiju i ciljane terapije.

Jedan od temeljnih mehanizama otpornosti tumorskih matičnih stanica jest pojačana ekspresija receptora i aktivacija signalnih puteva preživljenja. Povećana prisutnost receptora tirozin-kinaza poput EGFR-a, PDGFR-a, FGFR-a i IGF-1R-a, kao i receptora uključenih u održavanje matičnosti, uključujući Notch i Frizzled signalnog puta Wnt/β-katenin, omogućuje kontinuiranu aktivaciju nizvodnih signalnih puteva PI3K/Akt/mTOR, MAPK/ERK, JAK/STAT i NF-κB. Ovi putevi potiču preživljenje, inhibiciju apoptoze i otpornost na terapiju, istodobno održavajući matični fenotip.

Uz aktivaciju signalnih puteva, TMS koriste mehanizme aktivnog izbacivanja terapijskih lijekova iz stanice. Visoka ekspresija ABC-transportera, osobito ABCG2 i MDR1 (ABCB1), omogućuje učinkovito uklanjanje kemoterapijskih lijekova iz stanice i predstavlja ključni mehanizam višestruke otpornosti na lijekove [118].

Standardni terapijski pristup osteosarkomu temelji se na multimodalnom liječenju koje uključuje kiruršku resekciju i kemoterapiju prema protokolu MAP (metotreksat, doksorubicin i cisplatin), koji predstavlja osnovu liječenja potvrđenu i u velikim međunarodnim studijama poput EURAMOS-1 [88].

Otpornost na dokorubicin dodatno je pojačana antioksidativnim mehanizmima tumorskih matičnih stanica. Budući da dokorubicin inducira stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva i oksidativni stres, TMS pojačavaju ekspresiju antioksidativnih enzima, uključujući glutation peroksidazu i superoksid dismutazu. Time se smanjuje razina oksidativnog oštećenja DNA i membrana, što dodatno doprinosi preživljenju stanica.

Osim mehanizma izbacivanja kemoterapeutika i antioksidativne zaštite, otpornost tumorskih matičnih stanica uključuje i metaboličku prilagodbu te promijenjenu dostupnost terapijskih sredstava. Ovi mehanizmi posebno dolaze do izražaja u otpornosti na metotreksat, antifolatni lijek koji inhibira dihidrofolat reduktazu i time blokira sintezu nukleotida. TMS pokazuju sposobnost povećanja ekspresije enzima uključenih u folatni ciklus i alternativne puteve nukleotidne biosinteze, čime se zaobilazi metabolička blokada izazvana metotreksatom. Istodobno, aktivacija signalnih puteva Wnt/β-katenin i Notch podržava samoobnovu i regeneraciju tumora unatoč terapiji.

Važan stup otpornosti tumorskih matičnih stanica čini pojačana aktivnost mehanizama popravka DNA. Ovaj mehanizam posebno je značajan u kontekstu otpornosti na cisplatinu, lijek koji inducira DNA adukte i oksidativni stres. TMS pokazuju povećanu aktivnost

nukleotidne ekscizijske reparacije (NER) i homologne rekombinacije (HR), uz pojačanu ekspresiju proteina poput ATM-a, ATR-a i BRCA1/2, čime učinkovito popravljaju terapijom inducirana oštećenja DNA. Uz to, povećana ekspresija transportera uključenih u izlučivanje cisplatine i pojačan antioksidativni odgovor dodatno pridonose otpornosti.

Otpornost tumorskih matičnih stanica dodatno je potpomognuta izbjegavanjem apoptoze i aktivacijom alternativnih mehanizama preživljenja. Pomak ravnoteže prema antiapoptotskim proteinima, uključujući Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 i survivin, uz disfunkciju signalnog puta p53, omogućuje preživljenje stanica čak i u uvjetima snažnog terapijskog stresa. U takvim uvjetima TMS mogu aktivirati autofagiju kao adaptivni mehanizam preživljenja.

Svi navedeni mehanizmi dodatno su pojačani epigenetskom i staničnom plastičnošću, uključujući i procese slične EMT-u, koji omogućuju prilagodbu terapijskom pritisku, smanjenu proliferaciju i povećanu otpornost. TMS mogu ući u stanje dormantnosti, izbjegavajući terapije koje ciljaju proliferirajuće stanice, te kasnije ponovno inicirati rast tumora ili metastaza.

Konačno, otpornost tumorskih matičnih stanica odvija se u kontekstu tumorskog mikrookoliša i niša tumorskih matičnih stanica, koje pružaju dodatnu zaštitu kroz hipoksiju, interakcije s izvanstaničnim matriksom i signale stromalnih stanica. Ove niše omogućuju dugotrajno preživljenje rezistentne populacije i predstavljaju ključnu prepreku uspješnom liječenju osteosarkoma [119].

2.8.3. Identifikacija i izolacija tumorskih matičnih stanica

Kako bi se bolje razumjela biologija tumorskih matičnih stanica, njihova uloga u tumorskoj hijerarhiji te mehanizmi koji reguliraju njihovo samoobnavljanje, diferencijaciju i terapijsku otpornost, razvijen je niz laboratorijskih pristupa za njihovu identifikaciju i izolaciju. Ovi eksperimentalni testovi temelje se na specifičnim fenotipskim i funkcionalnim obilježjima tumorskih matičnih stanica te omogućuju obogaćivanje staničnih populacija s izraženim matičnim svojstvima.

Jedan od najčešće korištenih pristupa temelji se na izolaciji stanica prema površinskim markerima koji su povezani s matičnim fenotipom. Ova metoda najčešće uključuje protočnu citometriju ili magnetsku separaciju stanica, pri čemu se koriste specifična antitijela usmjerena na markere ovisno o vrsti tumora [120]. Jedan od najčešće korištenih površinskih markera je CD133 (prominin-1), transmembranski glikoprotein uključen u organizaciju stanične membrane i signalnu transdukciju. Drugi važan marker je CD44, adhezijska molekula koja sudjeluje u interakciji stanica s izvanstaničnim matriksom, migraciji i signalizaciji putem

hijaluronske kiseline. CD44-pozitivne tumorske stanice često pokazuju povećanu invazivnost, sposobnost samoobnove i otpornost na terapiju. Česti površinski markeri su i CD24 i EpCAM, koji sudjeluju u regulaciji stanične adhezije, signalizacije i interakcije s tumorskim mikrookolišem [121].

Druga važna metoda izolacije temelji se na funkcionalnim svojstvima tumorskih matičnih stanica, osobito na njihovoj povećanoj aktivnosti ABC-transportera. Ova metoda često se koristi za identifikaciju tzv. *side population* stanica, koje aktivno izbacuju fluorescentne boje, primjerice Hoechst 33342. Stanice koje učinkovito izbacuju boju identificiraju se i izoliraju pomoću protočne citometrije te omogućuje izolaciju stanica s povećanom otpornosti na lijekove. Ovaj pristup naglašava funkcionalnu otpornost tumorskih matičnih stanica, no nije potpuno specifičan jer slična svojstva mogu posjedovati i tkivne matične stanice. Izolacija tumorskih matičnih stanica često se provodi i putem kulture stanica u uvjetima koji selektivno pogoduju matičnom fenotipu. U tom kontekstu koriste se restriktivni uvjeti za uzgoj stanica što podrazumijeva medij bez seruma, uz dodatak specifičnih faktora rasta, pri čemu stanice formiraju trodimenzionalne sferoidne strukture poznate kao tumorosfere. Sposobnost formiranja sfera smatra se funkcionalnim pokazateljem samoobnove i matičnosti. Ova metoda omogućuje obogaćivanje populacije tumorskih matičnih stanica, ali može inducirati selekcijske pritiske koji ne odražavaju u potpunosti uvjete *in vivo* [122].

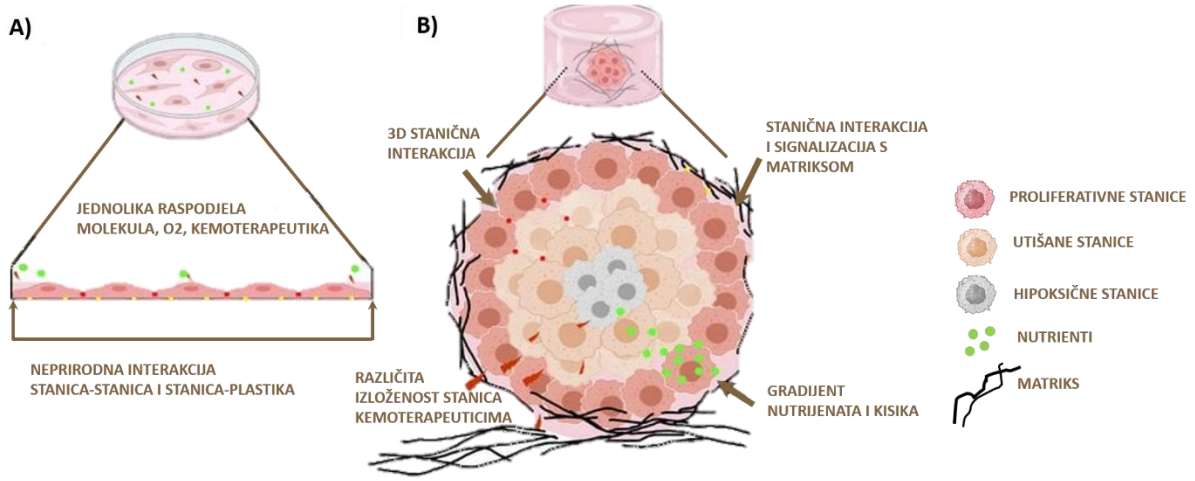
Dodatno, enzimska aktivnost aldehid dehidrogenaze koristi se kao funkcionalni marker za karakterizacijutumorskih matičnih stanica. Povećana aktivnost ovog enzima omogućuje detoksikaciju reaktivnih aldehida i sudjeluje u regulaciji retinoične signalizacije, što doprinosi očuvanju matičnog fenotipa. Detekcija aktivnosti ALDH često se provodi pomoću testa Aldefluor, koji omogućuje izolaciju živih populacija tumorskih stanica s obilježjima matičnosti. Iako je ovaj pristup tehnički relativno precizan i omogućuje izolaciju jasno definirane stanične populacije, njegovo ograničenje leži u činjenici da ekspresija ovih markera može varirati ovisno o tumorskom mikrookolišu i stadiju bolesti, što odražava dinamičnu prirodu tumorskih matičnih stanica [123].

Konačno, zlatnim standardom za potvrdu identiteta tumorskih matičnih stanica smatra se funkcionalna validacija i*n vivo*, najčešće kroz transplantacijske modele u imunodeficijentnim životinjama. Izolirane stanične populacije evaluiraju se prema njihovoj sposobnosti inicijacije tumora, održavanja tumorske hijerarhije i ponovne rekapitulacije heterogenosti primarnog tumora. Iako ova metoda ne predstavlja izolacijsku tehniku u užem smislu, ona je ključna za potvrdu da izolirane stanice doista posjeduju svojstva tumorskih matičnih stanica [122].

U cjelini, niti jedna pojedinačna metoda nije dovoljna za pouzdanu izolaciju i identifikaciju tumorskih matičnih stanica. Stoga se suvremeni pristupi temelje na kombiniranju više metoda, čime se postiže veća specifičnost i funkcionalna relevantnost izolirane populacije, uz istodobno uvažavanje dinamične i kontekstualno ovisne prirode tumorske matičnosti.

2.8.4. Trodimenzionalne stanične kulture

Tradicionalne adherentne stanične kulture desetljećima su predstavljale osnovni eksperimentalni sustav za proučavanje tumorskih stanica zbog svoje jednostavne primjene, niske cijene i visoke reproducibilnosti. U takvim sustavima stanice rastu u jednosloju na ravnoj adhezivnoj površini, što omogućuje lako praćenje morfologije, proliferacije, diferencijacije i odgovora na različite farmakološke tretmane. Ovi modeli također omogućuju jednostavnu primjenu standardnih molekularnih i biokemijskih metoda, što ih čini pogodnima za početna mehanistička istraživanja (Slika 19A-B) [124].



Slika 19. Razlike u adherentnim staničnim kulturama i 3D tumorskim modelima. A) U 2D kulturi stanice rastu u jednoslojnom sloju na dnu plastičnih posuda, uz ograničene međustanične interakcije i neograničenu dostupnost hranjivih tvari, kisika i lijekova. B) 3D kulture omogućuju bolju međustaničnu interakciju i interakciju s izvanstaničnim matriksom, uz ograničenu dostupnost hranjivih tvari, kisika i lijekova, čime vjernije oponašaju tumorski mikrookoliš *in vivo*. Slika preuzeta i prilagođena iz [125].

Međutim, unatoč praktičnim prednostima, adherentne kulture imaju značajna ograničenja u kontekstu proučavanja tumorske biologije i tumorskih matičnih stanica. U jednoslojnom rastu stanice nemaju prostornu organizaciju kakva postoji u stvarnom tkivu, a međustanične interakcije i kontakti sa izvanstaničnim matriksom su znatno reducirani. Također, kisik, hranjive tvari i signalne molekule ravnomjerno su dostupni svim stanicama, dok u tumoru

postoje izraženi gradijenti hipoksije, pH-vrijednosti i koncentracije nutrijenata. Zbog toga se ovom metodom ne reproduciraju ključni biološki uvjeti kojima su stanice izložene *in vivo*, što može dovesti do pogrešne procjene proliferacijskog potencijala, invazivnosti i osjetljivosti na terapiju [126].

Kako bi se prevladali navedeni nedostaci, razvijeni su trodimenzionalni (3D) stanični modeli koji omogućuju rast stanica u prostorno organiziranoj strukturi i vjernije oponašaju tumorsko mikrookruženje. U 3D sustavima stanice ostvaruju intenzivnije međustanične kontakte, aktivnije interakcije s izvanstaničnim matriksom te spontano stvaraju gradijente kisika i hranjivih tvari, čime se bolje reproduciraju uvjeti prisutni u stvarnom tumoru. Posljedično, morfologija, genska ekspresija, signalni putevi i odgovor na terapiju u 3D modelima često više odgovaraju ponašanju tumorskih stanica u uvjetima *in vivo* [124,126].

3D kulture mogu se podijeliti u dvije osnovne kategorije: sustavi bez nosača i sustavi koji se temelje na nosačima. U sustavima bez nosača stanice se oslanjaju na vlastitu sposobnost klonalnosti, agregacije i međusobne adhezije kako bi spontano formirale trodimenzionalne strukture. Ovi sustavi uvelike ovise o tipu ploče na kojoj se stanice kultiviraju, bilo da je riječ o ploči s izrazito niskom adhezivnošću za formiranje staničnih agregata u obliku sferoida ili ploči presvučenoj izvanstaničnim matriksom za diferencijaciju stanica u organoide. Prednost ovih sustava je jednostavnost, dobra reproducibilnost i izbjegavanje utjecaja umjetnih materijala na stanično ponašanje. Najčešći primjer ovog modela su sferne kulture, odnosno tumorosfere ili sarkosfere u slučaju sarkoma [126,127].

Suprotno tome, postoje modeli koji koriste prirodne ili sintetske nosače. Tako postoje čvrsti nosači koji pružaju rigidnu matricu i omogućuju formiranje sferoida, ili mekani nosači poput hidrogelova koji sadrže kompleksnu arhitekturu sličnu izvanstaničnom matriksu, u kojoj se generiraju višestanični tumorski sferoidi slični čvrstim tumorima *in vivo*. U ovom kontekstu, često se koriste mekani biološki nosači poput kolagena, alginata, Matrigela ili biopolimernih matriksa, unutar kojih se stanice ugrađuju i rastu u tri dimenzije [128]. Takvi sustavi omogućuju preciznu kontrolu mehaničkih i biokemijskih svojstava mikrookoliša, uključujući krutost matriksa, poroznost i prisutnost signalnih molekula. Ipak, njihova primjena može biti tehnički zahtjevnija, skuplja i ponekad ograničena varijabilnošću sastava bioloških matriksa [127].

U istraživanju tumorskih matičnih stanica posebno se ističu sferne kulture, jer omogućuju funkcionalno obogaćivanje populacija s izraženim svojstvima matičnosti. U neadhezivnim i serumom osiromašenim uvjetima preživljavaju prvenstveno stanice koje posjeduju sposobnost samoobnove, otpornost na stres i klonalni potencijal, dok diferencirane tumorske stanice uglavnom ne preživljavaju. Formirane sfere pokazuju povećanu ekspresiju

markera tumorskih matičnih stanica, pojačanu aktivaciju signalnih puteva povezanih s matičnošću te povećanu otpornost na kemoterapiju i radioterapiju. Osim toga, unutarnje zone sfera često postaju hipoksične, čime se dodatno reproduciraju uvjeti tumorskog mikrookoliša i potiče održavanje matičnog fenotipa [129].

Unatoč brojnim prednostima, 3D modeli također imaju određena ograničenja. Analiza stanica unutar sfera može biti tehnički zahtjevnija zbog otežanog prodiranja boja i antitijela, složenije izolacije stanica te veće varijabilnosti veličine i strukture sfera. Standardizacija protokola i kvantitativna analiza također mogu predstavljati izazov. Zbog toga se u suvremenim istraživanjima često primjenjuje kombinirani pristup, u kojem se adherentni modeli koriste za početna mehanistička ispitivanja, dok 3D sustavi omogućuju validaciju rezultata u uvjetima bližim fiziološkim [127].

Takav integrirani pristup posebno je važan u istraživanju tumorskih matičnih stanica, jer omogućuje preciznije razumijevanje njihove uloge u tumorskome rastu, terapijskoj rezistenciji i metastaziranju, te olakšava identifikaciju novih terapijskih ciljeva.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

Provođenje ovog istraživanja odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. Broj: 251-59-10106-25-111/75, klasa: 641-01/25-02/04). Istraživanje je provedeno na stanicama izoliranima iz uzoraka pacijenta koji boluje od osteosarkoma. Uzorci su dobiveni od mladog muškarca kojemu je dijagnosticiran hondroblastični osteosarkom femura, gradusa III. Dijagnoza osteosarkoma postavljena je na temelju biopsije tumorskog tkiva. Nakon utvrđene dijagnoze pacijent je podvrgnut kemoterapijskom liječenju. Liječen je prema protokolu EURAMOS-1 primjenom neoadjuvantne kemoterapije dokorubicinom, cisplatinom i metotreksatom, nakon čega je tumor kirurški uklonjen odnosno napravljena je resekcija [88]. Postoperativno je primio dvanaest ciklusa iste kemoterapije uz dodatak interferona-alfa. Nakon dvije godine remisije, došlo je do ponovne pojave bolesti te je opet napravljena resekcija tumora. Uzorci tumora prikupljani su u dobi od 16, 17 i 19 godina, pri dijagnozi, resekciji nakon kemoterapije te recidivu. Uzorci osteosarkoma su prikupljeni tijekom operativnih zahvata u Klinici za dječje bolesti Zagreb uz odobrenje Etičkog povjerenstva Klinike za dječje bolesti Zagreb (Ur. Broj: 02-23/20-4-2016, 02-23/34-4-179) te uz pristanak pacijenta i njegovih roditelja/skrbnika. Uzorci su neposredno po završetku operacijskog zahvata transportirani u laboratorij Prirodoslovno - matematičkog fakulteta radi izolacije stanica za potrebe eksperimentalnih istraživanja. Izolacija stanica provedena je sukcesivno, ovisno o vremenu pristizanja uzoraka, dok su svi daljnji eksperimenti na izoliranim stanicama izvedeni istodobno kako bi se osigurala usporedivost rezultata. Stanice su uspješno umnožene iz uzoraka pri dijagnozi i uzorka recidiva, a stanice iz resekcijskog uzorka nakon kemoterapije nisu uspješno uzgojene te navedeni uzorak nije uključen u konačnu analizu. Rezultati prikazani u nastavku odnose se na uzorke primarne dijagnoze i recidiva. Stanične linije ljudskog osteosarkoma U2OS (RRID:CVCL_0042) te stanična linija karcinoma vrata maternice HeLa (RRID:CVCL_0030), korištene su kao kontrolne stanice u eksperimentima.

3.2. Uzgoj stanica u staničnoj kulturi

3.2.1. Uspostava parentalne kulture stanica iz uzorka osteosarkoma

Nakon kirurškog zahvata tkivo je transportirano u Coonovom modificiranom mediju Ham 12 (Sigma Aldrich, SAD) koji je sadržavao 10 % fetusnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum,* FBS) i 1 % penicilina/streptomicina (Pen/Strep), u daljnjem tekstu označavan kao Coonov medij za uzgoj stanica. Po prijemu, uzorak je u sterilnim uvjetima, unutar zaštitnog kabineta (Heraeus, Njemačka), postavljen u petrijevu zdjelicu promjera 100 mm (Sarstedt, Njemačka) s 10 mL fosfatnog pufera (engl. *phosphate-buffered saline,* PBS) (Sigma Aldrich, SAD). Kako bi se provela enzimska digestija, tkivo je najprije usitnjeno škarama, skalpelom i pincetom na male komadiće veličine približno 0,5–1 mm^2. Usitnjeni komadići preneseni su u epruvetu koja je prethodno sadržavala medij za digestiju sastavljen od Coonovog medija, 20 % FBS, 1 % Pen/Strep i 3,75 mg/mL kolagenaze II (Gibco, SAD). Epruveta je potom inkubirana u inkubatoru (Panasonic, Japan) na 37 °C, uz 5 % CO_2 i blago njihanje, tijekom 2 sata, omogućujući učinkovitu enzimska razgradnju tkiva. Nakon inkubacije epruveta je centrifugirana pri 300 x g tijekom 10 minuta (Universal 320R, Njemačka) na sobnoj temperaturi. Supernatant je uklonjen, a na talog je dodan Coonov medij za uzgoj stanica. Talog stanica je resuspendiran i nasađen u kultivacijsku posudu T-75. Stanice su se unutar 48 sati počele prihvaćati za podlogu. Tako inkubiranim stanicama Coonov medij za uzgoj stanica se mijenjao dva puta tjedno, a pasažiranje je provedeno po postizanju 70 % konfluentnosti. Time se dobila populacija stanica izolirana iz tumorskog tkiva koja se naziva parentalna linija te predstavlja početnu, heterogenu staničnu populaciju. Takve kulture, u trećoj pasaži, korištene su za analizu transkriptoma na razini jedne stanice.

3.2.2. Izolacija tumorskih matičnih stanica iz parentalne kulture stanica

Za potrebe ostalih eksperimenata koji podrazumijevaju karakterizaciju tumorskih matičnih stanica bilo je potrebno izolirati tu populaciju stanica. Izolacija tumorskih matičnih stanica iz parentalne linije ostvarena je uzgojem stanica u restriktivnim uvjetima koji su uključivali izostanak seruma te rast u metil-celulozi na neadhezivnim podlogama. U navedenim uvjetima preživljavaju isključivo stanice s obilježjima matičnih stanica, koje formiraju trodimenzionalne sferoide. Parentalnim stanicama je aspiriran medij te su isprane s PBS-om. Za odvajanje stanica od podloge uklonjen je PBS, dodan je tripsin te su stanice inkubirane 4 minute na 37 °C pri 5 % CO_2. Djelovanje tripsina inhibirano je dodavanjem Coonovog medija

za uzgoj stanica. Stanična suspenzija centrifugirala se na 350 x g tijekom 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Supernatant je uklonjen, a na talog stanica dodan medij za uzgoj sferioda sljedećeg sastava: 2 x DMEM/F12, 1 % Pen/Strep, 1 % ITS (engl. *insulin-transferin-selenium*, ITS), 20 nM progesterona. Stanice su resuspendirane, prebrojane i nasađene na niskoprijanjajuće pločice sa šest jažica u koncentraciji 20 000 – 40 000 stanica/jažici u 2,5 mL medija za uzgoj sfera i 2,5 mL 2 % metil-celuloze koja je prethodno pripremljena otapanjem u MiliQ vodi na magnetnoj miješalici pri 4^{o}C tijekom tri dana. Naposlijetku, u staničnu suspenziju dodani su faktori rasta faktor rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor,* FGF-2) i epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor,* EGF) u konačnoj koncentraciji 10 ng/mL. Isti faktori dodani su svaka dva dana za vrijeme uzgoja sferoida.

Sfere su uzgajane 14 - 30 dana nakon čega je slijedila izolacija. Na sterilnu epruvetu stavljen je filter s porama 40 μm (pluriStrainer, pluriSelect Life Science, Njemačka). U svaku jažicu serološkom pipetom dodano je 2 mL PBS-a te se istom pipetom prebacio volumen iz jažice na filter. Tekući sadržaj gravitacijskom silom je prošao kroz filter dok su sfere zaostale na filteru. Jedan filter korišten je za izolaciju 2 jažice. Kada su sve sfere izolirane pripremljena je nova epruveta na koju se stavio filter, ali ovaj put naopako na način da su sfere okrenute prema dolje. Filter je potom ispran medijem za uzgoj stanica, a sfere koje su na filteru su isprane u epruvetu. Takva stanična suspenzija prebačena je u adhezivne kultivacijske posude T-75. Unutar 24 sata stanice su počele izlaziti iz sferoidne konformacije i vezati se za podlogu. Takvim stanicama Coonov medij za uzgoj stanica je mijenjan dva puta tjedno uz dodatak faktora rasta FGF-2-a u konačnoj koncentraciji 10 ng/mL. Nakon dva do tri tjedna stanice su dosegnule konfluentnost te su pasažirane. Ovako izolirane stanice predstavljaju prvu generaciju tumorskih matičnih stanica. Tako pročišćena populacija tumorskih matičnih stanica korištena je za sve daljnje eksperimente u rasponu od treće do osme pasaže.

3.2.3. Uzgoj staničnih linija

Kultivacija staničnih linija U2OS i HeLa provedena je korištenjem medija DMEM s udjelom glukoze (4,5 g/L) (Capricorn Scientific, Njemačka) uz dodatak 10 % FBS-a i 1 % Pen/Strep-a na adhezivnim podlogama. Stanicama je medij mijenjan dva puta tjedno, a pasažiranje je provedeno po postizanju 70 % konfluentnosti.

3.3. Analiza transkriptoma na razini jedne stanice

3.3.1. Priprema knjižnice

Sekvenciranje transkriptoma na razini jedne stanice (engl. *single cell RNA sequencing,* scRNA-seq) provedeno je na primarnim stanicama osteosarkoma treće pasaže nakon postizanja približno 80 % konfluentnosti. Stanice su transportirane u termokutiji Alibox (Alifax, Italija) na 37^{o}C do laboratorija BIA Separation CRO u Ljubljani, Slovenija gdje se provela priprema knjižnice.Stanice su isprane 1 × PBS puferom bez kalcija i magnezija, koji je sadržavao 0,04 % (m/m) goveđi serum albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA). Stanice su odvojene od podloge tripsinom, centrifugirane pri 300 x g tijekom 5 minuta te resuspendirane u svježem mediju. Koncentracija stanica prilagođena je ciljanom broju od približno 10 000 stanica po uzorku. Knjižnice za scRNA-seq izrađene su korištenjem kompleta kemikalija Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kit v3.1 (Dual Index), prema uputama proizvođača [130]. Stanična suspenzija, enzimski reagensi i gel-zrnca s bar kodovima učitani su u mikrofluidni čip, koji je potom postavljen u uređaj Chromium Controller (10x Genomics, SAD). Uređaj stvara emulzijske kapljice (engl. *Gel beads in EMulsion, GEM*), pri čemu se pojedinačne stanice nasumično enkapsuliraju zajedno s jednim gel-zrncem i reakcijskim puferom. Svako gel-zrnce sadrži oligonukleotide s jedinstvenim staničnim barkodom, jedinstvenim molekularnim identifikatorom (engl. *unique molecular identifier, UMI*) te slijedom poli(dT) za hvatanje poliadeniliranih molekula RNA. Unutar kapljica GEM dolazi do lize stanica, oslobađanja RNA te reverzne transkripcije (RT) u komplementarnu DNA (engl. *complementary DNA,* cDNA) i istovremeno se označavaju staničnim barkodom i oznakom UMI.

Nakon završetka RT-a, cDNA se nalazi unutar GEM-ova, odnosno emulzijskih kapljica koje sadrže uljnu i vodenu fazu. Kako bi se izolirala sintetizirana cDNA, GEM-ovi se najprije razbijaju dodatkom Recovery Agenta koji destabilizira emulziju i omogućuje odvajanje vodene faze od uljne. Vodena faza sadrži cDNA zajedno s ostacima reagensa, proteinima, enzimima i slobodnim početnicama. Pročišćavanje cDNA provodi se pomoću silika-obloženih magnetskih kuglica (Dynabeads MyOne SILANE). U prisutnosti odgovarajućeg pufera za pročišćavanje, cDNA se veže na površinu magnetskih kuglica, dok nečistoće ostaju u otopini. Nakon inkubacije, epruveta se postavlja na magnetski stalak, pri čemu se kuglice s vezanom cDNA privlače uz stijenku tube, a supernatant koji sadrži ostatke ulja, soli, enzima i drugih nečistoća se uklanja. Magnetske kuglice se zatim ispiru u puferu za pročišćavanje i etanolom kako bi se uklonili preostali kontaminanti i soli, dok cDNA ostaje adsorbirana na kuglicama. Nakon pranja

slijedi elucija dodavanjem vode ili pufera za eluciju pri niskoj ionskoj jakosti, čime se cDNA odvaja od silika površine i ponovno prelazi u otopinu. Tako dobivena pročišćena cDNA koristi se kao predložak za amplifikaciju PCR-om, tijekom koje se umnaža barkodirana cDNA nastala iz mRNA pojedinačnih stanica.

Kvaliteta i distribucija po veličini amplificirane cDNA procijenjene su pomoću uređaja Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, SAD) uz korištenje High Sensitivity čipa (Agilent Technologies, SAD), dok je kvantifikacija provedena softverom Agilent 2100 Expert Software (Agilent Technologies, SAD).

Iz amplificirane cDNA konstruirana je knjižnica pomoću 3' Gene Expression Dual Index Library (10x Genomics, SAD). Priprema knjižnice uključivala je fragmentaciju cDNA, popravak krajeva, ligaciju adapterskih sekvenci i ugradnju indeksnih oznaka (engl. *dual index*). Pojedinačne knjižnice sekvencirane su na platformi Illumina NovaSeq (Illumina, SAD), uz čitanja uparenih krajeva duljine 150 parova baza (engl. *150 bp paired-end reads*).

Sirove podatke sekvenciranja obradila je dr. sc. Paule Brayer iz grupe za bioinformatiku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Primarna obrada podataka, uključujući kontrolu kvalitete sekvenciranja, mapiranje na referentni genom, filtriranje niskokvalitetnih stanica, uklanjanje dvostrukih stanica, normalizacija, integracija uzoraka, klasterizacija i anotacija staničnih populacija provedena je primjenom alata Cell Ranger, Seurat i pripadajućih programskih paketa.

3.3.2. Obrada podataka sekvenciranja na razini jedne stanice

Kvaliteta sirovih očitanja provjerena je programom FastQC (v0.11.7) [131]. Sirova očitanja obrađena su programskim paketom Cell Ranger (v7.1.0) [132], koji uključuje obradu očitanja, njihovo poravnavanje s referentnim ljudskim genomom (GRCh38) pomoću programa STAR te izradu matrica broja UMI-ja po genu i stanici. Filtrirane matrice ekspresije gena dobivene standardnim postupkom obrade u programu Cell Ranger uvezene su u programski paket Seurat (v5.5.0) [133] te zasebno obrađene za svaki uzorak. Iz analize su isključene stanice s manje od 500 detektiranih gena, manje od 1000 UMI-ja ili udjelom mitohondrijskih transkripata od 10 % ili više. Dodatno su uklonjeni geni detektirani u manje od 10 stanica. Potencijalni stanični dubleti (engl. doublets) identificirani su i uklonjeni zasebno za svaki uzorak pomoću programskog paketa DoubletFinder (v2.0.6) gdje je ekspresija gena normalizirana funkcijom `NormalizeData` iz paketa Seurat, uz zadane parametre (logaritamska

normalizacija s faktorom skaliranja 10 000), nakon čega je odabrano 2000 gena s najvećom varijabilnošću ekspresije.

Nakon kontrole kvalitete i uklanjanja dubleta, ekspresija gena normalizirana je zasebno za svaki uzorak metodom SCTransform (sctransform v0.4.3; `vst.flavor = "v2"`) [134,135]. Metoda korigira utjecaj dubine sekvenciranja na ekspresiju gena primjenom regulariziranog modela negativne binomne regresije na broj UMI-ja po genu i stanici. Tijekom normalizacije odabrano je 3000 gena s najvećom varijabilnošću ekspresije, a njihovi Pearsonovi reziduali korišteni su za analizu glavnih komponenata (engl. principal component analysis, PCA), pri čemu je zadržano 35 glavnih komponenata.

Radi smanjenja tehničkih razlika među uzorcima provedena je integracija metodom Harmony, koristeći prvih 35 glavnih komponenata dobivenih analizom podataka normaliziranih metodom SCTransform. Dobiveni integrirani podatci korišteni su za daljnje grupiranje stanica i vizualizaciju. Budući da je normalizacija metodom SCTransform provedena zasebno za svaki uzorak, a uzorci dijagnoze i recidiva razlikovali su se prema dubini sekvenciranja, korigirani brojevi UMI-ja ponovno su izračunati na zajedničkoj dubini sekvenciranja pomoću funkcije `PrepSCTFindMarkers` prije analize diferencijalne ekspresije gena. Grupiranje stanica provedeno je na temelju prvih 20 dimenzija integrirane reprezentacije dobivene metodom Harmony. Graf najbližih susjeda konstruiran je funkcijom `FindNeighbors`, nakon čega su stanični klasteri identificirani funkcijom `FindClusters`, uz parametar razlučivosti 0,4. Ukupno je identificirano sedam klastera. Za dvodimenzionalnu vizualizaciju identificiranih klastera primijenjena je metoda t-SNE (engl. *t-distributed stochastic neighbor embedding*). Radi procjene razlika u staničnom sastavu između dijagnoze i recidiva, udio stanica pojedinog klastera izračunat je zasebno za svaki uzorak kao omjer broja stanica pripadajućeg klastera i ukupnog broja stanica u uzorku. Faza staničnog ciklusa određena je za svaku stanicu funkcijom `CellCycleScoring` iz paketa Seurat, primijenjenom na podatke normalizirane metodom SCTransform. Pritom su korišteni referentni skupovi gena karakterističnih za S-fazu i G2/M-fazu staničnog ciklusa dostupni u paketu Seurat. Stanice su svrstane u S-fazu ili G2/M-fazu prema višoj vrijednosti pripadajućeg rezultata, odnosno u G1-fazu ako su oba rezultata bila negativna. Potom je za svaki klaster izračunat udio stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa.

Geni, diferencijalno eksprimirani u pojedinom klasteru u odnosu na sve preostale klastere, identificirani su funkcijom `FindAllMarkers` na podacima ekspresije korigiranima metodom SCTransform, nakon primjene funkcije `PrepSCTFindMarkers`. Svaki je klaster uspoređen sa svim preostalim stanicama dvostranim Wilcoxonovim testom sume rangova, uz

korekciju P-vrijednosti Bonferronijevom metodom radi višestrukog testiranja. Analiza je ograničena na gene s minimalnom vrijednošću log2 omjera promjene ekspresije od 0,25 u korist promatranog klastera (`logfc.threshold = 0.25`) i ekspresijom u najmanje 15 % stanica barem jedne od uspoređivanih skupina (`min.pct = 0.15`), pri čemu su zadržani samo geni s povišenom ekspresijom u promatranom klasteru (`only.pos = TRUE`). Dodatni kriterij filtriranja zahtijevao je da udio stanica u kojima je gen detektiran bude najmanje 10 postotnih bodova veći u promatranom klasteru nego u svim preostalim stanicama. Za svaki klaster odabrano je šest gena s najnižim P-vrijednostima koji su zadovoljavali navedene kriterije. Njihova ekspresija prikazana je toplinskom kartom, pri čemu boja označava prosječnu ekspresiju korigiranu metodom SCTransform za pojedini klaster, standardiziranu u z-vrijednosti zasebno za svaki gen. Raspodjele ekspresije odabranih gena prikazane su violinskim dijagramima logaritamski transformiranih vrijednosti broja UMI-ja korigiranih metodom SCTransform (log[1 + korigirani broj UMI-ja]). Unutar violinskih dijagrama prikazani su kutijasti dijagrami, pri čemu kutija označava interkvartilni raspon, a vodoravna linija medijan. Razlike u ekspresiji između dijagnoze i recidiva ispitane su funkcijom `FindMarkers` iz paketa Seurat, primjenom prethodno opisanog statističkog testa i metode korekcije P-vrijednosti. Analiza je obuhvatila svih 22 776 gena iz analitičkog sloja SCTransform i sve stanice obaju uzoraka preostale nakon filtriranja, bez prethodnog ograničavanja prema veličini promjene ekspresije ili udjelu stanica s detektiranom ekspresijom. Statistička značajnost označena je na sljedeći način: `*` $p \leq 0{,}05$, `**` $p \leq 0{,}01$, `***` $p \leq 0{,}001$, `****` $p \leq 0{,}0001$ i ns (statistički neznačajno; $p > 0{,}05$).

3.3.3. Kontrola kvalitete stanica i analiza transkriptoma

Nakon provedene kontrole kvalitete i uklanjanja stanica koje nisu zadovoljavale zadane kriterije, u daljnju analizu uključeno je ukupno 11 580 stanica, od čega 7 050 stanica iz uzorka prikupljenog pri uspostavi dijagnoze i 4 530 stanica iz uzorka prikupljenog pri povratu bolesti (Slika 20A).

Kvaliteta i kompleksnost transkriptoma pojedinačnih stanica procijenjena je korištenjem više standardnih analiza. Prva analiza, broj detektiranih gena po stanici (nGenes), prikazuje koliko je različitih gena eksprimirano u svakoj stanici. Veći broj gena ukazuje na bogatiji i potpuniji transkriptom stanice, dok manji broj može sugerirati tehnički ograničene ili oštećene stanice (Slika 20B).

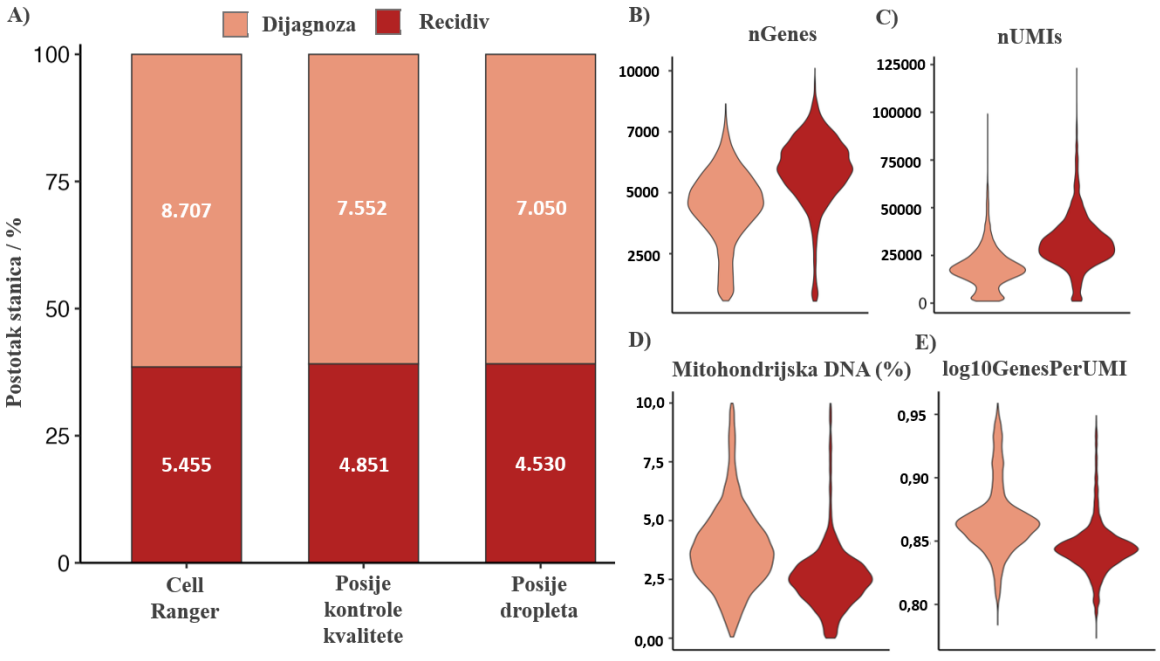
Druga analiza, broj UMI-ja po stanici, odražava ukupan broj originalnih molekula RNA detektiranih u svakoj stanici. UMI-jevi su kratke, jedinstvene nukleotidne oznake dodijeljene

svakoj molekuli RNA tijekom reverzne transkripcije. Zahvaljujući oznakama UMI, moguće je razlikovati stvarne molekule RNA od kopija nastalih tijekom amplifikacije PCR-om, čime se dobiva precizno kvantificiranje transkripata. Veći broj UMI-ja u stanici ukazuje na veću količinu RNA i aktivniji transkriptom (Slika 20C).

Treća analiza, udio mitohondrijskih gena, prikazuje omjer transkripata koji potječu iz mitohondrijske DNA u odnosu na ukupnu ekspresiju. Visoki udio mitohondrijskih gena često ukazuje na stres ili oštećenje stanica, dok niži udio odražava tehnički kvalitetnije ili zdravije stanice (Slika 20D).

Četvrta analiza, log10GenesPerUMI, mjeri kompleksnost transkriptoma stanice, odnosno koliko su detektirane molekule RNA raspoređene među različitim genima. Računa se kao omjer broja detektiranih gena i ukupnog broja UMI-ja po stanici, a zatim se primjenjuje logaritam. Visoka vrijednost log10GenesPerUMI ukazuje na raznolik transkriptom, gdje su molekule RNA raspoređene među velikim brojem gena, dok niska vrijednost sugerira da je većina molekula RNA koncentrirana u manjem broju gena. Ova analiza pomaže razlikovati stanice koje imaju sličan broj UMI-ja, ali različitu biološku raznolikost ekspresije (Slika 20E).

Visoka kvaliteta sekvenciranja, potvrđena ujednačenom distribucijom očitanja i visokom učinkovitošću mapiranja na referentni genom, osigurala je pouzdanu osnovu za analizu diferencijalne genske ekspresije i identifikaciju biološki relevantnih signalnih programa.



Slika 20. Prikaz kontrole kvalitete podataka dobivenih scRNA-seq analizom. A) Ukupni broj i postotak stanica

prije i poslije analize kvalitete nakon primjene filtera stanica koje imaju manje od 350 eksprimiranih gena i potencijalnih spojenih stanica (doublet). Zatim slijedi prikaz parametara kontrole kvalitete nakon analize. B) Broj detektiranih gena po stanici, C) broj UMI-ja po stanici koji prezentira broj originalnih molekula RNA u stanici, D) udio mitohondrijskih gena, E) mjera kompleksnosti transkriptoma odnosno kako su molekule RNA raspoređene obzirom na gene. Analizu je provela dr. sc. Paula Brayer.

3.4. Analiza morfoloških karakteristika tumorskih matičnih stanica tijekom progresije bolesti

3.4.1. Gravimetrijska analiza tumorskih sferoida

Praćenje masene gustoće, težine i promjera tumorskih sferoida provedeno je korištenjem uređaja W8® (CellDynamics, Italija), koji omogućuje preciznu i neinvazivnu karakterizaciju tumorskih sferoida temeljem analize slobodnog pada.

Prva generacija TMS nasađena je u restriktivnim uvjetima sa ciljem generiranja sferoida. Sferoidi su generirani deset dana tijekom kojih su se svaki drugi dan dodavali faktori rasta FGF-2 i EGF. Po završetku inkubacije, sferoidi su izolirani pomoću staničnog sita radi uklanjanja ostataka metilceluloze i slobodnih stanica. Fiksacija je provedena dodatkom 1 mL 4 % paraformaldehida (PFA) pripremljenog u PBS-u bez Ca^{2+} i Mg^{2+}, nakon čega su sferoidi nježno resuspendirani i inkubirani preko noći na 4 °C u mraku. Sljedećeg dana, uzorci su centrifugirani pri 800 rpm (99 x g rcf-a) tijekom 5 minuta, supernatant je pažljivo uklonjen, ostavljajući približno 100 µL tekućine. Uzorci su potom dvaput isprani PBS-om i ponovno centrifugirani. Nakon završnog uklanjanja supernatanta, sferoidi su resuspendirani u 2 mL PBS-a i epruveta je prenesena u analitički sustav W8®. Iz epruvete se sferoidna suspenzija uvodi u mikrofluidički kanal uređaja, gdje prolazi kroz tekućinu poznate gustoće i viskoznosti. Svaki sferoid pojedinačno se detektira i tijekom slobodnog pada, uređaj bilježi kinetičke parametre kretanja sferoida, uključujući krajnju brzinu pada, koja se koristi za izračun mase svakog sferoida temeljem Stokesovog zakona [136,137]. Paralelno, sferoidi se snimaju kamerom za svjetlosnu mikroskopiju, što omogućava mjerenje promjera, volumena i geometrijskih parametara svakog pojedinačnog sferoida. Softver sustava automatski obrađuje prikupljene podatke i računa masenu gustoću kao omjer mase i volumena.

3.4.2. Holografsko snimanje adherentnih tumorskih matičnih stanica

Morfologija adherentne stanične kulture prve generacije tumorksih matičnih stanica analizirana je pomoću uređaja HoloMonitor® Live Cell Imaging System (Phase Holographic Imaging PHI AB, Švedska). Ovaj uređaj omogućuje analizu živih, neoznačenih stanica u stvarnom vremenu. Za kultivaciju su korištene adhezivne pločice sa 6 jažica (Sarstedt, Njemačka), opremljene poklopcem HoloLid koji minimizira smetnje u snimanju uzrokovane vibracijama površine i kondenzacijom. Stanice su kultivirane u kompletnom mediju DMEM/F-12 te su nasađene u 10 % konfluentnosti, ostavljene preko noći da adheriraju za podlogu. Tijekom sljedećih 48 sati provelo se snimanje stanica u frekvenciji svakih 30 minuta. Dobiveni podaci obrađeni su u pripadajućem softveru *AppSuite* (Phase Holographic Imaging PHI AB, Švedska). Analiza je uključivala optičku debljinu, nepravilnost oblika i duljinu opsega, za svaki uzorak. Analiza morfologije stanica provedena je na šest unaprijed određenih točaka, pri čemu su za svaki uzorak analizirana tri neovisna biološka replikata. Adherentna kultura stanica snimana je tijekom 48 sati, pri čemu je generirano ukupno 228 sličica po replikatu. Za morfološku analizu odabrana je svaka dvanaesta sličica, čime je analizirano ukupno 19 sličica po replikatu. Na taj su način za svaki uzorak dobiveni podaci iz tri neovisna replikata, uz ravnomjerno raspoređene vremenske točke tijekom 48 sati perioda.

3.5. Funkcionalna karakterizacija tumorskih matičnih stanica tijekom progresije bolesti

3.5.1. Analiza potencijala inicijacije tumora testom formiranja sferoida

Zastupljenost tumorskih matičnih stanica u uzorcima procijenjena je pomoću testa formiranja sferoida. Tumorske matične stanice prve generaciju su nasađene u koncentraciji od 10 stanica/µL u volumenu od 200 µL po jažici u niskoprijanjajuće pločice sa 96 jažica. Kultivacija je provedena tijekom 7 dana, pri 37 °C i 5 % CO_2. Nakon završetka inkubacije, formirani sferoidi su promatrani i kvantificirani pomoću invertnog mikroskopa (Zeiss Axiovert 40CFL, Njemačka). Broj sferoida je prebrojan, a postotak tumorskih matičnih stanica u uzorku izračunat je prema odgovarajućoj formuli, uzimajući u obzir početnu gustoću stanica i broj formiranih sferoida. Dobiveni postotak odražava zastupljenost tumorskih matičnih stanica u uzorku, koja je proporcionalna njihovom potencijalu za inicijaciju tumora. Kao sferoidi su u obzir uzimani agregati koji su sadržavali više od četiri stanice.

$$\text{SFE (}\textit{spheroid formation efficiency \%}\text{)} = \frac{\text{ukupni broj formiranih sferoida}}{\text{ukupni broj nasađenih stanica}}\ x\ 100$$

3.5.2. Analiza migratorne sposobnosti stanica testom zacjeljivanja rane

Za procjenu metastatskog potencijala stanica proveden je test stanične migracije, poznat i kao test zacijeljivanja rane. Prva generacija tumorskih matičnih stanica je nasađena u pločice sa 6 jažica (Sarstedt, Njemačka) opremljene poklopcem HoloLid, u kompletnom mediju DMEM/F-12. Nakon što su stanice dosegle približno 80 – 90 % konfluentnosti, na adhezivnom sloju stanica napravljena je umjetna rane pomoću pipetnog nastavka (10 µL). Stanice su potom isprane PBS-om, a medij je zamijenjen medijem DMEM/F-12 bez seruma, kako bi se inhibirala proliferacija i omogućilo praćenje isključivo migracije stanica. Migracija stanica je praćena uređajem HoloMonitor® Live Cell Imaging System. Uređaj je dovoljno kompaktan za smještaj unutar inkubatora, čime se tijekom mikroskopiranja izbjeglo izlaganje stanica temperaturnim promjenama. Stanice su snimane svaka tri sata tijekom 48 sati. Za svaki stadij bolesti promatrana su tri replikata, odnosno tri različita vidna polja, pri čemu je za svaki replikat analizirano 17 snimaka tj. svaka 12. snimka. Za kvantitativnu analizu migracije korišten je pripadajući softver *App Suite* u skladu s uputama proizvođača [138]. Modul *Cell Migration* omogućio je automatizirano praćenje kretanja stanica i kvantitativnu analizu migracijskih parametara.

3.5.3. Imunocitokemijska detekcija markera epitelno-mezenhimske tranzicije

Imunofluorescencijska analiza proteina N-kadherina, integrina β1 i MMP-2 provedena jena prvoj generaciji tumorskih matičnih stanica. Sterilne mstaklene lamele promjera 1.1–1.2 cm postavljene su u pločice s 24 jažica, a na njih su nasađene stanice u gustoći 20,000 stanica u 400 µL dovoljno za stvaranje konfluentnog jednosloja i inkubirane preko noći na 37 °C i 5 % CO_2 kako bi se pričvrstile na podlogu. Prije fiksacije, stanice su jednom isprane PBS-om i dvaput puferom za ispiranje (1 × EnVision FLEX Wash Buffer, Agilent Technologies, SAD), a potom su ostavljene da se osuše na zraku 15 minuta. Fiksacija je provedena izlaganjem parama 10 %-tnog formalina tijekom 15 minuta u digestoru, nakon čega su stanice ponovno isprane puferom za ispiranje. Slijedilo je blokiranje nespecifičnih mjesta vezanja pomoću otopine 1 % BSA i 0,05 % Triton X-100 u PBS-u, 10 minuta na sobnoj temperaturi, uz dvostruko ispiranje puferom nakon blokiranja. Primarna antitijela razrijeđena su u blokirajućem puferu i stavljena na lamele u volumenu od 100 µL po jažici. Korištena su sljedeća primarna antitijela: mišje anti-N-kadherin (klon 13A9, razrijeđenje 1:1000) (kat.br.

#14215, lot. 4, Cell Signaling Technology, SAD), mišji anti-integrin β1 (klon 12G10, razrijeđenej 1:300) (kat.br. #53550, lot. 1, Cell Signaling Technology, SAD) te kunićje anti-MMP-2 (klon E6S9L, razrijeđenje 1:500) (kat.br. #69789, lot. 1, Cell Signaling Technology, SAD). Stanice su inkubirane s primarnim antitijelom preko noći na 4 °C u mraku. Nakon inkubacije, primarna antitijela su uklonjena i lamele su dvaput isprane puferom za ispiranje. Sekundarna antitijela razrijeđena su u MiliQ vodi. Za N-kadherin i integrin β1 korišteno je kozje anti-miš antitijelo obilježeno Alexa Fluor 488 (1:1000) (kat.br. #CST-89853S, Cell Signaling Technology, SAD) . Za MMP-2 korišteno je kozje anti-kunić antitijelo obilježeno FITC-om (1:1000) (kat.br. #CST-39572S, Cell Signaling Technology, SAD). Stanice su se inkubirale 45 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon dvostrukog ispiranja puferom za ispiranje, lamele su postavljene na adhezivna predmetna stakalca (VitroGnost Plus Ultra, BioGnost, Hrvatska) uz 10 μL medija za pričvršćivanje s DAPI-jem ($1:10^6$). Fluorescencijska analiza provedena je 30 minuta nakon, pomoću fluorescencijskog mikroskopa Nikon Eclipse T*i*2 (Japan), a snimke su obrađene u pripadajućem softveru NIS-Elements.

3.6. Karakterizacija mehanizama replikacijeske besmrtnosti tumorskih matičnih stanica

3.6.1. Određivanje ekspresije gena *hTERT* metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze s reverznom transkripcijom u stvarnom vremenu

Ekspresija gena ljudske reverzne telomerazne transkriptaze hTERT analizirana je u prvoj generaciji TMS osteosarkoma, pri čemu je stanična linija U2OS korištena kao negativna kontrola. Stanice su kultivirane u standardnim uvjetima, nakon čega je izolirana ukupna RNA svakog uzorka. Izolacija RNA provedena je pomoću kompleta kemikalija Quick DNA/RNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research, SAD), prema uputama proizvođača. Stanice su prvo homogenizirane u puferu za lizu koji stabilizira RNA, a zatim su nukleinske kiseline vezane na silika membranu kolone miniprep u prisutnosti vezujućeg pufera. Višestrukim ispiranjem u puferu za ispiranje uklonjene su proteini i druge nečistoće, a čista RNA eluirana je puferom za eluiranje. Za uklanjanje eventualne prisutne DNA iz izolirane RNA, uzorci su tretirani DNase I, RNase-free (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača. Prije tretmana

određena je koncentracija RNA pomoću spektorfotometra Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, SAD). Nakon inkubacije, reakcija je zaustavljena dodavanjem EDTA, a pročišćeni uzorci RNA korišteni su za sintezu cDNA.

Sinteza cDNA provedena je pomoću kompleta kemikalija iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, SAD) prema uputama proizvođača. Za svaki uzorak napravljena je i kontrola NRT (engl. *non-reverse transcriptase,* NRT). Reakcija se odvijala na instrumentu CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, SAD), a gotovi uzorci cDNA pohranjeni su na -20 °C za analizu qPCR. Analiza qPCR provedena je korištenjem specifičnih početnica za hTERT: uzvodna početnica (F) 5' – GCCGATTGTGAACATGGACTACG – 3', nizvodna početnica (R) 5' -GCTCGTAGTTGAGCACGCTGAA – 3' [139], pri čemu je β-aktin s početnicama: uzvodna početnica (F) - 5´ GACGACATGGAGAAAATCTG 3´ i nizvodna početnica (R) - 5´ATGATCTGGGTCATCTTCTC 3´ korišten kao endogena kontrola za normalizaciju. Amplifikacija je provedena pod sljedećim uvjetima: incijalna denaturacija na 50 °C 2 min, 95 °C 10 min; zatim 40 ciklusa ponavljajućih koraka 95 °C 15 sek, 60 °C 1 min. Relativne razine ekspresije *hTERT* izračunate su pomoću metode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ i prikazane kao postotak u odnosu na ekspresiju u staničnoj liniji HeLa, koja je služila kao pozitivna kontrola.

3.6.2. Određivanje relativne duljine telomera metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu

Izolacija DNA provedena je pomoću Quick DNA/RNA Miniprep Plus seta kemikalija (Zymo Research, SAD) prema uputama proizvođača [140]. Talog stanica najprije je resuspendiran u puferu DNA/RNA Shield i PBS-u kako bi se stabilizirale nukleinske kiseline i omogućila učinkovita priprema uzorka za lizu stanica. Nakon homogenizacije uzorci su preneseni na kolone Spin-Away Filter radi uklanjanja staničnih ostataka i nečistoća. Filtrat dobiven nakon centrifugiranja korišten je paralelno za izolaciju RNA. Za izolaciju DNA filtratu je dodan Genomic Lysis Buffer kako bi se omogućila potpuna liza stanica i oslobađanje genomske DNA. Nakon toga, uzorku je dodan DNA Prep Buffer, čime su osigurani optimalni uvjeti za vezanje DNA na silikonsku membranu kolone Zymo-Spin™. Uzorci su potom centrifugirani, a vezana DNA pročišćena je višestrukim ispiranjem pomoću pufera za ispiranje DNA kako bi se uklonili proteini, lipidi, soli i ostali potencijalni inhibitori enzimski posredovanih reakcija. Nakon završnog koraka ispiranja provedeno je dodatno centrifugiranje radi uklanjanja ostataka pufera za ispiranje. Pročišćena genomska DNA eluirana je dodatkom pufera za DNA eluciju. Dobiveni uzorci DNA pohranjeni su na -20 °C za daljnju analizu.

Relativna duljina telomera određena je qPCR prema protokolu koji je opisao Cawthon (2002), uz manje prilagodbe. Nakon izolacije genomske DNA, koncentracija i čistoća određene su spektrofotometrijski pomoću uređaja NanoDrop ND-1000. Amplifikacija telomernih ponavljanja provedena je pomoću HPLC-pročišćenih specifičnih početnica: TEL – F 5´-CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT-3´ i TEL – R 5´-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3´. Kao referentni gen s jednom kopijom po haploidnom genomu korišten je gen *IFNB1*, uz početnice: IFNB1–F 5´-GGTTACCTCCGAAACTGAAGA-3´ i IFNB1–R 5´-CCTTTCATATGCAGTACATTAGCC-3´. qPCR reakcija provedena je primjenom boje SYBR Green (BioRad, SAD) na uređaju CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System prema sljedećim uvjetima: početna aktivacija polimeraze pri 98 °C tijekom 2 minute, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa denaturacije pri 98 °C tijekom 15 sekundi te prijanjanja početnica i sinteze DNA pri 60 °C tijekom 1 minute. Nakon završetka amplifikacije provedena je analiza krivulje taljenja u temperaturnom rasponu od 65 do 95 °C, uz povećanje temperature od 0,5 °C svakih 5 sekundi.

Količina telomerne DNA (T) i referentnog gena (S) određena je na temelju vrijednosti praga ciklusa amplifikacije (Ct). Najprije je izračunata razlika Ct vrijednosti telomerne i referentne reakcije ($\Delta Ct = Ct(T) – Ct(S)$), a zatim razlika između ΔCt vrijednosti analiziranog uzorka i referentnog uzorka HeLa stanične linije ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ uzorak $- \Delta Ct$ HeLa). Relativni omjer telomerne i referentne DNA (T/S) izračunat je prema formuli $2^{-\Delta\Delta Ct}$, pri čemu je stanična linija HeLa korištena kao kalibracijski uzorak za normalizaciju dobivenih vrijednosti. Svi eksperimenti provedeni su u tri tehnička ponavljanja, a za izračun su korištene srednje vrijednosti Ct dobivene iz ponovljenih mjerenja.

3.6.3. Imunocitokemijska detekcija tijela promijelocitne leukemije povezanih s alternativnim produljenjem telomera

Imunofluorescencijska analiza proteina PML provedena je na prvoj generaciji tumorskih matičnih stanica prema protokolu opisanom u poglavlju 3.5.3. uz korištenje primarnog antitijela: monoklonsko kunićje antitijelo za ljudski PML (klon E6S9L, razrijeđenje 1:500) (kat.br. 69789, Cell Signaling Technology, Inc., SAD) pripremljenog u otopini 1 % BSA i 0,05 % Triton u PBS-u. Stanice su inkubirane s primarnim antitijelom prek noći na 4ºC u mraku. Sekundarno antitijelo razrijeđeno je u MiliQ vodi. Za PML detekciju korišteno je sekundarno monoklonsko kozje anti-kunić antitijelo obilježeno bojom FITC (omjer 1 : 1000) (kat.br. #CST-39572S, Cell Signaling Technology, SAD). Stanice su se inkubirale 45 minuta

na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon dvostrukog ispiranja puferom za ispiranje, lamele su postavljene na adhezivna predmetna stakalca (VitroGnost Plus Ultra, BioGnost, Hrvatska) uz 10 μL medija za pričvršćivanje s DAPI-jem (1:106). Fluorescencijska analiza provedena je 30 minuta nakon, pomoću fluorescencijskog mikroskopa Nikon Eclipse Ti2 (Japan), a snimke su obrađene u pripadajućem softveru NIS-Elements.

3.7. Ispitivanje rezistencije na kemoterapeutike u tumorskim matičnim stanicama i tumorskim sferoidima

Otpornost tumorskih stanica na kemoterapijske lijekove ispitana je na prvoj generaciji TMS i na sferoidima generiranim iz tih stanica kako bi se usporedile stanice iz različitih stadija bolesti.

Vijabilnost TMS određena je primjenom kolorimetrijskog testa temeljenog na redukciji tetrazolijeve soli MTT-a (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid), koji mjeri metaboličku aktivnost živih stanica. Stanice su nasađene u adherentne pločice sa 96 jažica u kompletnom mediju DMEM/F-12. Nakon 24 sata inkubacije na 37 °C i 5 % CO_2, stanice su tretirane kemoterapijskim lijekovima u tri tehnička ponavljanja. Primjenjene su rastuće koncentracije cisplatine (Merck, Njemačka) i doksorubicina (Sigma-Aldrich, SAD) 0, 0,1, 1, 10, 50 i 100 μM te metotreksata (Zentiva, Češka) 0, 0,1, 1, 10, 100 i 1000 μM. Nakon 72 sata inkubacije s tretmanima, dodan je reagens MTT volumena 40uL prethodno pripremljen u mediju. Nakon inkubacije od 3 sata u svaku jažicu je dodan DMSO volumena 170 uL kako bi se otopili formirani kristali formazana. Apsorbancija je izmjerena spektrofotometrijski na uređaju Glomax (Promega, USA) pri valnoj duljini od 560 nm, a relativna vijabilnost stanica izražena je kao postotak u odnosu na netretiranu kontrolu.

Vijabilnost tumorskih sferoida određena je korištenjem kompleta kemikalija CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega, SAD), koji kvantificira razinu ATP-a kao pokazatelja metabolički aktivnih stanica. Stanice su nasađene u neprozirne pločice s 96 jažica (Greiner Bio-One, Njemačka) koje ne podržavaju prijanjanje stanica. Stanice su nasađene u ukupnom volumenu od 200 μL po jažici, koji se sastojao od 100 μL 2 % metilceluloze (Sigma-Aldrich, SAD) i 100 μL stanične suspenzije u mediju DMEM/F-12 za uzgoj sferoida. Stanice su nasađene u koncentraciji od 2500 stanica/200 μL i inkubirane tijekom 72 sata radi formiranja sferoida. Nakon formiranja sferoida, uzorci su tretirani kemoterapijskim lijekovima u tri tehnička ponavljanja u koncentracijama 50 i 100 μM za cisplatin i doksorubicin te za

metotreksat 1000 i 1500 µM. Za svaki tretman provedena je i slijepa kontrola u duplikatu. Nakon završetka inkubacije s lijekovima, u svaku jažicu dodan je reagens CellTiter-Glo 3D (Promega, SAD) prema uputama proizvođača [141] uz mehaničko miješanje radi potpune lize sferoida i stabilizacije luminescentnog signala. Luminescencija je izmjerena pomoću mikrotitarskog luminometra VICTOR Nivo (PerkinElmer, SAD), a dobiveni rezultati normalizirani su u odnosu na negativnu kontrolu, uzorke koji nisu bili podvrgnuti tretmanu.

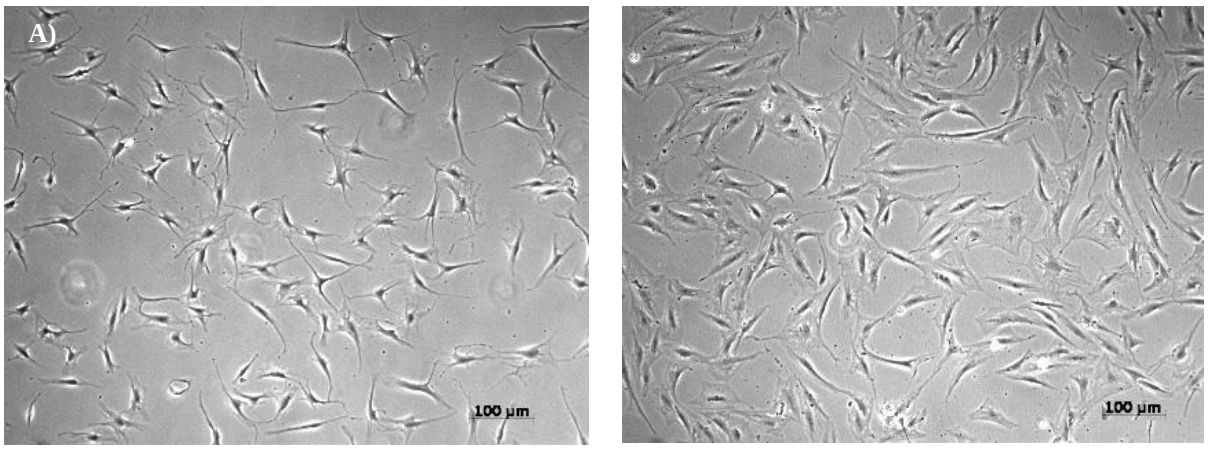
3.8. Statistička obrada rezultata

Za usporedbu dviju nezavisnih skupina, kod varijabli s normalnom distribucijom podataka primijenjen je Studentov t-test za nezavisne uzorke, dok je za varijable koje nisu zadovoljavale pretpostavku normalnosti distribucije korišten neparametrijski Mann-Whitneyev U-test. Razlike između više skupina u odnosu na kontrolnu skupinu analizirane su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA), a za utvrđivanje statistički značajnih razlika između pojedinih skupina primijenjen je Tukeyjev HSD post hoc test. Za analizu diferencijalne ekspresije gena dobivenih sekvenciranjem RNA korišten je dvostrani Wilcoxonov test sume rangova, uz Bonferronijevu korekciju P-vrijednosti radi višestrukog testiranja. Detaljan opis statističke obrade podataka dobivenih sekvenciranjem RNA naveden je u poglavlju 4.3. Statistička značajnost određena je na razini $P \leq 0,05$. Statistička analiza i vizualizacija podataka provedene su pomoću programa RStudio (ver. 2025.05.1+513), uz primjenu programskog paketa ggplot2 (ver. 3.5.2), te programa Microsoft Office *Excel* (ver. 2506).

4. REZULTATI

4.1. Promjene u zastupljenosti staničnih subpopulacija i transkriptomskih obilježja tijekom progresije osteosarkoma

Iz prikupljenih uzoraka tumorskog tkiva mladog pacijenta oboljelog od osteosarkoma, enzimskom digestijom, uspješno su uspostavljene parentalne stanične kulture iz uzorka dobivenog pri uspostavi dijagnoze i uzorka recidiva osteosarkoma (Slika 21A-B). Nakon postupka izolacije dobivena je heterogena populacija primarnih tumorskih stanica, koja je potom korištena za analizu transkriptoma na razini pojedinačne stanice.



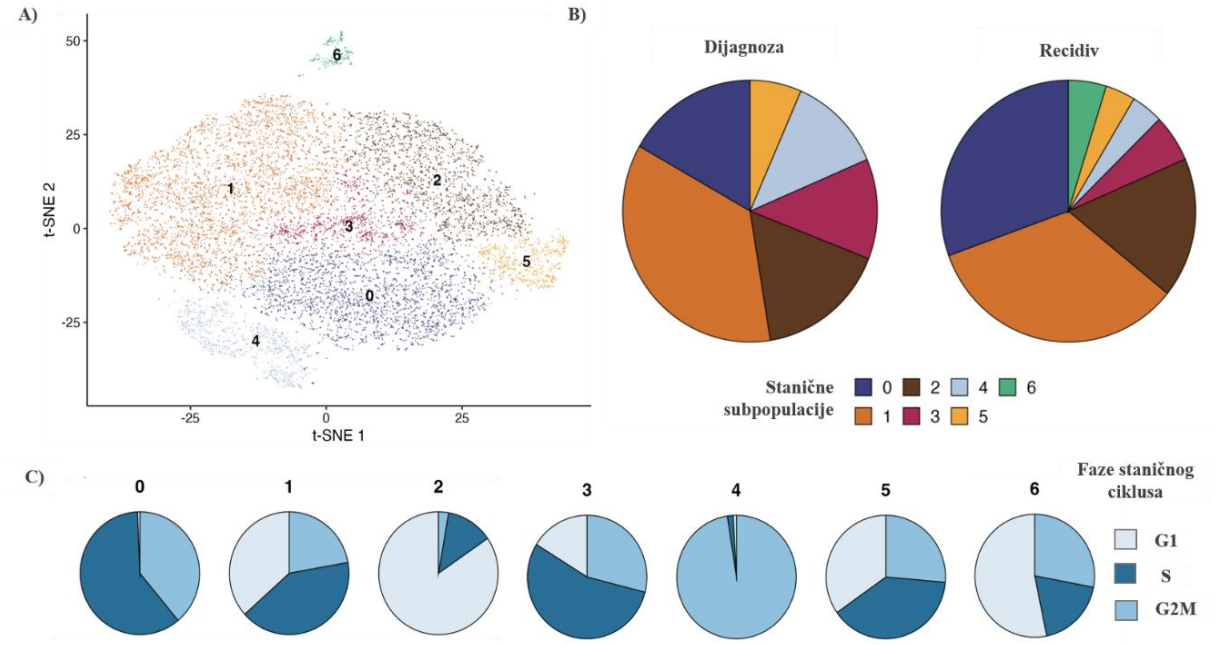
Slika 21. **Parentalne stanične kulture osteosarkoma.** Uspostavljene su iz tumorskog tkiva pacijenta u dvije kliničke faze bolesti A) pri uspostavi dijagnoze i B) resekcija nakon recidiva. Stanice su vizualizirane pomoću invertnog mikroskopa Axiovert 40 CFL (Zeiss, Njemačka) pri povećanju objektiva od 5x, uz mjernu skalu od 100 µm.

4.1.1. Transkriptomska obilježja subpopulacije 6 upućuju na fenotip tumorskih matičnih stanica

Analiza transkriptoma na razini pojedinačne stanice omogućila je detaljno razotkrivanje kompleksne arhitekture osteosarkoma, pružajući uvid u sastav tumorskih subpopulacija, njihovu funkcionalnu heterogenost te molekularne promjene povezane s progresijom bolesti i pojavom recidiva.

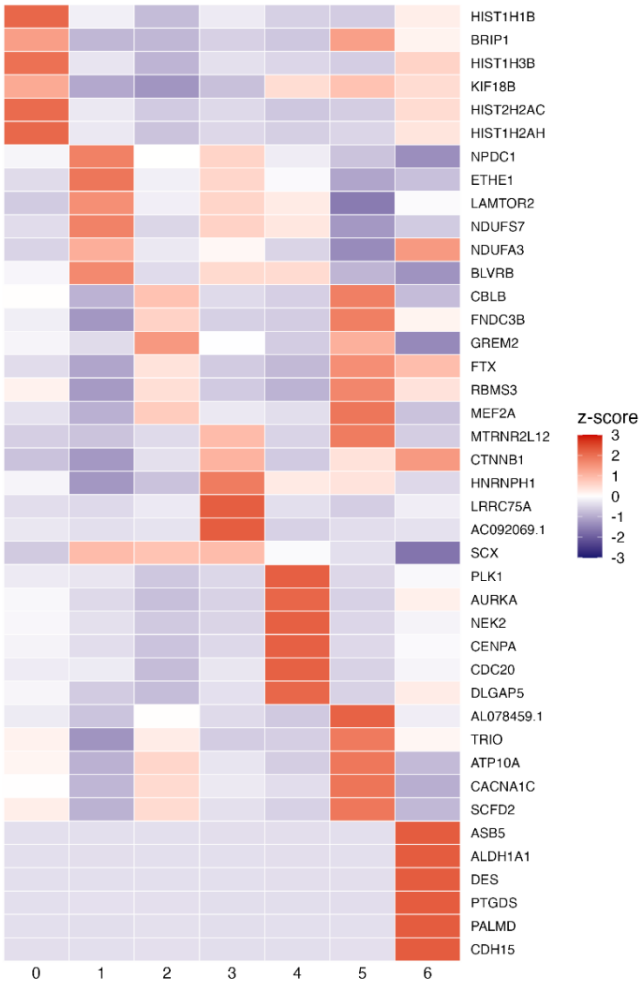
Analizom transkriptoma na razini jedne stanice izdvojeno je sedam transkripcijski različitih staničnih subpopulacija (Slika 22A). Promjene u sastavu tumorske populacije kroz dvije faze bolesti prikazane su kao relativni udjeli pojedinih subpopulacija u ukupnom broju stanica, čime je omogućen uvid u dinamiku intratumorske heterogenosti (Slika 22B). Subpopulacije 0, 1 i 2 dominantno su zastupljene u oba stadija bolesti. U uzorku recidiva,

međutim, uočava se promjena u relativnoj zastupljenosti pojedinih subpopulacija te povećana stanična heterogenost. Posebno se izdvaja subpopulacija 6, koja nije zastupljena u primarnom tumoru, dok je u recidivu jasno prisutna. Ovakva promjena u strukturi staničnih populacija ukazuje na različitu staničnu organizaciju recidivnog tumora te može biti povezana s pojavom ili ekspanzijom specifičnih staničnih fenotipova tijekom progresije bolesti. Raspodjela stanica po fazama staničnog ciklusa dodatno naglašava funkcionalnu heterogenost identificiranih subpopulacija (Slika 22C). U subpopulacijama 0, 1 i 3 dominiraju stanice u fazi S staničnog ciklusa, dok u subpopulaciji 4 dominiraju stanice u fazi G2/M. U subpopulaciji 5 nije uočena jasna dominacija pojedine faze, već je raspodjela stanica između faze G1, S i G2/M relativno uravnotežena. Subpopulaciju 6 karakteriziraju stanice u fazi G1.



Slika 22. Subpopulacije stanica. A) Integracijom podataka dobivenih analizom stanica iz parentalnih staničnih kultura osteosarkoma uspostavljenih iz uzoraka uzetih pri dijagnozi i recidivu bolesti istog pacijenta identificirano je sedam glavnih staničnih subpopulacija (označenih brojevima 0–6). Subpopulacije su vizualizirane i razdvojene primjenom analize t-SNE na temelju razlika u transkripcijskim profilima stanica. B) Relativna zastupljenost pojedinih staničnih subpopulacija u uzorcima prikupljenima pri dijagnozi i recidivu bolesti. C) Raspodjela stanica osteosarkoma prema fazama staničnog ciklusa unutar sedam identificiranih staničnih subpopulacija. Analizu je provela dr. sc. Paula Brayer.

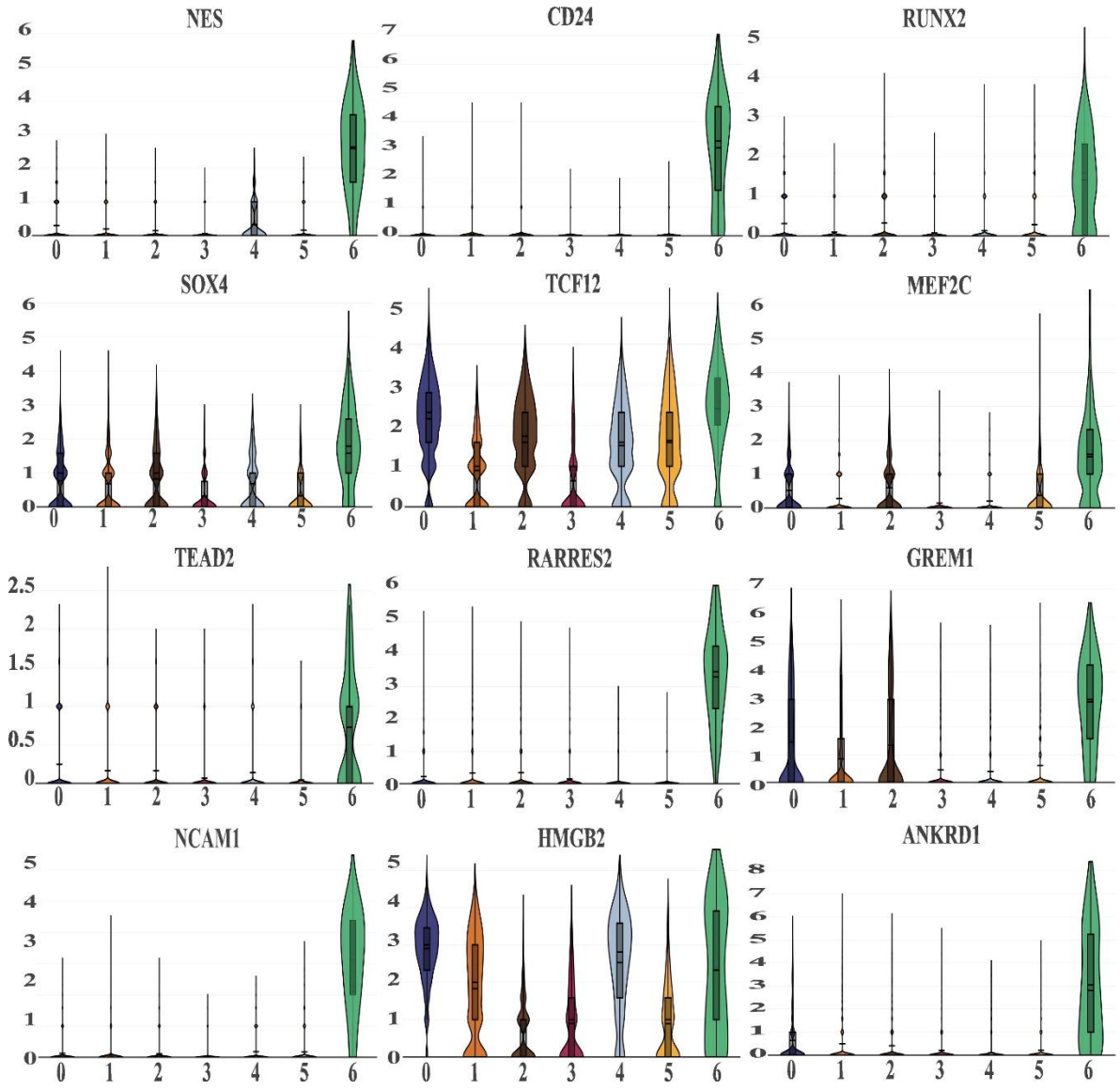
S obzirom na to da je subpopulacija 6 detektirana isključivo u uzorku recidiva, provedena je njezina detaljnija karakterizacija. Analiza diferencijalno eksprimiranih gena identificirala je skup gena koji najvjernije opisuju ovu subpopulaciju, među kojima se posebno ističu *ASB5*, *ALDH1A1*, *DES*, *PTGDS*, *PALMD*, *CDH15* (Slika 23).



Slika 23. Diferencijalna ekspresija gena koji karakteriziraju stanične populacije na razini transkriptoma. Toplinska mapa prikazuje ekspresiju karakterističnih gena za pojedine stanične subpopulacije, pri čemu svaki redak predstavlja gen, a svaki stupac staničnu subpopulaciju. Prikazane vrijednosti ekspresije prethodno su normalizirane radi omogućavanja usporedbe među subpopulacijama i smanjenja utjecaja tehničke varijabilnosti. Šest diferencijalno eksprimiranih gena za subpopulaciju 6 nalaze se u zadnjem stupcu na dnu prikaza. Analizu je provela dr. sc. Paula Brayer.

Dodatna analiza ekspresije ukazuje na povećanu zastupljenost nekoliko skupina molekularnih markera povezanih s fenotipom i održavanjem tumorskih matičnih stanica. Među njima se izdvajaju klasični markeri matičnosti, poput *NES* i *CD24*, kao i transkripcijski regulatori povezani s matičnim i osteogenim fenotipom, uključujući *RUNX2, SOX4, TCF12*, *MEF2C* i *TEAD2*. Uz navedene markere, uočena je izraženija zastupljenost nuklearnih i transkripcijskih regulatora, među kojima se *HMGB2* može izdvojiti kao kromatinski regulator, dok *ANKRD1* djeluje kao transkripcijski ko-regulator. Nadalje, identificirane su molekule povezane s održavanjem tumorskog mikrookoliša i niše tumorskih matičnih stanica te regulacijom

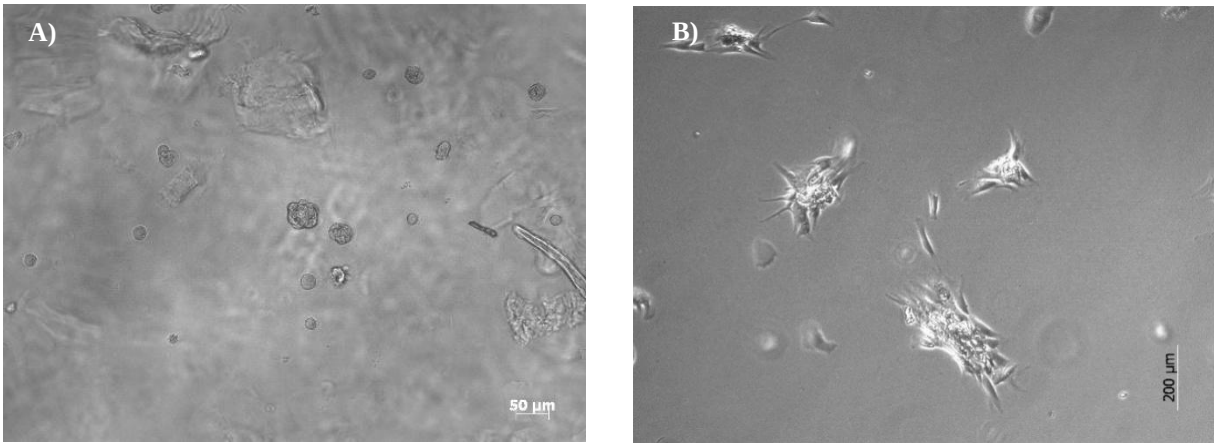
signalnih puteva, među kojima se izdvajaju *RARRES2* i *GREM1*, dok *NCAM1* pripada skupini membranskih molekula stanične adhezije (Slika 24).



Slika 24. Karakterizacija staničnih populacija na razini transkriptoma. B) Ekspresija gena povezanih s matičnosti prikazana kroz sedam identificiranih subpopulacija stanica. Violinski plotovi prikazuju klasične markere matičnosti (*NES, CD24*), transkripcijske regulatore matičnosti (*RUNX2, SOX4, TCF12, MEF2C, TEAD2*), nuklearnih i transkripcijskih regulatora (*HMGB2, ANKRD1*) te regulatore niša i signalnih puteva tumorskih maričnih stanica (*RARRES2, GREM1, NCAM1*). Violinski dijagrami prikazuju distribuciju ekspresije pojedinačnih gena u različitim subpopulacijama stanica, pri čemu širina oblika predstavlja gustoću stanica s određenom razinom ekspresije, a unutarnji okvir prikazuje medijan i raspon vrijednosti ekspresije. Vizualizacija je izrađena u softveru Loupe Browser (ver. 9.0.0.).

4.2. Morfološke promjene tumorskih matičnih stanica tijekom progresije osteosarkoma

Iz parentalne stanične kulture osteosarkoma TMS uspješno su obogaćene procesom generiranja sferoida (Slika 25A). Nakon izolacije, stanice su napustile trodimenzionalnu sferoidnu strukturu i adherirale na podlogu, čime je uspostavljena prva generacija TMS-a (Slika 25B). Dobiveni stanični model omogućio je daljnju karakterizaciju biofizičkih i morfoloških svojstava stanica, kao i analizu njihove genske ekspresije, s ciljem utvrđivanja razlika između stanica dobivenih iz uzoraka pri dijagnozi i recidivu bolesti.



Slika 25. Izolirane tumorske matične stanice. A) Tumorski sferoidi generirani su iz pojedinačne stanične suspenzije parentalne kulture u svrhu obogaćivanja populacije tumorskih matičnih stanica. B) Prva generacija tumorskih matičnih stanica. Prihvaćanje tumorskih sferoida za adhezivne kultivacijske podloge i spontani izlazak tumorskih matičnih stanica iz sferoidne konformacije. Vizualizirane pomoću invertnog mikroskopa Axiovert 40 CFL (Zeiss, Njemačka) pri povećanju objektiva od 5× i 20×, uz mjernu skalu od 50 i 200 µm.

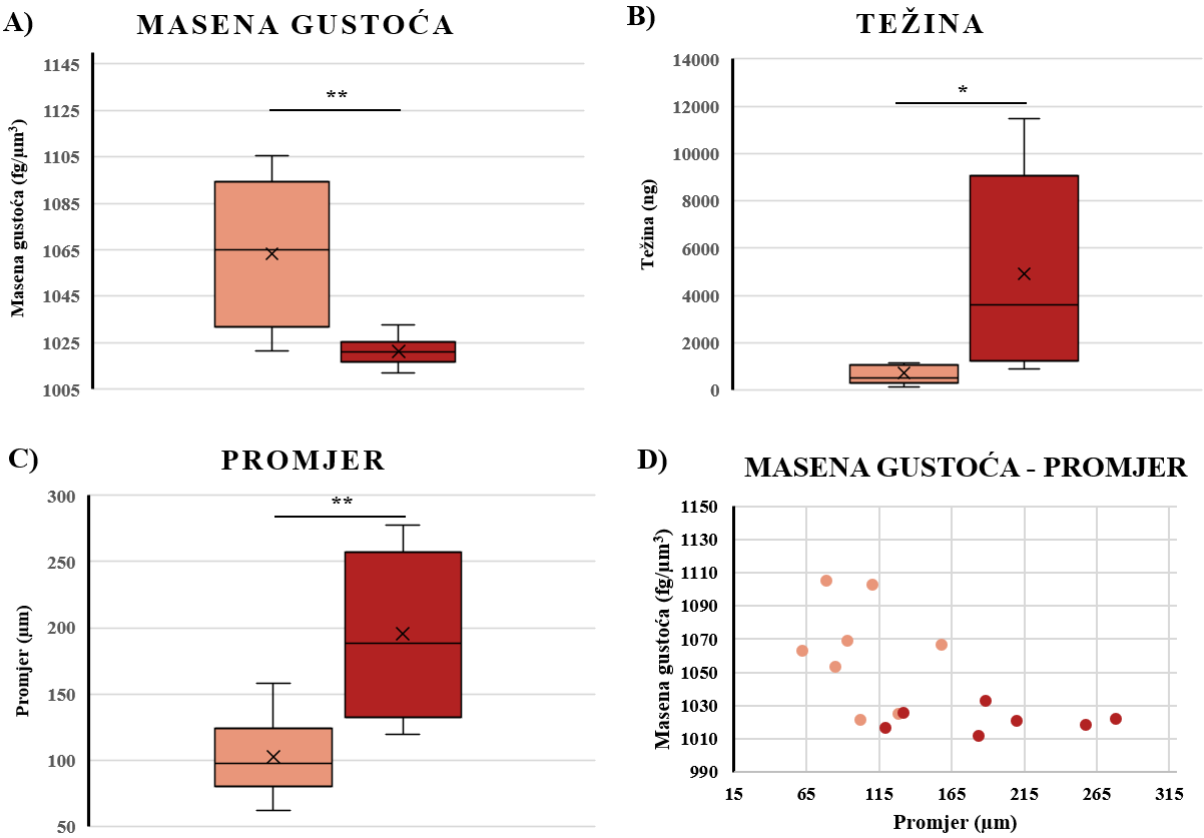
4.2.1. Promijenjenja biofizička karakterizacija tumorskih sferoida tijekom progresije bolesti

Biofizička analiza trodimenzionalnih tumorskih sferoida provedena je sedimentacijskom metodom, kojom su određena njihova masa, promjer i masena gustoća. Broj detektiranih sferoida razlikovao se između uzoraka: u uzorku dijagnoze zabilježeno je osam sferoida, a u uzorku recidiva sedam. Unatoč usporedivom broju analiziranih sferoida, između skupina su utvrđene razlike u njihovim biofizičkim svojstvima.

Sferoidi dobiveni iz uzorka recidiva imali su značajno nižu masenu gustoću, koja je iznosila 1021,1 ± 6,2 fg/µm³, u usporedbi s 1063,3 ± 28,9 fg/µm³ u uzorku dijagnoze. Istodobno je u uzorku recidiva zabilježen veći prosječni promjer sferoida, koji je iznosio 195 ± 54 µm, u odnosu na 102 ± 28 µm u uzorku dijagnoze. U skladu s tim razlikama, ukupna masa sferoida

također je bila značajno veća u uzorku recidiva, gdje je iznosila 4930 ± 3671 ng, u usporedbi sa 737 ± 628 ng u uzorku dijagnoze (Slike 26A–C).

Analiza raspodjele pojedinačnih vrijednosti dodatno je pokazala razlike u varijabilnosti biofizičkih parametara između skupina. Sferoidi iz uzorka recidiva pokazivali su izraženiju varijabilnost promjera, dok je raspodjela vrijednosti masene gustoće bila manje varijabilna. Takav obrazac upućuje na heterogenost veličine sferoida u uzorku recidiva, uz relativno ujednačenije vrijednosti njihove masene gustoće (Slika 26D).

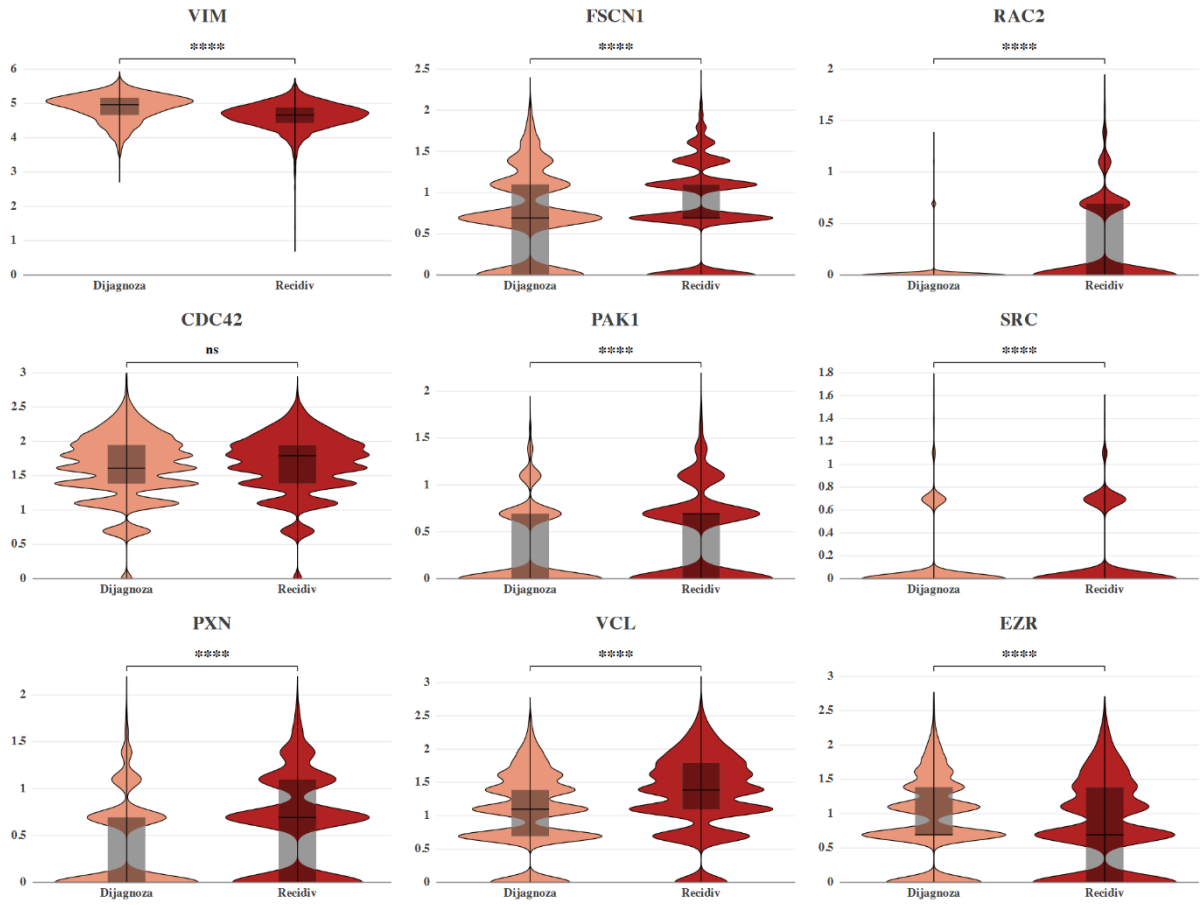


Slika 26. Biofizičke karakteristike tumorskih sferoida tijekom progresije bolesti. Box-and-whisker grafikonom je prikazana raspodjela A) masene gustoće, B) promjera i C) težine za svaki uzorak, pri čemu su srednje vrijednosti označene s "X", a odstupanja identificirana Tukeyevom metodom. Statistička značajnost procijenjena je korištenjem Studentovog t-testa `*` $p \leq 0{,}05$, `**` $p \leq 0{,}01$. D) Raspršenje podataka ilustrira odnos između promjera sferoida (µm) i gustoće mase (fg/µm^3) kroz različite stadije bolesti. Graf je napravljen u softveru MS Office *Excel* (ver. 2506).

4.2.2. Povećana ekspresija gena povezanih s remodeliranjem citoskeleta i staničnom adhezijom u recidivu osteosarkoma

Kako bi se promjene morfoloških obilježja stanica razmotrile u kontekstu mogućih molekularnih mehanizama, analizirana je ekspresija gena povezanih s organizacijom

citoskeleta, staničnom adhezijom i regulacijom stanične pokretljivosti. U uzorcima recidiva, u usporedbi s uzorkom dijagnoze, povećanu ekspresiju pokazali su geni povezani s organizacijom i remodeliranjem citoskeleta (*VIM, FSCN1, RAC1, CDC42, PAK1*), geni uključeni u organizaciju fokalnih adhezijskih kompleksa i staničnu adheziju (*VCL, PXN, SRC*) te gen *EZR*, koji sudjeluje u povezivanju stanične membrane s aktinskim citoskeletom (Slika 27).



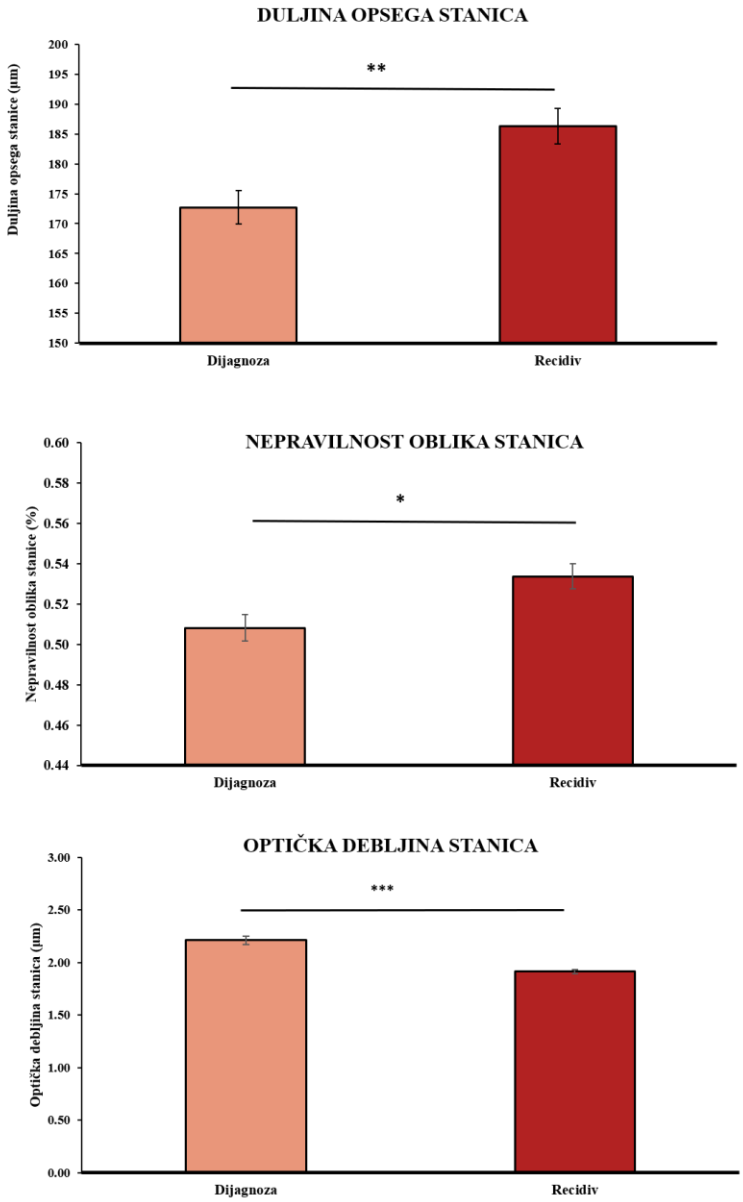
Slika 27. Ekspresija gena povezanih s mezenhimski fenotipom, citoskeletnim remodeliranjem i regulacijom stanične pokretljivosti. Analiza transkriptoma na razini pojedinačne stanice korištena je za procjenu ekspresije markera uključenih u remodeliranje i reguliranje dinamike aktinskog citoskeleta (*VIM, FSCN1, RAC1, CDC42, PAK1),* markera kompleksa fokalne adhezije i stanične adhezije (*VCL, PXN, TLN2* i *SRC*) te markera membransko-citoskeletnog modeliranja (*EZR*). Raspodjele ekspresije odabranih gena prikazane su violinskim dijagramima logaritamski. Unutar violinskih dijagrama prikazani su kutijasti dijagrami, pri čemu kutija označava interkvartilni raspon, a vodoravna linija medijan. Statistička značajnost označena je na sljedeći način: `*` $p \leq 0{,}05$, `**` $p \leq 0{,}01$, `***` $p \leq 0{,}001$, `****` $p \leq 0{,}0001$ i ns (statistički neznačajno; $p > 0{,}05$).

4.2.3. Morfološka obilježja tumorskih matičnih stanica upućuju na promijenjenu staničnu plastičnost

Morfološka karakterizacija TMS-a provedena je holografskim snimanjem, pri čemu su analizirani duljina opsega, nepravilnost oblika i optička debljina stanica. Usporedba stanica dobivenih iz uzoraka pri dijagnozi i recidivu pokazala je razlike u sva tri promatrana parametra.

Duljina opsega, definirana kao ukupna duljina konture stanice, bila je statistički značajno veća u uzorku recidiva, gdje je prosječna vrijednost iznosila 185 μm, u usporedbi sa 172,71 μm u uzorku dijagnoze. Sličan trend zabilježen je i pri analizi nepravilnosti oblika stanica, parametra koji opisuje odstupanje stvarnog oblika stanice od idealnog kružnog oblika. Prosječna vrijednost ovog parametra povećala se s 0,51 u uzorku dijagnoze na 0,53 u uzorku recidiva, pri čemu je razlika bila statistički značajna.

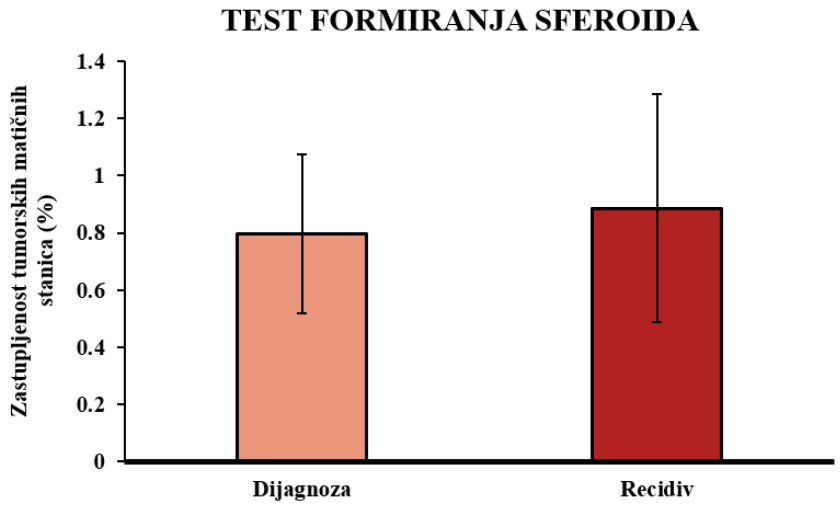
Za razliku od opsega i nepravilnosti oblika, optička debljina stanica bila je manja u uzorku recidiva. Prosječna vrijednost iznosila je 1,9 μm, u usporedbi s 2,21 μm u uzorku dijagnoze (Slika 28). Zajedno, ovi rezultati upućuju na promjene morfoloških obilježja TMS-a između dijagnoze i recidiva, koje se očituju povećanjem opsega i nepravilnosti oblika te smanjenjem optičke debljine stanica.



Slika 28. Morfološke karakteristike izoliranih tumorskih matičnih stanica tijekom progresije bolesti. Kvantificirani parametri: duljina opsega stanice, nepravilnost oblika stanice i optička debljina stanice prikazani su kao srednja vrijednost triju neovisnih mjerenja ± standardna pogreška. Statistička značajnost razlika među skupinama određena je parametrijskim Studentovim uparenim t-testom. Razina statističke značajnosti označena je vrijednostima: `*` $p \leq 0{,}05$, `**` $p \leq 0{,}01$, `***` $p \leq 0{,}001$, `****` $p \leq 0{,}0001$. Grafovi su napravljeni u softveru MS Office *Excel* (ver. 2506).

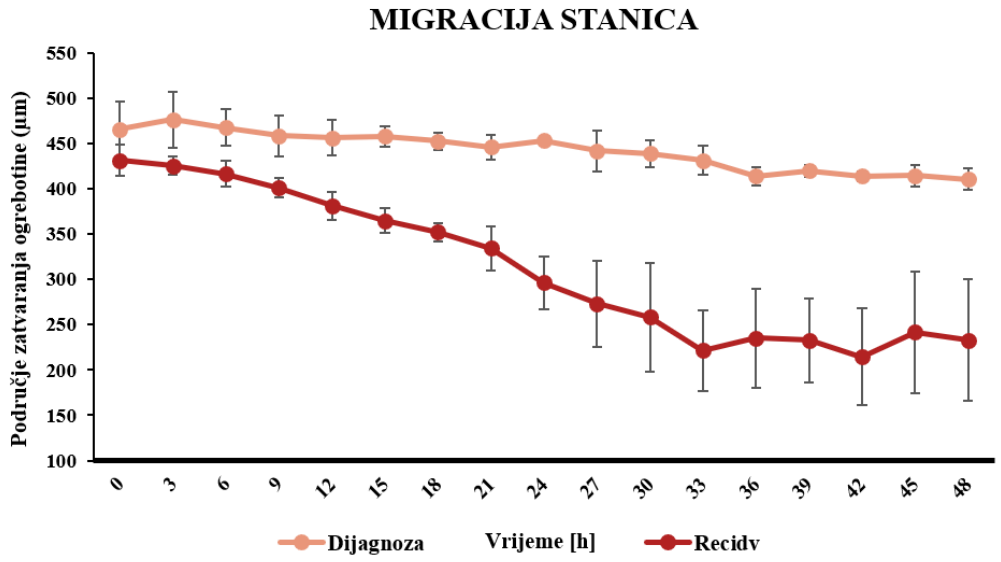
4.3. Zastupljenost stanica koje iniciraju razvoj tumora i povećana migratorna aktivnost stanica u recidivu osteosarkoma

Zastupljenost tumorskih matičnih stanica i njihov potencijal za iniciranje tumora u analiziranim uzorcima procijenjeni su testom formiranja sferoida. Dobiveni rezultati pokazali su razlike u broju i udjelu formiranih sferoida između analiziranih uzoraka. Najveći udio formiranih sferoida zabilježen je u uzorku recidiva, gdje je iznosio 0,88 % (N = 345), dok je u uzorku pri dijagnozi zabilježen nešto niži udio od 0,79 % (N = 310) (Slika 29).



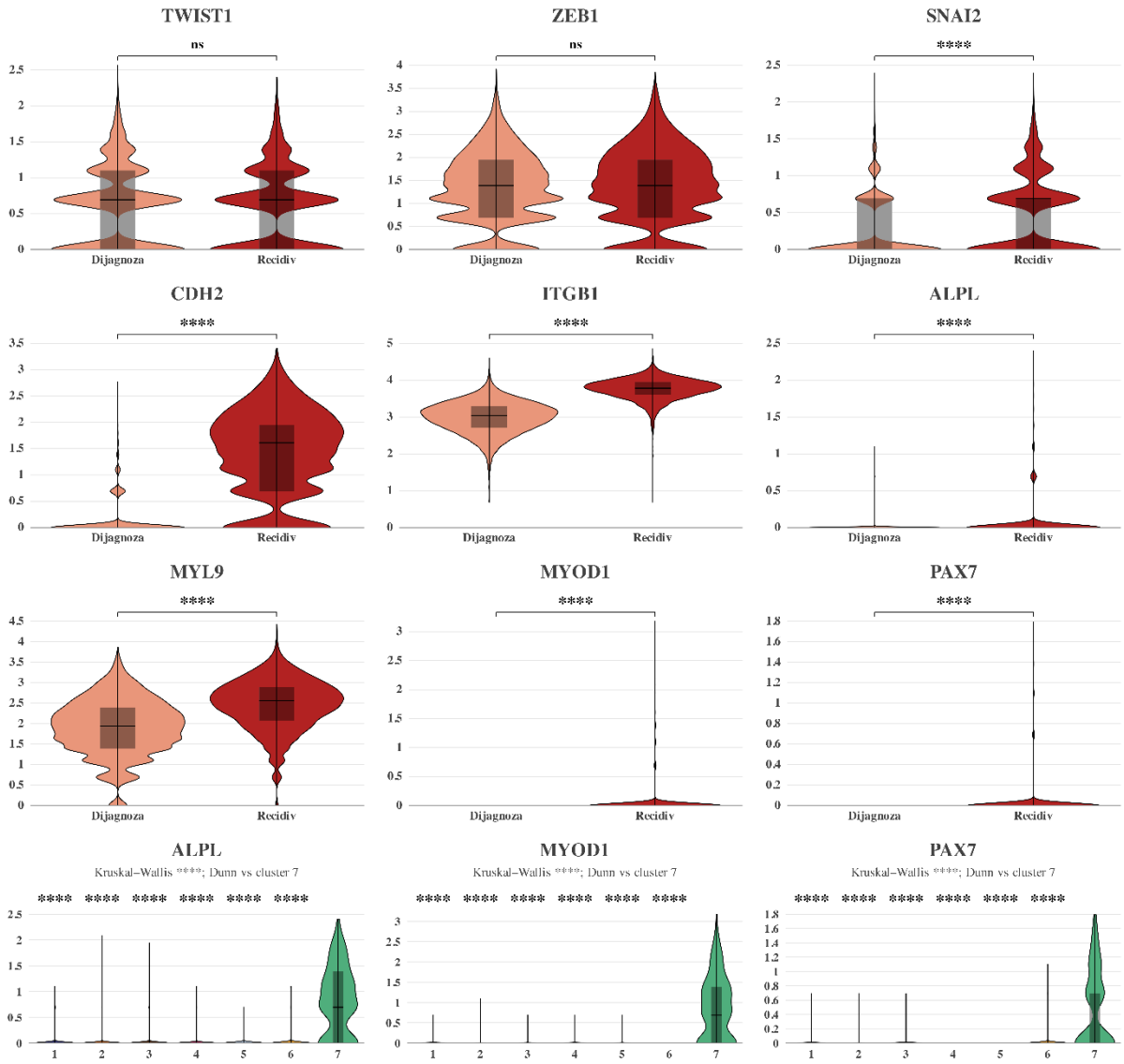
Slika 29. Udio tumorskih matičnih stanica tijekom progresije bolesti. Prikazan je postotak stanica s tumorskim inicirajućim potencijalom izražen kao udio formiranih sferoida u odnosu na ukupni broj nasađenih stanica. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Graf je napravljen u softveru MS Office *Excel* (ver. 2506).

Funkcionalna sposobnost migracije tumorskih matičnih stanica procijenjena je testom migracije. Kretanje stanica i dinamika zatvaranja rane uspješno su praćeni tijekom 48 sati upotrebom holografskog snimanja. Analiza je pokazala postupno povećanje migracijskog kapaciteta stanica s napredovanjem bolesti. Stanice iz uzorka recidiva pokazale su najizraženiju migracijsku aktivnost, što se očitovalo značajno bržim smanjenjem širine i površine rane u usporedbi s uzorkom pri dijagnozi. Tijekom promatranja zabilježeno je da se stanice iz uzorka recidiva dominantno kreću koordinirano, uz očuvane međustanične kontakte i zajedničko napredovanje staničnih fronti. Brzina migracije stanica iz uzorka dijagnoze znatno je bila sporija i stanice su zatvorile manju površinu rane. U uzorku pri dijagnozi prevladavalo je ograničeno i slabije izraženo kolektivno kretanje stanica (Slika 30).



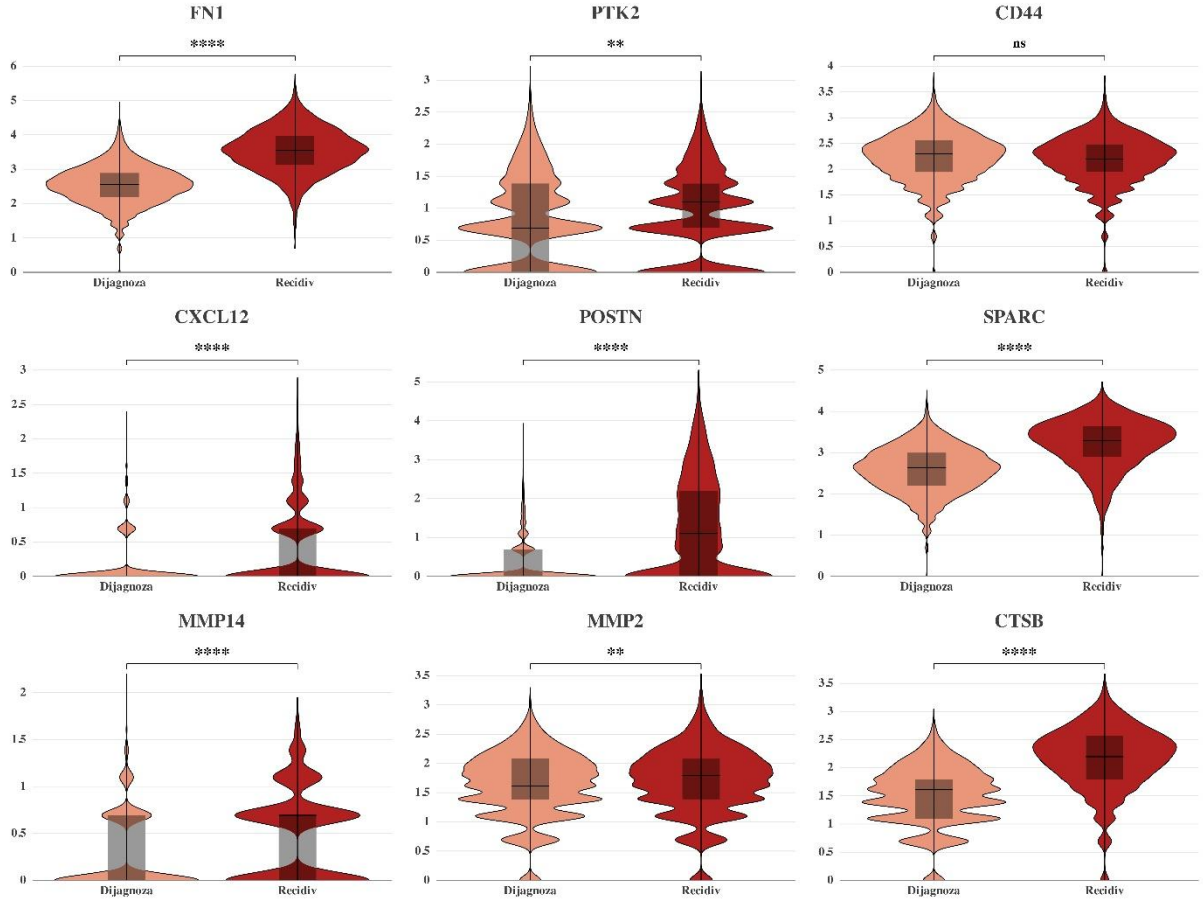
Slika 30. Migracijski potencijal tumorskih matičnih stanica tijekom progresije bolesti. Prikazano je zatvaranje linearne rane tijekom 48 sati. Brzina migracije stanica prikazana je kao promjena prosječne širine pukotine tijekom vremena, određena na temelju tri replikata za svaki stadij bolesti, uz pripadajuće standardne pogreške. Podaci su dobiveni korištenjem sustava Holomonitor, a dijagram je izrađen u softveru MS Office *Excel* (ver. 2506).

Analiza ekspresije gena parentalne stanične kulture osteosarkoma provedena je s ciljem utvrđivanja mehanizama koji su odgovorini za jačanje migratornih sposobnosti. U uzorku recidiva zabilježeno je povećanje ekspresije gena *SNAI2*, uključenog u regulaciju EMT, dok je ekspresije gena *ZEB1* i *TWIST1* izražena u oba uzorka. Također, zabilježeno je značajno povećanje ekspresije gena uključenih u staničnu adheziju i interakciju s izvanstaničnim matriksom (*ITGB1*, *CDH2*), kao i gena povezanog s osteogenom diferencijacijom (*ALPL*). Osim toga, uočeno je povećanje ekspresije gena povezanih s miogenom diferencijacijom i kontraktilnošću, uključujući markere miogene diferencijacije (*MYOD1* i *PAX7*) i miogene dinamike (*MYL9*) (Slika 31).



Slika 31. Ekspresija gena povezanih s procesima sličnim EMT-u, mezenhimskom plastičnošću i migracijskim fenotipom stanica. Analiza transkriptoma na razini pojedinačne stanice korištena je za procjenu ekspresije markera povezanih s procesima sličnim EMT-i, uključujući transkripcijske regulatore (*TWIST, ZEB* i *SNAI2*); markera povezanih s mezenhimski fenotipom, staničnom adhezijom i osteogenom diferencijacijom (*ITGB1, CDH2* i *ALPL*); te markera miogene plastičnosti i alternativnih diferencijacijskih programa, uključujući (*MYOD1, PAX7* i *MYL9*). Dodatno je prikazana ekspresija odabranih gena (*ALPL, MYOD1* i *PAX7*) prema pripadnosti staničnim klasterima. U klasteru 6, koji je bio prisutan isključivo u uzorku recidiva, uočene su dominantno visoke ekspresije analiziranih gena. Raspodjele ekspresije odabranih gena prikazane su violinskim dijagramima. Unutar violinskih dijagrama prikazani su kutijasti dijagrami, pri čemu kutija označava interkvartilni raspon, a vodoravna linija medijan. Statistička značajnost označena je na sljedeći način: `*` $p \leq 0{,}05$, `**` $p \leq 0{,}01$, `***` $p \leq 0{,}001$, `****` $p \leq 0{,}0001$ i ns (statistički neznačajno; $p > 0{,}05$). Razlike u ekspresiji gena *ALPL, MYOD1* i *PAX7* među sedam klastera ispitane su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je proveden Dunnov post hoc test za usporedbu klastera 7 sa svakim od preostalih klastera. *P*-vrijednosti su korigirane za višestruko testiranje Benjamini-Hochbergovom metodom (zasebno za svaki gen).

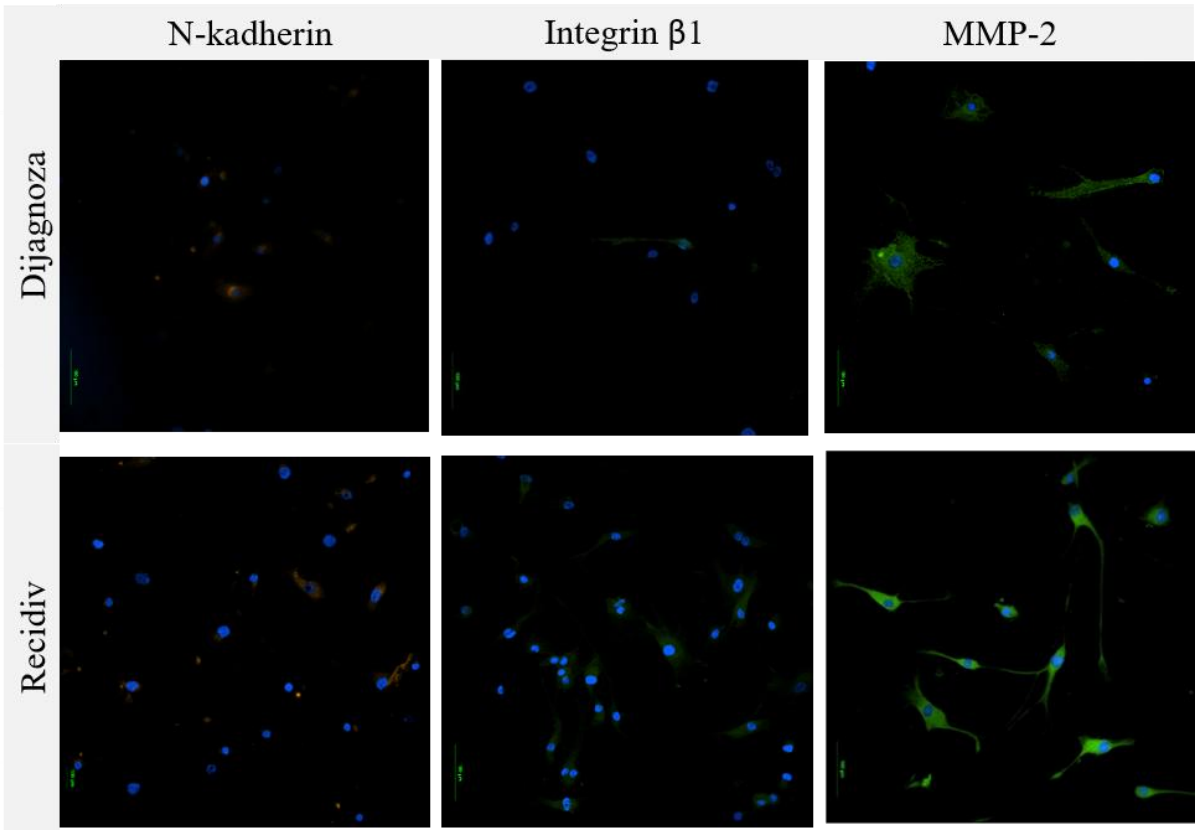
U uzorku recidiva osteosarkoma zabilježena je povećana ekspresija gena povezanih s tumorskom plastičnošću, migracijskim potencijalom i invazivnim mezenhimskim fenotipom. Među odabranim markerima izdvojeni su geni uključeni u interakciju stanica s izvanstaničnim matriksom i regulaciju stanične pokretljivosti (*FN1, CD44, PTK2*), geni povezani s kemotaktičkom regulacijom (*CXCL12*), geni uključeni u remodeliranje i komunikaciju unutar tumorskog mikrookoliša (*POSTN, SPARC*) te geni povezani s proteolitičkom razgradnjom izvanstaničnog matriksa (*MMP14, MMP2, CTSB*) (Slika 32).



Slika 32. Ekspresija gena povezanih s invazivnim, migracijskim i mezenhimskim fenotipom stanica recidivnog osteosarkoma. Analiza transkriptoma na razini pojedinačne stanice korištena je za procjenu ekspresije markera povezanih interakcijom stanica s izvanstaničnim matriksom i regulaciju stanične pokretljivosti (*FN1, CD44, PTK2),* gena povezanih s kemotaktičkom regulacijom (*CXCL12*), geni uključeni u remodeliranje i komunikaciju unutar tumorskog mikrookoliša (*POSTN, SPARC*) te geni povezani s proteolitičkom razgradnjom izvanstaničnog matriksa (*MMP14, MMP2, CTSB*). Raspodjele ekspresije odabranih gena prikazane su violinskim dijagramima. Unutar violinskih dijagrama prikazani su kutijasti dijagrami, pri čemu kutija označava interkvartilni raspon, a vodoravna linija medijan. Statistička značajnost označena je na sljedeći način: `*` $p \leq 0,05$, `**` $p \leq 0,01$, `***` $p \leq 0,001$, `****` $p \leq 0,0001$ i ns (statistički neznačajno; $p > 0,05$).

Imunocitokemijskom analizom procijenjena je prisutnost i stanična lokalizacija proteina povezanih s razgradnjom izvanstaničnog matriksa, staničnom adhezijom i invazivnim fenotipom tumorskih stanica. Analizirani su MMP2, metaloproteinaza matriksa uključena u razgradnju komponenti izvanstaničnog matriksa, N-kadherin, adhezijski protein povezan s promjenama stanične adhezije i invazivnim svojstvima stanica, te integrin β1, koji sudjeluje u povezivanju stanica s izvanstaničnim matriksom i prijenosu signala.

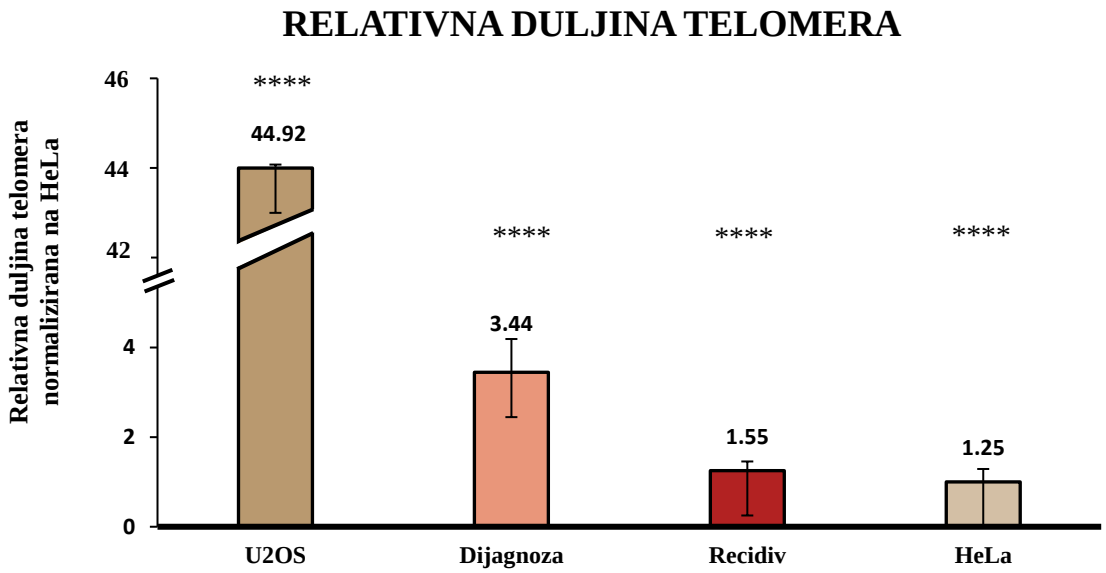
MMP2 je detektiran u citoplazmi stanica u oba uzorka, pri čemu je intenzitet signala bio izraženiji u uzorku recidiva. N-kadherin je lokaliziran uz staničnu membranu i u citoplazmi, a izražen signal, pretežno točkastog uzorka, uočen je u jednom uzorku, dok je u drugom bio vrlo slab ili nije bio detektiran. Integrin β1 također je bio prisutan u citoplazmi i uz staničnu membranu, uz izraženiji signal u uzorku recidiva (Slika 33).



Slika 33. Ekspresija proteina povezanih s adhezijom i invazivnim fenotipom tijekom progresije osteosarkoma. Imunocitokemijskom metodom analizirana je ekspresija N-kadherina i integrina β1, detektiranih pomoću sekundarnih protutijela konjugiranih s Alexa Fluor 488, te MMP-2, detektiranog pomoću Alexa Fluor 568, u stanicama osteosarkoma iz obje faze bolesti. Jezgre stanica obojene su DAPI-em. Slike su fotografirane pri povećanju objektiva 20x pomoću invertnog mikroskopa Nikon Eclipse Ti2 i obrađene u pripadajućem softveru NIS-Elements.

4.4. Smanjenje relativne duljine telomera i nalazi koji upućuju na alternativne mehanizme njihova održavanja u osteosarkoma

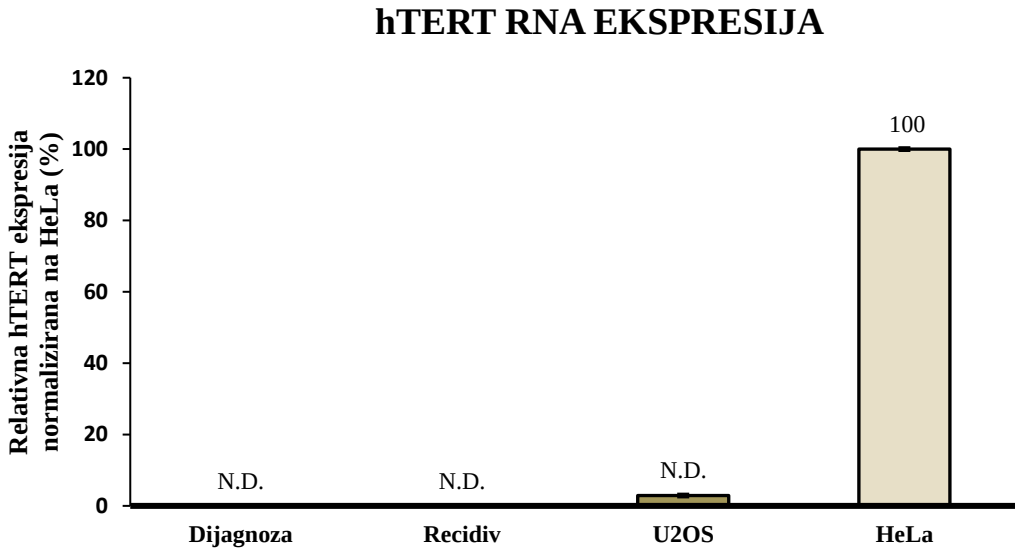
Relativna duljina telomera određena je u prvoj generaciji tumorskih matičnih stanica (TMS) dobivenih iz uzoraka osteosarkoma pri dijagnozi i recidivu bolesti, a rezultati su izraženi kao omjer telomernih sekvenci (T) i referentnog gena s jednom kopijom u genomu (IFNB1; S), odnosno T/S omjer. Usporedna analiza pokazala je izraženo smanjenje relativne duljine telomera tijekom progresije bolesti. U uzorku dijagnoze zabilježen je T/S omjer od 1413,08, dok je u uzorku recidiva iznosio 145,13. Usporedba s referentnom staničnom linijom HeLa pokazala je statistički značajne razlike u relativnoj duljini telomera među analiziranim uzorcima (`****` $p \leq 0{,}0001$) (Slika 34).



Slika 34. Duljine telomera u prvoj generaciji tumorksih matičnih stanica tijekom progresije osteosarkoma i kontrolnim staničnim linijama (U2OS, HeLa). Rezultati su izraženi kao $2^{\wedge\Delta\Delta Ct}$, a vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina ± SEM (engl. *Standard Error of the Mean*, SEM), odnosno standardna pogreška aritmetičke sredine. SEM je statistički pokazatelj preciznosti procjene aritmetičke sredine, a izračunava se dijeljenjem standardne devijacije (SD) s kvadratnim korijenom broja mjerenja (n). U ovom istraživanju analizirana su tri ponovljena mjerenja (n = 3). Statistička značajnost razlika u odnosu na kontrolu određena je jednosmjernom analizom varijance (ANOVA), uz Tukeyjev HSD post hoc test. Razina statističke značajnosti označena je simbolom `****` $p \leq 0{,}0001$. Grafički prikaz izrađen je u programu MS Office *Excel* (verzija 2506).

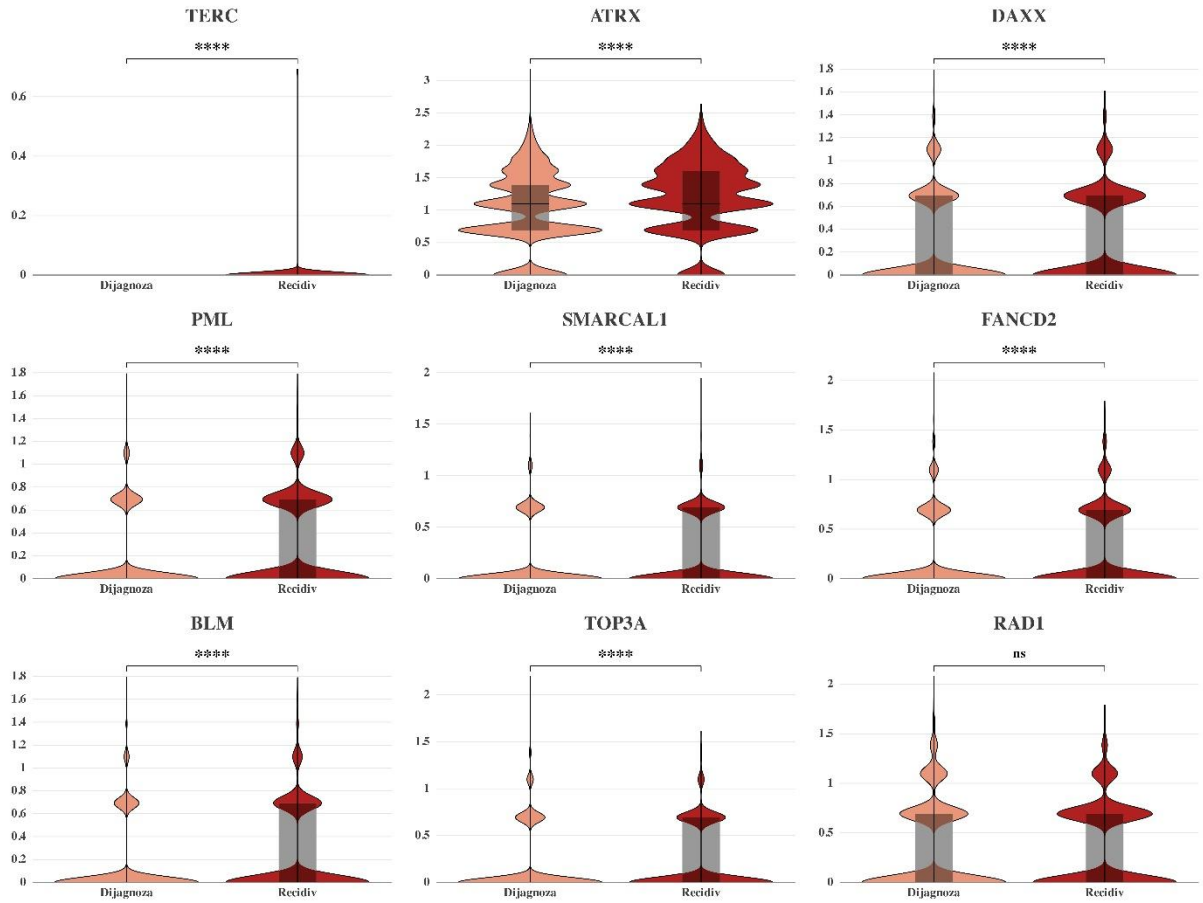
S obzirom na uočeno skraćivanje telomera, dodatno je istražena moguća uključenost telomeraze u njihovo održavanje analizom ekspresije gena *hTERT*, koji kodira za katalitičku podjedinicu telomeraze. Međutim, u uzorcima TMS-a dobivenima pri dijagnozi i recidivu

ekspresija *hTERT* nije bila detektirana. U kontrolnoj staničnoj liniji U2OS, korištenoj kao negativna kontrola, zabilježena je ekspresija *hTERT* na razini od 2,9 % u odnosu na staničnu liniju HeLa, koja je služila kao pozitivna kontrola (Slika 35). Izostanak detektirane ekspresije *hTERT* u oba uzorka potaknuo je daljnju analizu transkripcijskih pokazatelja povezanih s alternativnim mehanizmima održavanja telomera.



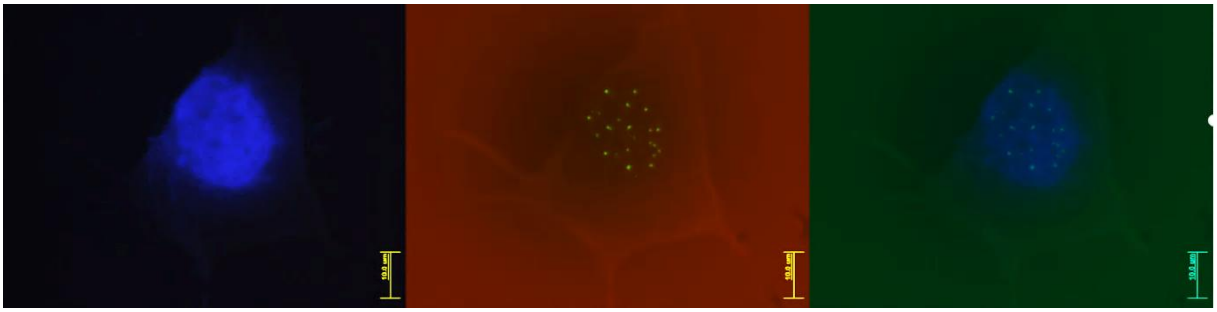
Slika 35. Ekspresija hTERT u uzorcima prve generacije tumorskih matičnih stanica osteosarkoma i kontrolnim staničnim linijama. Kvantitativna analiza ekspresije *hTERT* provedena je metodom qRT-PCR u stanicama osteosarkoma tijekom progresije bolesti te u negativnoj kontrolnoj staničnoj liniji (U2OS). Normalizacija je provedena korištenjem β-aktina kao endogenog kontrolnog gena. Relativna kvantifikacija izražena je u postotcima u odnosu na ekspresiju *hTERT* u pozitivnoj kontrolnoj staničnoj liniji (HeLa). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM, na temelju triju neovisnih ponavljanja (n = 3) (*ND*-nije detektirano u usporedbi s kontrolom) (ANOVA s Tukey HSD post hoc testom). Graf je napravljen u softveru MS Office *Excel* (ver. 2506).

U okviru analize gena povezanih s održavanjem telomera nisu zabilježeni transkripcijski pokazatelji aktivnosti telomeraze, poput *hTERC*, dok su u uzorku recidiva uočene povećane razine ekspresije gena povezanih s ALT-om uključujući *PML* i *BLM*. U uzorku recidiva zabilježena je i povećana ekspresija gena uključenih u održavanje genomske stabilnosti i popravak DNA (*RAD1, TOP3A* i *FANCD2*), koji sudjeluju u odgovoru stanice na oštećenja DNA i očuvanju integriteta genoma. Također, uočena je povišena ekspresija gena povezanih s organizacijom i regulacijom kromatina (*ATRX, DAXX* i *SMARCM1*), što upućuje na promjene mehanizmima regulacije kromatinske strukture tijekom progresije bolesti (Slika 36).



Slika 36. Ekspresija markera besmrtnosti tijekom progresije bolesti. Analiza transkriptoma na razini pojedine stanice provedena je za markere povezane s mehanizmima stanične besmrtnosti, uključujući osdutnost pokazatelja aktivnosti telomeraze (*hTERC*) te gene uključene u održavanje telomera alternativnim načinom produljenja (*TOP3A*), popravak DNA i održavanje genomske stabilnosti *(RAD1, FANCD2* i *TOP3A*) te remodeliranje i regulaciju kromatina (*ATRX, DAXX* i *SMARCM1*). Raspodjele ekspresije odabranih gena prikazane su violinskim dijagramima. Unutar violinskih dijagrama prikazani su kutijasti dijagrami, pri čemu kutija označava interkvartilni raspon, a vodoravna linija medijan. Statistička značajnost označena je na sljedeći način: `*` $p \leq 0{,}05$, `**` $p \leq 0{,}01$, `***` $p \leq 0{,}001$, `****` $p \leq 0{,}0001$ i ns (statistički neznačajno; $p > 0{,}05$).

Kako bi se dodatno istražila moguća povezanost ovih transkriptomskih promjena s obilježjima ALT-a, provedena je imunocitokemijska analiza tjelešaca PML, nuklearnih struktura koje mogu sudjelovati u procesima održavanja telomera i čija je prisutnost povezana s ALT fenotipom. Imunocitokemijskom analizom uočene su jasno definirane točkaste strukture unutar jezgara stanica, koje odgovaraju lokalizaciji tjelešaca PML. U uzorku recidiva signal je bio znatno izraženiji nego u uzorku dijagnoze (Slika 37).



Slika 37. Ekspresija proteina PML u uzorku recidiva osteosarkoma. PML je detektiran zelenim fluoroforom FITC. Jezgre su obojene plavom bojom DAPI. Slike su fotografirane pri povećanju objektiva 100 x pomoću mikroskopa Olympus BX51 (Olympus Corporation, Tokio, Japan) i obrađene u softveru ImageJ (ver. 1.54g).

4.5. Povećana osjetljivost stanica na doksorubicin

Budući da je pacijent od kojeg su izolirani uzorci tijekom liječenja primao kombiniranu kemoterapiju koja je uključivala doksorubicin, cisplatin i metotreksat, osjetljivost TMS na navedene citostatike ispitana je *in vitro* u 2D adherentnim kulturama i 3D sferoidnim modelima (Slika 38). Usporedba uzoraka prikupljenih pri dijagnozi i recidivu omogućila je procjenu promjena u odgovoru stanica na liječenje tijekom progresije bolesti.

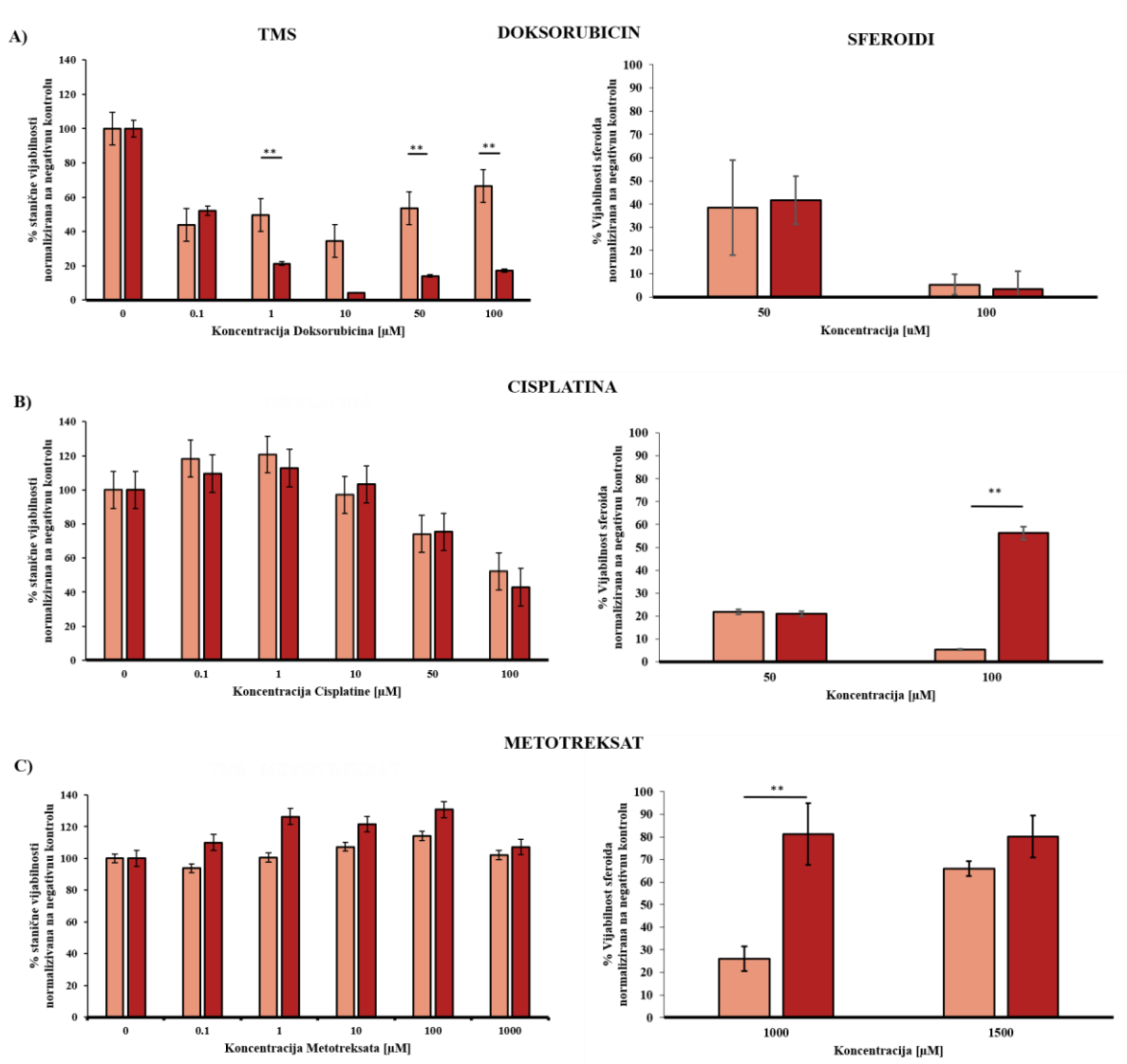
Doksorubicin je pokazao najizraženiji citotoksični učinak među ispitanim lijekovima. U 2D kulturi vijabilnost stanica smanjivala se s porastom koncentracije lijeka u oba uzorka, pri čemu su izračunate vrijednosti IC_{50} bile usporedive: 48,97 µM za uzorak pri dijagnozi i 49,21 µM za uzorak recidiva. Unatoč sličnoj ukupnoj osjetljivosti, pri koncentracijama od 1, 50 i 100 µM zabilježene su statistički značajne razlike između uzoraka (`**` $p \leq 0{,}01$). U 3D sferoidnom modelu također je potvrđen izražen citotoksični učinak doksorubicina, ali uz razlike u odgovoru pri nižoj koncentraciji. Sferoidi dobiveni iz uzorka recidiva pokazali su gotovo potpun gubitak vijabilnosti, dok je uzorak pri dijagnozi zadržao približno 40 % metaboličke aktivnosti. Pri višoj koncentraciji vijabilnost sferoida u oba uzorka smanjila se na manje od 10 %, što upućuje na očuvanu učinkovitost doksorubicina u oba modela kulture (Slika 38A) .

Cisplatin je pokazao slabiji citotoksični učinak u 2D kulturi, gdje je izraženije smanjenje vijabilnosti zabilježeno tek pri višim koncentracijama, odnosno 50 i 100 µM. Vrijednosti IC_{50} bile su usporedive između uzoraka i iznosile su 47,52–52,63 µM, što upućuje na sličnu ukupnu osjetljivost u adherentnim kulturama. Međutim, u 3D sferoidnom modelu uočene su razlike povezane s fazom bolesti. Pri nižoj koncentraciji citostatika učinak je bio podjednak u oba uzorka, uz preostalu vijabilnost od približno 20 %. Pri višoj koncentraciji stanice iz uzorka

recidiva pokazale su veću otpornost na cisplatin u odnosu na stanice iz uzorka pri dijagnozi, a razlika je bila statistički značajna (Slika 38B).

Metotreksat je pokazao najmanju djelotvornost među ispitanim citostaticima u oba modela kulture. U 2D kulturi nije zabilježeno izraženo smanjenje vijabilnosti, a pri pojedinim koncentracijama izmjerene su vrijednosti metaboličke aktivnosti veće od 100 %, što može odražavati promjene u metaboličkoj aktivnosti stanica, a ne nužno povećanje njihova broja. Vrijednosti IC_{50} bile su znatno više nego za doksorubicin i cisplatin te su se povećale s 178,1 µM u uzorku pri dijagnozi na 849,5 µM u uzorku recidiva. Takav porast upućuje na smanjenu osjetljivost stanica recidiva na metotreksat. Sličan obrazac uočen je i u 3D sferoidnom modelu, u kojem su sferoidi iz uzorka recidiva zadržali visoku metaboličku aktivnost pri objema ispitivanim koncentracijama, dok je izraženiji citotoksični učinak zabilježen u sferoidima dobivenima pri dijagnozi (Slika 38C).

Ukupno gledano, rezultati pokazuju da odgovor TMS-a na ispitane citostatike ovisi o vrsti lijeka i modelu stanične kulture. Doksorubicin je pokazao izražen citotoksični učinak u oba uzorka, uz usporedive vrijednosti IC_{50} u 2D kulturi i snažan učinak u 3D modelu pri višoj koncentraciji. Nasuprot tomu, za cisplatin su razlike u osjetljivosti između uzoraka bile osobito vidljive u 3D kulturi, u kojoj su stanice recidiva pokazale statistički značajno veću otpornost pri višoj koncentraciji. Metotreksat je bio najmanje djelotvoran lijek, a porast vrijednosti IC_{50} u uzorku recidiva dodatno je upućivao na smanjenu osjetljivost.



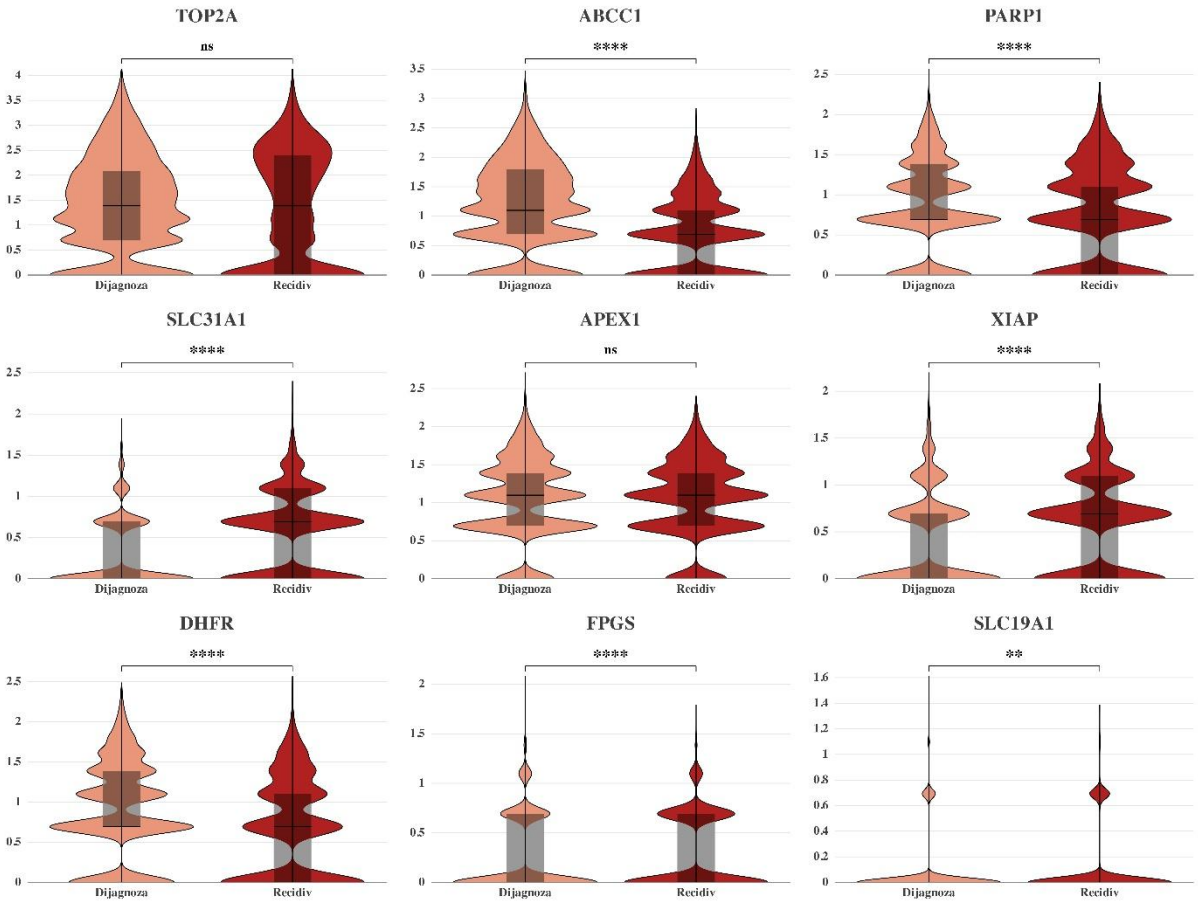
Slika 38. Osjetljivost stanica osteosarkoma na kemoterapeutike procijenjena je na prvoj generaciji tumroksih matičnih stanica i na modelima tumroskih sferoida. Vijabilnost stanica nakon 72 sata tretmana rastućim koncentracijama doksorubicina A), cisplatine B) i metotreksata C) mjerena je u 2D kulturama pomoću MTT testa, dok je vijabilnost u sferoidima izloženima dvjema odabranim koncentracijama istih kemoterapeutika testirana korištenjem CellTiter-Glo 3D testa. Podaci su normalizirani u odnosu na netretirane kontrole i izraženi kao postotak vijabilnosti, pri čemu stupci pogreške predstavljaju standardnu devijaciju tri neovisna replikata (`**` $p \leq 0{,}01$).

Analiza scRNA-seq parentalne stanične kulture osteosarkoma omogućila je uvid u stanične i molekularne osnove kemorezistencije i preživljavanja tumorskih matičnih stanica s fokusom na gene uključene u unos i izbacivanje lijekova, ciljne proteine, metabolizam te popravak DNA. Usporedbom uzoraka iz različitih faza bolesti identificirane su specifične stanične subpopulacije povezane s rezistencijom na lijekove, pri čemu se posebno ističe subpopulacija 6.

U analizi gena povezanih s odgovorom na doksorubicin, ekspresija transportera *ABCC1*, uključenog u izbacivanje lijeka iz stanice, bila je zastupljena u oba uzorka, međutim statistički značajno smanjena u uzorku recidiva u odnosu na uzorak pri dijagnozi. Nasuprot tomu, Genspresija gena *TOP2A*, koji kodira ciljnu molekulu doksorubicina, bila je zastupljenaeksprimiran je u oba uzorka, ali bez značajnosti. Također, u uzorku recidiva zabilježena zabilježeno je znatno povećana povećanje ekspresija ekspresije gena *PARP1*, uključenog u stanični odgovor na oštećenje i popravak DNA (Slika 39A).

U analizi gena povezanih s odgovorom na cisplatinu, ekspresija gena *SLC31A1*, za transporter uključen u unos lijeka u stanice, kao i gena *XIAP*, koji sudjeluje u inhibiciji apoptoze, zabilježena je u oba uzorka, uz statistički značajno višu razinu ekspresije u uzorku recidiva. Ekspresija gena *APEX1*, uključenog u popravak oštećenja DNA, prisutna je u oba uzorka (Slika 39B).

U analizi gena povezanih s odgovorom na metotreksat, ekspresija transportera *SLC19A1*, uključenog u unos lijeka u stanice, bila je statistički značajna, pokazujući veću zastupljenost u uzorku recidiva. Gen *DHFR*, koji kodira ciljnu molekulu metotreksata, eksprimiran je u oba uzorka ali uz smanjenje ekspresije u recidivu. U uzorku recidiva zabilježena je blago povećana ekspresija gena *FPGS*, koji sudjeluje u poliglutamaciji metotreksata i njegovu unutarstaničnom zadržavanju (Slika 39C).



Slika 39. Ekspresija markera osjetljivosti i kemorezistencije tijekom progresije bolesti. Analiza transkriptoma na razini pojedinačnih stanica provedena je radi procjene promjena u ekspresiji gena uključenih u različite mehanizme razvoja rezistencije na kemoterapeutike tijekom progresije bolesti. A) Markeri odgovora na terapiju doksorubicina (*TOP2A, ALDH1A1, ABCC1)*. B) Markeri odgovora na terapiju cisplatinom (*XIAP, SLC31A1* i *APEX1)*. C) Markeri povezani s odgovorom na terapiju metotreksatom (*FPGS, SLC19A1* i *DHFR)*. Raspodjele ekspresije odabranih gena prikazane su violinskim dijagramima. Unutar violinskih dijagrama prikazani su kutijasti dijagrami, pri čemu kutija označava interkvartilni raspon, a vodoravna linija medijan. Statistička značajnost označena je na sljedeći način: `*` $p \leq 0,05$, `**` $p \leq 0,01$, `***` $p \leq 0,001$, `****` $p \leq 0,0001$ i ns (statistički neznačajno; $p > 0,05$).

5. RASPRAVA

5.1. Specifična pojavnost subpopulacije stanica s obilježjima matičnosti u uzorku recidiva osteosarkoma

U ovom istraživanju identifikacirana je stanična populacija definirana kao subpopulacija 6, koja je bila prisutna isključivo u uzorku recidiva, dok u početnoj fazi, pri uspostavi dijagnoze nije detektirana. Molekularna i funkcionalna karakterizacija subpopulacije 6, koja je uključivala funkcionalne testove *in vitro* i analizu scRNA-seq, pokazala je izražena svojstva povezana s tumorskim matičnim fenotipom. Transkriptomski profil pokazao je obogaćenost programa povezanih s održavanjem nediferenciranog stanja i fenotipa povezanog s matičnošću, uključujući klasične markere matičnosti, transkripcijske regulatore, čimbenike povezane s organizacijom kromatina te gene uključene u staničnu signalizaciju, adheziju i regulaciju niše matičnih stanica, dok su funkcionalni testovi dodatno poduprli fenotip stanica povezan s matičnošću.

Naime, diferencijalna analiza ekspresije gena subpopulacije 6 pokazala je gotovo isključivu ekspresiju *ALDH1A1*, što upućuje na njezinu moguću povezanost sa svojstvima tumorskih matičnih stanica. Ovaj nalaz u skladu je s izvornim istraživanjima koja povezuju ekspresiju *ALDH1A1* sa samoobnavljanjem, kemorezistencijom i tumorskom progresijom [123]. Nadalje, istraživanja su pokazala povezanost njegove povišene ekspresije s povećanim rizikom metastaziranja i recidiva te nepovoljnijim kliničkim ishodima [142]. U kontekstu ovog istraživanja, izražena ekspresija *ALDH1A1* u subpopulaciji 6 stoga može upućivati na prisutnost stanične populacije s potencijalno povećanom sposobnošću preživljavanja terapijskog pritiska i sudjelovanja u progresiji osteosarkoma.

Povećana ekspresija *NES*-a čiji je produkt unutarstanični protein intermedijarnih filamenata citoskeleta te površinskog markera *CD24* dodatno podupire obilježja tumorske matičnosti subpopulacije 6. *NES* se izvorno opisuje u neuralnim matičnim stanicama tijekom razvoja, a njegova je ekspresija naknadno utvrđena i u tumorskim populacijama različitih solidnih tumora [143]. U osteosarkomu je visoka ekspresija *NES*-a povezana s kraćim ukupnim preživljenjem, što upućuje na moguću povezanost s nepovoljnijim kliničkim ishodom [144]. Eksperimentalna istraživanja dodatno su pokazala da hipoksija može potaknuti ekspresiju *NES*-a te da je on uključen u regulaciju stanične održivosti i metaboličkog odgovora na stresne uvjete [145]. Također, dosadašnja istraživanja u različitim tumorskim modelima povezala su ekspresiju *NES*-a s regulacijom citoskeleta, povećanom migracijskom i invazivnom sposobnošću [146] te, u pojedinim tumorima, otpornošću na terapiju [147]. Iako su ovi nalazi

dobiveni pretežno u drugim tumorskim tipovima, oni upućuju na moguću povezanost *NES*-a sa staničnom plastičnošću i agresivnijim tumorskim fenotipom. Dosadašnja istraživanja u različitim malignim tumorima povezuju ekspresiju *CD24* s povećanom sposobnošću samoobnavljanja i inicijacije tumora te s terapijskom rezistencijom i većim invazivnim i metastatskim potencijalom [148,149]. U osteosarkomu je povećana ekspresija *CD24* povezana s progresijom tumora i nepovoljnijom prognozom, što upućuje na njegovu moguću ulogu u agresivnijem tumorskom fenotipu [150].

Ova subpopulacija stanica obiluje i transkripcijskim faktorima koji održavaju nediferencirani, matični fenotip. Povećana ekspresija *SOX4* u osteosarkomu povezana je s agresivnijim tumorskim fenotipom, a njegovo utišavanje eksperimentalno smanjuje proliferaciju, migraciju i invazivnost tumorskih stanica [151]. U drugim tumorskim modelima *SOX4* je povezan s aktivacijom β-kateninskog signaliziranja, EMT-om i stjecanjem svojstava TMS-a, što upućuje na moguću ulogu ovog čimbenika u regulaciji tumorske plastičnosti [152]. Također, ovišena ekspresija *TCF12*, člana obitelji bHLH transkripcijskih faktora, povezuje se s progresijom osteosarkoma, povećanim metastatskim potencijalom i lošijim preživljenjem bolesnika. Funkcionalna istraživanja pokazala su da utišavanje *TCF12* smanjuje proliferaciju, migraciju i invaziju tumorskih stanica te angiogenezu i metastaziranje, što upućuje na njegovu ulogu u poticanju agresivnog tumorskog fenotipa [153]. Osim toga, istraživanja na drugim tumorskim modelima, poput glioblastoma, ukazuju na povezanost *TCF12* s održavanjem nediferenciranog stanja tumorskih stanica, što otvara mogućnost njegove uloge u očuvanju obilježja tumorske matičnosti [154]. Iako ta funkcija još nije izravno potvrđena u osteosarkomu, povećana ekspresija *TCF12* u ovom istraživanju može upućivati na njegov potencijalni doprinos održavanju agresivnog fenotipa i progresiji bolesti. *RUNX2*, klasičan transkripcijski regulator osteoblastne diferencijacije, u kontekstu uzorka recidiva može djelovati u funkciji održavanja TMS fenotipa. Njegova visoka ekspresija podržava samoobnavljanje, inhibira terminalnu diferencijaciju i povezana je s povećanom proliferacijom, invazivnošću i terapijskom otpornosti stanica [155,156]. Povišena ekspresija *MEF2C* u recidivnom osteosarkomu može upućivati na prisutnost stanične populacije s izraženom razvojnom plastičnošću i obilježjima tumorske matičnosti. U prilog njegovoj kliničkoj važnosti, nedavno bioinformatičko istraživanje pokazalo je da je *MEF2C* povišeno eksprimiran u tkivu osteosarkoma te da je njegova ekspresija povezana s preživljenjem bez događaja (engl. *event-free survival*), što upućuje na njegov potencijal kao prognostičkog biomarkera [157]. S obzirom na ulogu *MEF2C* u regulaciji osteoblastne diferencijacije [158] te njegovu povezanost s molekularnim obilježjima tumorske matičnosti u osteosarkomu [159], njegova povećana

ekspresija mogla bi upućivati na stanična stanja povezana s očuvanjem razvojne plastičnosti. Nadalje, ekspresija *TEAD2*, transkripcijskog faktora koji veže DNA i regulira ekspresiju gena nizvodno od signalnog puta Hippo, može upućivati na aktivnost transkripcijskih programa povezanih s rastom i prilagodbom tumorskih stanica. U osteosarkomu je eksperimentalno potvrđena uloga osi YAP/TEAD u regulaciji proliferacije i rasta tumora, iako doprinos pojedinačnih članova obitelji TEAD, uključujući TEAD2, zahtijeva daljnje istraživanje [160]. Istodobno, ekspresija *HMGB2*, gena koji kodira proteina koji sudjeluje u organizaciji kromatina i regulaciji transkripcije, može biti povezana s agresivnijim fenotipom subpopulacije 6. U osteosarkomu je njegova povišena ekspresija povezana s povećanom proliferacijom, migracijom i invazijom tumorskih stanica te nepovoljnijim kliničkim ishodima, što upućuje na mogući doprinos progresiji bolesti [161].

Uz navedene markere tumorske matičnosti, subpopulaciju 6 obilježavaju i diferencijalno eksprimirani geni povezani s remodeliranjem citoskeleta (*PTGDS, PALMD*), staničnom adhezijom (*CDH15*) i staničnom plastičnošću (*ASB5, DES*). Dodatno, dominantna zastupljenost gena povezanih s interakcijama tumorskih stanica s mikrookolišem i progresijom bolesti (*ANKRD1, NCAM1* i *RARRES2*), pridonosi složenosti njezina ekspresijskog profila. Povećana ekspresija markera (*GREM1*) koji upućuje i na moguću povezanost ove subpopulacije s odgovorom osteosarkoma na kemoterapiju. Funkcionalna uloga navedenih gena i njihova moguća povezanost s biološkim obilježjima subpopulacije 6 u kontekstu progresije bolesti detaljnije će se razmotriti u sljedećim poglavljima.

Analiza intratumorske heterogenosti između dviju faza bolesti upućuje na mogućnost promjene sastava tumorske populacije tijekom progresije bolesti i izlaganja terapijskom pritisku, pri čemu pojedine stanične subpopulacije mogu steći selektivnu prednost zbog povećane sposobnosti preživljavanja i prilagodbe. U tom kontekstu, isključiva pojavnost subpopulacije 6 u uzorku recidiva posebno je značajna jer njezin ekspresijski profil objedinjuje obilježja povezana s tumorskom matičnošću, staničnom plastičnošću, remodeliranjem citoskeleta i migracijskim potencijalom. Takva kombinacija obilježja mogla bi upućivati na staničnu populaciju sposobnu prilagoditi se promijenjenim uvjetima tumorskog mikrookoliša, preživjeti terapijski pritisak i sudjelovati u ponovnom uspostavljanju tumorskog rasta.

Kako bi se ispitala hipoteza da stanice s obilježjima tumorske matičnosti mogu pridonijeti nastanku recidiva zahvaljujući sposobnosti samoobnavljanja, prilagodbe i preživljavanja nakon terapije, iz parentalne stanične kulture izdvojena je populacija stanica uzgojem u obliku sferoida. Ovom je metodom obogaćena populacija stanica s obilježjima matičnosti, koja je potom korištena u daljnjim *in vitro* ispitivanjima. Postojanje matičnih stanica

u osteosarkomu prvi su identificirali Gibbs i suradnici (2025.), koji su pokazali da subpopulacija stanica iz ljudskih uzoraka osteosarkoma i staničnih linija može formirati sarkosfere ili osteosfere u uvjetima bez seruma, što ukazuje na njihov matični fenotip [162]. Mnogo je istraživanja potvrdilo ove nalaze u različitim staničnim linijama sarkoma [163,164]. Samu metodologiju izolacije i opsežnu karakterizaciju TMS iz osteosarkoma detaljno su opisali Palmini i suradnici (2016.) koji su potvrdili ekspresiju mezenhimskih markera i gena povezanih s matičnošću. Pokazali su i da izolirane stanice mogu diferencirati u osteogenu i adipogenu liniju, što potvrđuje njihovu multipotentnost i opravdanost metode uzgoja u sferama za izolaciju TMS-a [165]. TMS odlikuju se sposobnošću preživljavanja i samoobnavljanja čak i u uvjetima nepovoljnih za adheziju, zahvaljujući unutarnjim signalnim mehanizmima i otpornosti na anoikis. Za razliku od njih, diferencirane tumorske stanice, koje ovise o signalima iz izvanstaničnog matriksa i adheziji, ne preživljavaju u takvim uvjetima zbog aktivacije apoptoze [166]. Tako izolirana prva generacija matičnih stanica koristila se u daljnjim funkcionalnim istraživanjima u uvjetima *in vitro* koja su potkrijepljena molekularnim nalazima transkriptoma na razini pojedinačne stanice.

5.2. Fenotipska plastičnost tumorskih matičnih stanica očituje se kroz različite obrasce stanične organizacije i rasta

Biofizička analiza pokazala je da sferoidi dobiveni iz uzorka recidiva imaju značajno nižu masenu gustoću, unatoč većem promjeru i masi, u usporedbi sa sferoidima dobivenima iz uzorka pri dijagnozi. Ova razlika upućuje na promjenu fizikalnih svojstava i organizacije sferoida tijekom progresije bolesti. Sferoidi sličnih dimenzija mogu se razlikovati po staničnom sastavu, proliferacijskom i metaboličkom stanju stanica te taloženju izvanstaničnog matriksa, zbog čega sama veličina nije dovoljna za njihovu cjelovitu fizikalnu karakterizaciju [167]. Stoga istodobno mjerenje promjera, mase i masene gustoće omogućuje detaljniju procjenu fizikalnih svojstava sferoida i njihovih promjena tijekom rasta. Iako su brojna istraživanja povezala veću kompaktnost i gustoću sferoida s povećanom malignošću, rezistencijom na lijekove i aktivacijom signalnih putova povezanih s preživljavanjem stanica [36,37], noviji dokazi upućuju na to da i niža gustoća može biti obilježje agresivnih tumora. Primjerice, pokazano je da tumorske stanice koje prolaze kroz mehaničku promjenu, obilježenu smanjenom zbijenošću i gustoćom, pokazuju veću fluidnost i invazivnost [168,169]. Slično tome, Pandey i suradnici (2024.) pokazali su da mehanička kompresija može povećati pokretljivost stanica

unutar sferoida karcinoma dojke i njihovu invaziju u kolagenski matriks [170]. Dodatno, istraživanje van der Neta i suradnika (2024.) pokazalo je da interakcije tumorskih stanica s izvanstaničnim matriksom, zajedno s čimbenicima povezanim s EMT-om, mogu pridonijeti promjenama u organizaciji sferoida i nastanku invazivnih staničnih stanja [171]. U svjetlu tih nalaza, niža masena gustoća sferoida dobivenih iz uzorka recidiva mogla bi odražavati promjene u njihovoj unutarnjoj organizaciji i moguću prilagodbu mehaničkim uvjetima koja pogoduje migracijskom fenotipu. Ovi biološko-mehanički uvidi u sferoide ukazuju na potencijalnu povezanost između gustoće i mehaničkih svojstava tumorskih sferoida te fenotipske prilagodbe TMS, što se dalje ogleda u njihovoj migracijskoj i invazivnoj sposobnosti tijekom progresije bolesti. Praćenje morfoloških promjena TMS kroz različite kliničke faze osteosarkoma pruža vrijedan uvid u adaptivnu dinamiku tumorskih fenotipova i njihovu sposobnost preživljavanja pod terapijskim pritiskom.

Holografska analiza TMS-a pokazala je smanjenje stanične debljine, što upućuje na formiranje nepravilnog i spljoštenijeg fenotipa s mezenhimskom orijentacijom. Ovaj fenotip povezan je s većom mobilnošću i povećanim invazivnim potencijalom stanica. Migratorni i invazivni karakter tumorskih stanica temelji se na složenoj reorganizaciji citoskeleta i promjeni stanične adhezije, što omogućuje aktivno kretanje kroz tkivo i probijanje bazalnih membrana [172]. Ovi rezultati u skladu su s prethodnim istraživanjima koja su pokazala da izduženi i heterogeni oblik stanica korelira s povećanim metastatskim kapacitetom u osteosarkomu [173]. Također, pokazalo se da invazivne stanice često gube staničnu debljinu i površinsku uniformnost kako bi se lakše prilagodile mikrookolišu i migracijskim izazovima [174]. Istraživanje koje su Gou i suradnici proveli 2017. godine koristilo kvantitativno fazno snimanje za detaljnu analizu pojedinačnih stanica u adherentnoj kulturi, usporedilo je slabo i visoko invazivne subpopulacije. Rezultati su pokazali da invazivne stanice gube kompaktnu morfologiju kroz povećano lateralno širenje na podlozi, smanjenje optičke debljine i faznog pomaka, te izraženiju izduženost i asimetriju oblika [175]. Ove morfološke promjene odražavaju redistribuciju stanične mase i remodeliranje aktinskog citoskeleta, što rezultira smanjenom mehaničkom krutošću i većom sposobnošću deformacije tijekom migracije, a time i povećanim invazivnim potencijalom. Porast invazivnosti u tumorskim modelima ne prati pojavu jednog dominantnog oblika stanica, već se očituje kroz povećanu morfološku heterogenost unutar stanične populacije. Ova raznolikost omogućuje tumorskim stanicama veću fleksibilnost i sposobnost prilagodbe različitim uvjetima mikrookoliša, čime se dodatno pojačava njihov invazivni kapacitet [176].

U prilog tome ide povišena ekspresija gena povezanih s remodeliranjem staničnog citoskeleta, mehanotransdukcijom, staničnom adhezijom i regulacijom motiliteta. Takve promjene mogu odražavati funkcionalno preoblikovanje tumorskih stanica prema fenotipu koji karakteriziraju veća plastičnost, pokretljivost i sposobnost invazije. Intermedijarni filament *VIM* važan je strukturni element mezenhimskog citoskeleta koji doprinosi mehaničkoj stabilnosti i fleksibilnosti stanice. Njegova povećana ekspresija često se povezuje s mezenhimskim fenotipom i promjenama staničnog oblika, koje mogu biti praćene povećanom migracijskom i invazivnom sposobnošću. U osteosarkomu je pokazano da promjene u organizaciji aktinskog citoskeleta i mehaničkim svojstvima stanica koreliraju s njihovim metastatskim potencijalom [177]. Nadalje, analiza genske ekspresije u osteosarkomu identificirala je *VIM* kao jedan od gena relevantnih za molekularnu karakterizaciju i procjenu progresije bolesti [178]. U skladu s tim nalazima, Cui i suradnici (2025.) izvijestili su o povećanoj ekspresiji *VIM* u staničnim linijama osteosarkoma u odnosu na normalne osteoblaste te pokazali da utišavanje njegova izražaja smanjuje proliferaciju i migraciju tumorskih stanica [179].

Na tu strukturnu osnovu nadovezuju se *RAC1* i *CDC42*, koji reguliraju prostornu organizaciju aktina i time omogućuju da se promjena citoskeletne arhitekture pretvori u konkretnu promjenu oblika stanice. *RAC1* je važan regulator stvaranja lamelipodija na vodećem rubu stanice. U osteosarkomskim stanicama *RAC1* sudjeluje u organizaciji signalnog sustava na vodećem rubu i stvaranju lamelipodija potrebnih za usmjereno kretanje [180]. S druge strane, *CDC42*, iako je poznat kao regulator staničnog polariteta i stvaranja filopodija. Iako u ovom istraživanju nije pokazao statistički značajnu promjenu ekspresije tijekom progresije bolesti, njegova ekspresija u oba uzorka bila je visoka. Prethodna istraživanja povezala su njegovu aktivaciju s migracijskim i invazivnim svojstvima osteosarkomskih stanica. Tako je u visoko metastatskom modelu osteosarkoma aktivacija *CDC42* bila povezana s fibroblastičnom morfologijom, stvaranjem filopodija i mezenhimskim načinom migracije [181,182]. Pojačana ekspresija *RAC1* uz istodobnu visoku ekspresiju *CDC42* stoga može biti značajna u kontekstu regulacije procesa kojima se stanica polarizira, izdužuje i oblikuje asimetrične protruzije. Drugim riječima, ovi geni sudjeluju u regulaciji reorganizacije citoskeleta i promjena stanične morfologije koje omogućuju uspostavu stanične polarnosti, oblikovanje vodećeg ruba i razvoj protruzija uključenih u migraciju tumorskih stanica. Funkcionalnu poveznicu između signalizacije RAC1/CDC42 i reorganizacije aktina predstavlja PAK1. Kao nizvodni efektor Rho-obitelji GTPaza, PAK1 sudjeluje u regulaciji aktinske dinamike, adhezije i motiliteta. U osteosarkomu je pokazano da aktivacija *PAK1* povećava polimerizaciju aktina i motilitet

stanica, dok njegovo utišavanje smanjuje migraciju i adheziju te razvoj plućnih metastaza [183]. U kontekstu uzorka recidiva, povišena ekspresija *PAK1* može se stoga promatrati zajedno s promjenama ekspresije *RAC1* i *CDC42* kao dio istog funkcionalnog modula. Njegova važnost pritom nije samo u povećanju sposobnosti kretanja, već u omogućavanju dinamičnog preoblikovanja aktinske mreže koje je potrebno da stanica promijeni svoj oblik, uspostavi polaritet i održava migracijske protruzije. Takav mehanizam može pridonijeti fenotipu u kojem stanice postaju izduženije i prostorno rasprostranjenije, što je karakteristika mezenhimskog načina migracije i što je uočeno u ovom istraživanju. Na ovu os nadovezuje se *FSCN1*, koji kodira za fascin-1, protein odgovoran za organizaciju aktinskih filamenata u čvrste paralelne snopove karakteristične za filopodije i druge migracijske protruzije. Za razliku od VIM-a, koji daje strukturnu i mehaničku potporu stanici, FSCN1 omogućuje precizno organiziranje aktina u specijalizirane strukture koje mijenjaju konturu stanice i omogućuju joj aktivnu interakciju s okolinom. U osteosarkomu je povećana ekspresija *FSCN1* povezana s većom migracijskom sposobnošću, aktivnošću MMP-9, lošijim preživljenjem te povećanim stvaranjem plućnih metastaza [184]. U kombinaciji s *RAC1, CDC42 i PAK1, FSCN1* stoga može predstavljati završnu strukturnu komponentu programa koji omogućuje formiranje i stabilizaciju staničnih protruzija. Takva reorganizacija može rezultirati promjenom geometrije stanice prema izduženijem i polariziranijem obliku, čime se povećava njezina sposobnost usmjerenog kretanja kroz izvanstanični prostor.

Istodobno, promjena oblika stanice zahtijeva i remodeliranje njezinih kontakata s podlogom. U tom kontekstu posebno su relevantni *PXN, SRC i VCL*, koji povezuju aktinski citoskelet s fokalnim adhezijama i izvanstaničnim matriksom. *PXN* kodira pakilin, adaptorski protein fokalnih adhezija koji povezuje integrinske i citoskeletne signalne putove. Njegova funkcionalna povezanost sa kinazama SRC osobito je značajna u osteosarkomu, gdje je pokazano da su aktivnost *SRC* i pakilin povezani s metastatskim potencijalom, dok inhibicija *SRC*-a smanjuje fosforilaciju pakilina i motilitet visoko metastatskih osteosarkomskih stanica [185]. Ova os može se stoga povezati s promjenom oblika na način da omogućuje stanici da dinamički uspostavlja i otpušta kontakte s izvanstaničnim matriksom. Takva dinamika fokalnih adhezija nužna je za širenje stanice po podlozi, formiranje vodećeg ruba i pomicanje staničnog tijela prema naprijed. *VCL* dodatno nadopunjuje ovaj sustav jer vinkulin povezuje aktinske filamente s komponentama fokalnih adhezija i sudjeluje u prijenosu mehaničkih sila. Njegova lokalizacija u fokalnim adhezijama te regulacija njegovog regrutiranja mehaničkim silama pokazuju da VCL predstavlja važnu poveznicu između organizacije citoskeleta i načina na koji stanica ostvaruje kontakt s podlogom [186,187]. U kontekstu recidivnog osteosarkoma,

promjena ekspresije *VCL* zajedno s *PXN* i *SRC* može stoga biti u skladu s dinamičnijom organizacijom fokalnih adhezija. Takva organizacija omogućuje stanici da istodobno mijenja područja prianjanja i raspodjelu citoskeletne napetosti, što je potrebno za širenje i izduživanje stanice te za učinkovito kretanje kroz mikrookoliš.

Posljednju komponentu ovog morfološkog programa predstavlja *EZR,* koji kodira za ezrin, protein obitelji ERM koji povezuje aktinski citoskelet s plazmatskom membranom i tako sudjeluje u regulaciji staničnog oblika. Njegova je uloga u progresiji osteosarkoma dobro dokumentirana. Povećana ekspresija *EZR*-a povezana je s većim metastatskim potencijalom i lošijim ishodom, dok smanjenje njegove ekspresije može inhibirati metastaziranje [188]. Također, pokazano je da EGF inducira fosforilaciju ezrina, što potiče promjenu morfologije osteosarkomskih stanica iz zaobljenog u vretenasti oblik te povećava njihovu migraciju i motilitet [189]. EZR stoga predstavlja važnu poveznicu između reorganizacije aktinskog citoskeleta, promjena stanične morfologije i migracijskog potencijala. Njegova povezanost s Rho-GTPaznom signalizacijom, uključujući RAC1, dodatno podupire njegovu ulogu u regulaciji citoskeletne dinamike.

Gen *PALMD,* koji kodira za citosolni protein palmdelfin, povezan je s regulacijom stanične morfologije, organizacije citoskeleta i staničnom adhezijom, što je pokazano u endotelnim stanicama [190]. Osim toga, eksperimentalna istraživanja pokazala su da *PALMD* potiče diferencijaciju mioblasta i sudjeluje u regeneraciji skeletnog mišića. S obzirom na izrazito promijenjenu ekspresiju *PALMD*-a u uzorku recidiva i istodobno uočene morfološke promjene, ovaj nalaz mogao bi odražavati promjene u regulaciji stanične arhitekture i diferencijacijskih programa [191].

Ovakva interpretacija rezultata, prema kojoj stanice recidiva pokazuju izraženiji mezenhimski fenotip, slabiju međustaničnu povezanost unutar sferoida te transkriptomski profil koji podupire uočena morfološka obilježja, osobito je zanimljiva u kontekstu tumorske progresije. Navedene promjene mogle bi odražavati prilagodbu tumorskih stanica na promijenjene uvjete mikrookoliša te potencijalno pridonijeti stjecanju staničnih svojstava povezanih s povećanom invazivnošću.

5.3. Pojačan migracijski potencijal ostvaren visokom plastičnosti i procesima sličnim epitelno-mezenhimskoj tranziciji

Potencijal inicijacije tumora procijenjen je testom generiranja sferoida. Udio sferoidnih stanica u oba uzorka bio je podjednak te je iznosio manje od 1%, što je u skladu s pretpostavkom

da TMS čine vrlo malu subpopulaciju unutar tumorske mase. Ovi rezultati podudaraju se s prethodnim istraživanjima na primarnim stanicama osteosarkoma i staničnim linijama, uključujući MG63, gdje je udio sferoida iznosio između 0,1 i 1% [192]. Slična zastupljenost TMS zabilježena je i u karcinomu dojke, dok je u karcinomu malih stanica pluća njihov udio još niži, često ispod 0,1% [193]. Međutim, sve je više dokaza da zastupljenost TMS značajno varira među različitim tipovima tumora. Primjerice, u raku debelog crijeva njihov udio iznosi oko 2,5 %, dok u glioblastomu može varirati u širokom rasponu od 1 do 50 % [194,195]. Ove razlike odražavaju specifičnosti biologije pojedinih tkiva, ali i različitu hijerarhijsku organizaciju tumora. Iako u ovom istraživanju nije utvrđena razlika u udjelu stanica koje formiraju sferoide između uzorka pri dijagnozi i uzorka recidiva, njihova prisutnost u oba uzorka upućuje na postojanje stanične populacije sposobne za rast u uvjetima sferoidne kulture. Ovaj nalaz u skladu je s prisutnošću stanica s obilježjima tumorske matičnosti u objema fazama bolesti, čija bi svojstva samoobnavljanja i prilagodbe mogla imati ulogu u održavanju tumorske populacije i potencijalnom razvoju recidiva. Unatoč širokoj primjeni, test formiranja sferoida ima određena ograničenja. Temeljna pretpostavka da svaka sfera potječe od jedne matične stanice često nije potvrđena u stvarnim eksperimentalnim uvjetima. Nadalje, broj i veličina sfera mogu biti pod utjecajem različitih čimbenika, uključujući agregaciju stanica, gustoću zasijavanja, proliferativni status te uvjete kulture i korišteni protokol. Zbog toga dobiveni rezultati prije odražavaju relativni adaptivni potencijal stanica u uvjetima *in vitro* nego njihov stvarni biološki kapacitet *in vivo*. Analiza staničnog ciklusa pokazala je heterogenu raspodjelu stanica uz dominaciju G1 faze, prve faze interfaze staničnog ciklusa, tijekom koje stanica raste, obavlja svoje funkcije i priprema se za replikaciju DNA. Međutim, važno je naglasiti i da ovaj test formiranja sferoida primarno detektira stanice koje su u proliferativnom stanju. Budući da se TMS često nalaze u stanju mirovanja, njihov stvarni udio može biti podcijenjen, što može dovesti do lažno negativnih rezultata. Stoga se test formiranja sferoida treba koristiti prvenstveno za usporedbe unutar istog eksperimentalnog sustava, uz jasno razumijevanje njegovih ograničenja povezanih s klonalnošću, diferencijacijskim stanjem i proliferativnim statusom stanica [129].

Testom zarastanja rane utvrđena je veća migracijska sposobnost stanica recidiva, koje su nakon 48 h prekrile približno 50 % površine rane, dok su stanice uzorka dijagnoze pokazale znatno slabiju migraciju. Ovaj se nalaz može povezati s promjenama ekspresije transkripcijskih čimbenika uključenih u regulaciju EMT, pri čemu je u uzorku recidiva zabilježena povećana ekspresija *SNAI2*, dok su *TWIST1* i *ZEB1* bili podjednako zastupljeni u uzorcima dijagnoze i recidiva, bez statistički značajnih razlika u njihovoj ekspresiji. Ovi čimbenici reguliraju

staničnu adheziju, organizaciju citoskeleta i migraciju te mogu zajednički poticati staničnu plastičnost i invazivna svojstva [196]. U osteosarkomu je *SNAI2* povezan s reorganizacijom aktinskog citoskeleta i povećanom migracijom i invazijom, dok je smanjenje njegove ekspresije povezano s ponovnom ekspresijom E-kadherina i jačanjem međustaničnih veza [197,198]. Pojačana zastupljenost proteina Snail istraživana je i kao potencijalni pokazatelj terapijskog odgovora i kliničkog ishoda [199], a u pedijatrijskom osteosarkomu njegova je pozitivna ekspresija povezana s višestrukim i udaljenim koštanim metastazama [200]. Slično tome, *TWIST1 i ZEB1* povezani su sa smanjenom ekspresijom E-kadherina, izraženijim mezenhimskim obilježjima i povećanom staničnom pokretljivošću; pri čemu je *ZEB1* povezan i s metastatskim potencijalom [65,201,202]. Iako u ovom istraživanju nije utvrđen značajan porast ekspresije *TWIST1* i *ZEB1* u uzorku recidiva, njihova visoka zastupljenost u oba uzorka upućuje na moguću kontinuiranu uključenost ovih regulatora u održavanje mezenhimskih obilježja tumorskih stanica. Nasuprot tome, povećana ekspresija *SNAI2* u recidivu može upućivati na njegovu dodatnu ulogu u regulaciji stanične plastičnosti i migracijskih svojstava. Zajedno s rezultatima testa zarastanja rane, ovi nalazi upućuju na moguću povezanost promjena u regulatornim mehanizmima procesa sličnih EMT-i s povećanom migracijskom sposobnošću stanica recidiva, pri čemu ih, s obzirom na mezenhimsko podrijetlo osteosarkoma, treba tumačiti kao preoblikovanje postojećih mezenhimskih svojstava, a ne kao klasičnu EMT.

Uz promjene slične EMT-i, u uzorku recidiva uočena je povišena ekspresija molekula uključenih u interakcije stanica s izvanstaničnim matriksom i međustaničnu adheziju, što upućuje na promijenjenu regulaciju adhezijskih i migracijskih svojstava. Posebno se ističe *ITGB1*, koji kodira za podjedinicu β1 integrina i posreduje u prijenosu signala između stanice i ECM-a, povezujući izvanstanične podražaje s reorganizacijom citoskeleta, staničnom pokretljivošću, preživljavanjem i fenotipskom plastičnošću [203]. Eksperimentalno je pokazano da smanjenje ekspresije integrina β1 može umanjiti migraciju i invaziju te ograničiti metastatsku kolonizaciju pluća, dok su promjene integrinske signalizacije u osteosarkomu povezane s metastatskim potencijalom i kliničkim ishodom [204]. Povišena ekspresija *N-kadherina* u recidivu također može upućivati na promijenjenu regulaciju međustaničnih kontakata. U kombinaciji sa smanjenjem E-kadherina, promijenjena ravnoteža kadherina može pogodovati preuređenju stanične adhezije te povećanoj migraciji i invaziji, što je povezano s metastatskim ponašanjem osteosarkoma [205]. Uz promjene u ekspresiji kadherina i integrina, povećana ekspresija *NCAM1*, koji kodira za neuralnu staničnu adhezijsku molekulu 1, može biti povezana s promijenjenim migracijskim svojstvima stanica recidivnog osteosarkoma. Nedavno istraživanje pokazalo je da je povećana ekspresija *NCAM1* povezana s nepovoljnijim

preživljenjem bolesnika, dok je njegova pojačana ekspresija poticala proliferaciju, migraciju i invaziju tumorskih stanica. Autori su također povezali *NCAM1* sa signalizacijom ERK5/NF-κB i otpornošću na feroptozu, što upućuje na njegovu moguću ulogu u progresiji osteosarkoma i prilagodbi tumorskih stanica na nepovoljne uvjete [206].

Iako je *ALPL* marker osteogene diferencijacije, njegova ekspresija u populaciji stanica s obilježjima matičnosti u uzorku recidiva može odražavati fenotipsku plastičnost tumorskih stanica, koje mogu istodobno zadržavati obilježja matičnosti i aktivirati pojedine linijski specifične razvojne programe bez postizanja terminalne diferencijacije [207]. Sličan obrazac može se razmotriti i za gene povezane s miogenim razvojem i reorganizacijom citoskeleta, čija je ekspresija zabilježena gotovo isključivo u recidivu. Povećana ekspresija *MYOD1* i *PAX7* uz diferencijalnu ekspresiju *DES*, mogla bi upućivati na aktivaciju aberantnih razvojnih programa i prisutnost stanica s progenitorskim obilježjima, a ne nužno na uspostavu zrelog mišićnog fenotipa [208–210]. Značajno je da su Dodd i suradnici (2015.) pokazali kako *PAX7* i *MYOD1* mogu poticati metastaziranje sarkoma putem regulacije pro-metastatske miR-182, iako taj mehanizam nije izravno potvrđen u osteosarkomu [211]. Desmin, kodiran genom *DES*, sudjeluje u organizaciji i stabilizaciji citoskeleta, no njegova povezanost s invazivnošću ili lošijom prognozom osteosarkoma nije dovoljno razjašnjena [212]. Diferencijalna ekspresija *CDH15*, koji kodira za M-kadherin, može upućivati na promjene u adhezijskim i miogenim diferencijacijskim programima. Iako je *CDH15* prvenstveno povezan s mioblastnom diferencijacijom i staničnom adhezijom, njegova je ekspresija zabilježena i u staničnoj liniji osteosarkoma Saos-2. Međutim, njegova uloga u progresiji osteosarkoma još nije razjašnjena. Povećana ekspresija *MYL9*, koji sudjeluje u regulaciji aktomiozinske kontrakcije, dodatno upućuje na promjene u staničnoj kontraktilnosti i migracijskim svojstvima, što je u skladu s nalazima u osteosarkomu [213,214]. Naposljetku, povećana ekspresija *ASB5* u recidivu može biti relevantna s obzirom na njegovu povezanost s miogenom plastičnošću i agresivnijim tumorskim stanicama, premda njegova funkcionalna uloga u osteosarkomu još nije razjašnjena [215,216]. Ovakva višelinijska plastičnost, osobito izražena u uzorku recidiva tumora, može upućivati da selekcijski pritisci terapije i mikrookoliša mogu potaknuti nastanak stanica s povećanom funkcionalnom fleksibilnošću.

Važan aspekt progresije osteosarkoma u recidivu predstavlja i remodeliranje ECM-a. ECM nije pasivna struktura, već aktivni regulator tumorskog ponašanja koji modulira proliferaciju, invaziju i signalizaciju tumorskih stanica [217]. U tom procesu važnu ulogu ima CD44, koji sudjeluje u interakcijama stanica s izvanstaničnim matriksom. Iako u ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna promjena njegove ekspresije tijekom progresije

bolesti, u osteosarkomu je njegova ekspresija povezana s metastaziranjem i nepovoljnijim kliničkim ishodima [218,219]. Te interakcije povezane su s djelovanjem metaloproteinaza matriksa, koje razgrađuju komponente ECM-a i olakšavaju prodor tumorskih stanica kroz okolno tkivo. Među njima se ističe *MMP2*, čija je aktivnost u osteosarkomu povezana s invazivnošću i slabijim odgovorom na kemoterapiju [220]. Proteolitičko remodeliranje dodatno može poticati *MMP14*, membranski vezanu metaloproteinazu koja sudjeluje i u aktivaciji *MMP2*. U osteosarkomskim stanicama signalizacija WNT5A/SRC/ERK povezana je s povećanom ekspresijom *MMP14* te pojačanom migracijom i invazijom [221]. Sličnu ulogu u razgradnji matriksa ima katepsin B, kodiran genom *CTSB*, čije je eksperimentalno utišavanje smanjilo pokretljivost i invazivnost osteosarkomskih stanica [222]. Osim razgradnje ECM-a, za migraciju je važna i njegova organizacija, u kojoj sudjeluje fibronektin, kodiran genom *FN1*. Njegova povećana ekspresija u recidivu mogla bi odražavati promijenjene interakcije stanica s matriksom, a eksperimentalni nalazi u osteosarkomu povezuju fibronektin s migracijskim i invazivnim svojstvima tumorskih stanica [223]. Uz *FN1*, promijenjenu organizaciju izvanstaničnog matriksa u recidivu mogla bi odražavati i povećana ekspresija *POSTN* i *SPARC*, koji sudjeluju u regulaciji interakcija stanica s ECM-om. U osteosarkomu je *POSTN* eksperimentalno povezan s proliferacijom, migracijom i invazijom tumorskih stanica te s agresivnijim kliničkim obilježjima [224] dok je povećana ekspresija *SPARC* povezana s plućnim metastazama [225,226]. Zajedno s povećanom ekspresijom *MMP2*, *MMP14* i *CTSB*, ovi nalazi upućuju na istodobne promjene u organizaciji i proteolitičkom remodeliranju matriksa, koje bi mogle pogodovati migracijskim i invazivnim svojstvima stanica recidiva.

Povećana ekspresija gena *RARRES2* i *ANKRD1* te promjene u ekspresiji *CXCL12* i *PTK2* u recidivu osteosarkoma mogu upućivati na promjene u komunikaciji tumorskih stanica s mikrookolišem, održavanju obilježja matičnosti te regulaciji stanične adhezije i migracije. Ma i suradnici (2024.) pokazali su da os IGF-1–RARRES2, potaknuta interakcijom s tumorski povezanim makrofagima, pridonosi održavanju matičnih obilježja stanica osteosarkoma, što bi moglo biti relevantno za razumijevanje recidiva i terapijske otpornosti [227]. S druge strane, *ANKRD1*, koji kodira za protein uključen u stanični odgovor na mehaničke podražaje i regulaciju transkripcije, povezan je s progresijom osteosarkoma putem osi RGMB-AS1/miR-3614-5p. Eksperimentalni nalazi upućuju na to da povećana ekspresija *ANKRD1* može poticati proliferaciju, migraciju i invazivnost tumorskih stanica te smanjiti apoptozu [228]. Uloga kemokina CXCL12 u progresiji tumora složena je i ovisi o vrsti tumora te kontekstu tumorskog mikrookoliša. U stanicama raka prostate Chinni i suradnici (2006.) pokazali su da aktivacija signalnog puta CXCL12/CXCR4 potiče signalizaciju putem Akt-1 i povećava ekspresiju i

sekreciju MMP-9, čime pridonosi migraciji i invazivnosti tumorskih stanica u kontekstu koštanog mikrookoliša [229]. Slični učinci opisani su i u osteosarkomu. Perissinotto i suradnici (2005.) pokazali su da signalizacija CXCL12/CXCR4 potiče migraciju i adheziju stanica osteosarkoma te povećava proizvodnju MMP-9, dok je inhibicija *CXCR4* smanjila razvoj plućnih metastaza u eksperimentalnom mišjem modelu [230]. Međutim, učinak *CXCL12* nije jednoznačan. Neklyudova i suradnici (2016.) pokazali su da promjene u ekspresiji *CXCL12* mogu različito utjecati na rast primarnog tumora i metastaziranje osteosarkoma, što upućuje na kontekstualnu ulogu ove signalne osi [231]. U skladu s tom složenošću, analiza uzoraka primarnog osteosarkoma koju su proveli Baumhoer i suradnici (2012.) pokazala je da je snažna ekspresija *CXCL12* povezana s povoljnijim kliničkim ishodom [232,233]. Stoga, iako eksperimentalni nalazi upućuju na to da signalizacija CXCL12/CXCR4 može poticati migraciju i metastaziranje osteosarkoma, njezin klinički značaj ovisi o biološkom kontekstu te se ne može tumačiti kao jednoznačno nepovoljan prognostički čimbenik. Gen *PTK2* kodira fokalnu adhezijsku kinazu (FAK), signalni protein koji sudjeluje u regulaciji stanične adhezije, preživljenja i migracije. U osteosarkomu je povećana ekspresija *FAK*-a povezana s uznapredovalom bolešću i pojavom recidiva. Nadalje, eksperimentalna istraživanja pokazala su da utišavanje *PTK2* smanjuje proliferaciju, migraciju i invazivnost tumorskih stanica te potiče apoptozu, što upućuje na moguću ulogu *FAK*-a u održavanju agresivnog fenotipa osteosarkoma [234,235].

Zajedno, navedene promjene ekspresije upućuju na kompleksno preoblikovanje molekularnog profila recidivnog osteosarkoma, obilježeno promjenama u reorganizaciji citoskeleta, procesima sličnim EMT-u, regulaciji stanične adhezije, remodeliranju izvanstaničnog matriksa i komunikaciji s tumorskim mikrookolišem. Takve promjene mogle bi pridonositi povećanoj fenotipskoj plastičnosti i migracijskom potencijalu tumorskih stanica, što je u skladu s izraženijom migracijom uočenom u funkcionalnom testu.

5.4. Neograničen replikacijski potencijal ostvaren alternativnim mehanizmima produljenja telomera

U analiziranom modelu osteosarkoma, qPCR analizom nije utvrđena ekspresija transkripta hTERT ni u uzorku dijagnoze ni u uzorku recidiva. Međutim, analiza scRNA-seq pokazala je statistički značajno povećanje ekspresije *hTERT* s napredovanjem bolesti, iako je signal bio ograničen na vrlo mali broj stanica. Ovaj nalaz upućuje na mogućnost da se tijekom progresije bolesti u maloj subpopulaciji tumorskih stanica aktivira program povezan s

telomeraznim mehanizmom održavanja telomera, što se ne može isključiti unatoč nedetektibilnoj ekspresiji u qPCR analizi. Ovakvo tumačenje podupiru istraživanja na osteosarkomu koja su pokazala da je telomerazna aktivnost češća u metastatskim nego u primarnim tumorskim uzorcima, što upućuje na moguću ulogu njezine aktivacije u progresiji bolesti i stjecanju invazivnog potencijala [236]. Međutim, novija istraživanja pokazala su da unutar istog tumora mogu postojati različite stanične subpopulacije koje se oslanjaju na različite mehanizme održavanja telomera [237]. U skladu s time, nalazi ovog istraživanja ukazuju mogućnost uključenosti telomerazno-neovisnih mehanizama održavanja telomerne duljine, među kojima je najvažniji mehanizam alternativnog produljenja telomera (ALT), čiji će se mogući pokazatelji razmotriti u nastavku.

U tom kontekstu, povećana zastupljenost *PML*-a može biti povezana s aktivnošću mehanizma ALT-a. PML je glavna strukturna komponenta ALT-povezanih tjelešaca PML (APB), nuklearnih struktura koje povezuju PML s telomernim regijama i predstavljaju mikrookoliš pogodan za telomernu rekombinaciju i sintezu DNA. APB-i se stoga smatraju jednim od karakterističnih obilježja ALT-pozitivnih stanica, a njihova identifikacija kombinacijom imunofluorescencije PML-a i telomerne analize FISH koristi se kao jedan od pristupa detekciji fenotipa ALT. Eksperimentalni podaci dodatno pokazuju da PML može potaknuti stvaranje APB-a i ALT-povezanu sintezu telomerne DNA, dok se u APB-ovima odvijaju procesi povezani s BLM-ovisnom replikacijom DNA i odgovorom na replikacijski stres [238]. Iako u ovom istraživanju nije provedena izravna kolokalizacijska analiza PML-a i telomernih sekvenci kojom bi se potvrdilo postojanje APB-a, povećana ekspresija PML-a i prisutnost nuklearnih tjelešaca PML imunocitokemijskom metodom, u kombinaciji s eksperimentalno potvrđenom odsutnošću telomerazne aktivnosti, predstavljaju nalaz kompatibilan s mogućim fenotipom ALT. Stoga se povišena ekspresija *PML* u ovom kontekstu može promatrati kao jedan od elemenata koji podupiru hipotezu o telomerazno-neovisnom održavanju telomera, ali sam po sebi ne može biti smatran dokazom aktivnosti ALT.

Važnu ulogu u interpretaciji ovih nalaza imaju *ATRX, DAXX* i *TOP3A*, koji su povezani s regulacijom telomerne kromatinske strukture i alternativnim mehanizmima održavanja telomera. *ATRX* i *DAXX* sudjeluju u regulaciji kromatina i depoziciji histonske varijante H3.3 na telomernim i subtelomernim regijama, a njihov je gubitak funkcije često povezan s fenotipom ALT. Međutim, ALT u osteosarkomu nije nužno povezan s gubitkom funkcije *ATRX/DAXX*, što potvrđuju podaci o ALT-pozitivnim tumorima s očuvanim kompleksom ATRX/DAXX. U tom je kontekstu osobito značajan *TOP3A*, čija je amplifikacija u pedijatrijskim osteosarkomima pokazala međusobno isključivu povezanost s inaktivacijom

ATRX, pri čemu je povećana ekspresija *TOP3A* funkcionalno povezana s fenotipom ALT, uključujući sintezu telomerne DNA i regrutaciju BLM-a [239]. U ovim uzorcima povećana ekspresija *ATRX-a* i *DAXX-a*, uz istodobno povećanje *TOP3A*, stoga ne isključuje ALT, već može upućivati na alternativni način održavanja telomera neovisan o gubitku funkcije *ATRX/DAXX*. Povećana ekspresija TOP3A može biti relevantna za razmatranje alternativnog produljivanja telomera (ALT), budući da je u pedijatrijskim osteosarkomima utvrđena povezanost amplifikacije i povećane ekspresije ovog gena s ALT-pozitivnim fenotipom. Funkcionalni eksperimenti pritom su pokazali da TOP3A sudjeluje u održavanju ALT-a i sintezi telomerne DNA [239]. U uzorku recidiva povećana ekspresija TOP3A, uz odsutnost detektabilne telomerazne aktivnosti i transkripta *hTERT*, podupire hipotezu o mogućem telomerazno-neovisnom održavanju telomera.

Uočena je povećana ekspresija *BLM-a* i *FANCD2-a,* čiji su proteinski produkti uključeni u održavanje genomske stabilnosti, homolognu rekombinaciju i obradu replikacijskih intermediata. Helikaza BLM ima važnu ulogu u obradi struktura DNA nastalih tijekom homologno-rekombinacijskih procesa na telomerima. U stanicama ALT BLM sudjeluje u obradi intermediata telomerne replikacije DNA, a njegovo djelovanje u APB-ovima povezano je s BIR-ovisnom sintezom telomerne DNA [238]. *FANCD2* je također funkcionalno povezan s procesom ALT. Pokazano je da monoubikuitinirani FANCD2 ograničava BLM-ovisnu telomernu rekombinaciju, dok gubitak *FANCD2* dovodi do pojačanog fenotipa ALT, uključujući povećanje ekstrakromosomskih telomernih molekula DNA i nestabilnost telomera [240]. Povećana ekspresija *BLM-a* i *FANCD2-a* u analiziranim uzorcima stoga je u skladu s pojačanim angažmanom mehanizama za obradu oštećenja DNA i rekombinacijskih intermediata, koji su posebno važni u stanicama koje održavaju telomere mehanizmom ALT. Ipak, sama povećana ekspresija ovih gena ne predstavlja dokaz njihove funkcionalne aktivnosti niti definitivnu potvrdu ALT-a.

Dodatnu poveznicu s telomernim replikacijskim stresom predstavljaju *SMARCAL1* i *RAD1*. SMARCAL1 je DNA-translokaza uključena u remodeliranje zaustavljenih replikacijskih vilica i očuvanje stabilnosti replikacije. Recentni funkcionalni podaci pokazuju da su ALT-pozitivne stanice, uključujući osteosarkomske modele, posebno ovisne o *SMARCAL1-u* te da njegovo smanjenje dovodi do povećanja telomerne štete DNA i nakupljanja jednolančane DNA [241]. Povećana ekspresija *SMARCAL1-a* u ovom istraživanju stoga se može interpretirati kao mogući odgovor na povećano opterećenje replikacijskog aparata i potrebu za stabilizacijom replikacijskih vilica, što je u skladu s biologijom ALT-pozitivnih stanica. S druge strane, RAD1 je sastavni dio kompleksa RAD9–RAD1–HUS1, odnosno 9-1-1

kompleksa DNA-oštećenja, koji sudjeluje u nadzoru integriteta DNA i odgovoru na replikacijski stres. Pokazano je da se ovaj kompleks povezuje s telomerama i sudjeluje u regulaciji telomerne homeostaze, međutim nije specifični marker mehanizma ALT [242]. Iako u ovom istraživanju ekspresija *RAD1* nije pokazala statistički značajnu promjenu u uzorku recidiva u odnosu na uzorak dijagnoze, njegova biološka uloga upućuje na moguću uključenost u mehanizme nadzora DNA i odgovora na replikacijski stres.

Zajedno, odsutnost detektabilne ekspresije transkripta *hTERT*, uz promjene u ekspresiji *PML*, *ATRX*, *DAXX*, *TOP3A*, *BLM*, *FANCD2*, *SMARCAL1* i prisutnost *RAD1*, ukazuje na promjene u procesima povezanim s telomernom homeostazom, kromatinskom organizacijom, homolognom rekombinacijom i odgovorom na replikacijski stres. Pojedini od tih procesa imaju izravnu ulogu u mehanizmu ALT, dok su drugi dio općenitijih sustava održavanja genomske stabilnosti. Stoga ukupni obrazac nalaza podupire hipotezu o mogućem telomerazno-neovisnom održavanju telomera u analiziranom osteosarkomu, ali ne potvrđuje aktivaciju ALT-a. Za pouzdaniju potvrdu potrebne su izravne analize, primjerice detekcija C-kružne telomerne DNA, telomerne heterogenosti ili kolokalizacije PML-a i telomerne DNA.

Funkcionalne implikacije aktivnosti ALT u recidivnim osteosarkomima su višestruke. ALT^+ tumori karakterizirani su izraženom heterogenošću duljine telomera, što je potvrđeno u brojnim studijama na staničnim linijama osteosarkoma, gdje ALT-pozitivne linije pokazuju istovremeno prisutnost vrlo dugih i vrlo kratkih telomera [243,244]. U skladu s time, izrazito kratke telomere utvrđene u ovom istraživanju mogle bi odražavati stanje kritično kratkih telomera, koje se povezuje s mogućim pokretanjem mehanizma ALT iako njegova aktivacija u ovom modelu nije izravno potvrđena [245]. Ovaj naizgled paradoks dobro je opisan u literaturi; ALT ne djeluje uniformno na sve telomere, već selektivno produljuje određene kromosomske krajeve, dok drugi ostaju kratki. Time se održava minimalna duljina potrebna za proliferaciju, uz istovremeno stvaranje visoke telomerne heterogenosti. Takva heterogenost dodatno doprinosi genomskoj nestabilnosti, povećavajući vjerojatnost nastanka kromosomskih aberacija i omogućujući selekciju agresivnih staničnih subpopulacija s povećanim invazivnim i metastatskim potencijalom [246]. Klinički podaci dodatno pokazuju da ALT^+ osteosarkomi imaju izraženiju sklonost recidivu, viši stupanj agresivnosti te smanjenu osjetljivost na konvencionalne terapije, osobito one koje djeluju putem indukcije oštećenja DNA [247]. Istovremeno, njihova ovisnost o homolognoj rekombinaciji i sustavima popravka DNA otvara prostor za razvoj ciljanih terapijskih pristupa, uključujući inhibiciju ključnih komponenti puta ALT. Ovaj mehanizam ne samo da omogućuje održavanje telomera u odsutnosti telomeraze, već istovremeno doprinosi povećanoj genomskoj nestabilnosti i adaptivnoj plastičnosti, čime

izravno podupire razvoj agresivnog i terapijski rezistentnog fenotipa recidivnog osteosarkoma [248]. Važno je naglasiti da mehanizam ALT nije univerzalno prisutan u svim tumorima, već je karakterističan za specifične podtipove, osobito tumore mezenhimskog i neuroektodermalnog podrijetla. U tom kontekstu, osteosarkom se ističe kao jedan od najbolje opisanih modela ALT-pozitivnih tumora, pri čemu se procjenjuje da značajan udio slučajeva, približno 40–60 % koristi ovaj alternativni način [249]. U tom smislu, prisutnost mehanizma ALT u analiziranom recidivnom uzorku ne predstavlja samo molekularni biljeg tumorske progresije, već i funkcionalni pokazatelj sofisticiranih adaptivnih strategija tumorskih stanica. Također, integracija aktivnosti ALT s prethodno opisanim fronotipom sličnom EMT-u i visoko plastičnim fenotipom dodatno naglašava složenost biološkog ponašanja osteosarkoma te ukazuje na potrebu za terapijskim pristupima koji istovremeno ciljaju telomernu stabilnost i staničnu plastičnost.

5.5. Recidiv bolesti obilježen povećanom osjetljivošću na doksorubicin i rezistencijom na cisplatinu i metotreksat

Kemorezistencija predstavlja jedan od glavnih razloga neuspjeha terapije osteosarkoma, osobito u fazi recidiva bolesti [250]. Tradicionalni testovi *in vitro,* bazirani na adherentnim kulturama, često ne prepoznaju ove mehanizme jer ne reproduciraju prostornu organizaciju, mikrookoliš i heterogenost tumora *in vivo*. U ovom istraživanju provedena je usporedba adherentnih i sferoidnih kultura, pri čemu su sferoidi, osobito oni dobiveni iz uzoraka recidiva, pokazali značajno veću otpornost na kemoterapiju. Ovaj nalaz je u skladu s brojnim istraživanjima koja pokazuju da 3D modeli osteosarkoma znatno bolje oponašaju uvjete *in vivo,* uključujući povećanu gustoću ECM-a, ograničenu difuziju lijekova, hipoksiju i metaboličke gradijente [251]. Upravo ti čimbenici stvaraju zaštitni mikrookoliš koji smanjuje penetraciju citostatika i potiče aktivaciju signalnih puteva preživljavanja. U više studija pokazano je da sferoidi osteosarkoma imaju značajno više IC_{50}-vrijednosti za standardne kemoterapeutike u usporedbi s adherentnim kulturama, čime se potvrđuje njihova veća klinička relevantnost [252]. Osim fizičkih barijera, sferoidi omogućuju i razvoj kompleksnih staničnо-staničnih i staničnо-matričnih interakcija, koje aktiviraju signalne puteve poput PI3K/AKT, MAPK i Wnt/β-katenin, poznate po svojoj ulozi u preživljavanju stanica i rezistenciji na terapiju [253]. Također, hipoksični uvjeti unutar sferoida dovode do stabilizacije HIF-1α, što dodatno potiče ekspresiju gena uključenih u angiogenezu, metabolizam i otpornost na lijekove [254]. Sve ove

karakteristike doprinose činjenici da 3D modeli ne predstavljaju samo strukturno, već i funkcionalno relevantniji sustav za proučavanje kemorezistencije.

Osjetljivost stanica osteosarkoma na doksorubicin u 2D kulturama povećavala se tijekom progresije bolesti. U 3D modelu viša koncentracija lijeka učinkovito je smanjila vijabilnost stanica u oba stadija bolesti. Na molekularnoj razini, *TOP2A,* koji kodira jednu od primarnih ciljnih molekula doksorubicina, bio je izrazito eksprimiran u uzorcima dijagnoze i recidiva, bez statistički značajne razlike između njih. Istodobno je u uzorku recidiva zabilježena povećana ekspresija *ALDH1A1* i *PARP1*, što bi moglo upućivati na postojanje mehanizama koji pojedinim tumorskim stanicama omogućuju preživljavanje nakon izlaganja doksorubicinu. *ALDH1A1*, čija se ekspresija povezuje s obilježjima tumorske matičnosti, sudjeluje u metaboličkoj detoksifikaciji i zaštiti od oksidativnog stresa. Istraživanja su pokazala da stanice s izraženom aktivnošću ALDH-a mogu učinkovitije neutralizirati reaktivne kisikove vrste i citotoksične metabolite, uključujući one povezane s djelovanjem doksorubicina [255–258]. S druge strane, *PARP1* sudjeluje u odgovoru na oštećenje DNA i njezinu popravku, što bi također moglo pridonijeti preživljavanju tumorskih stanica nakon terapije. Ovakvi nalazi u skladu su s istraživanjima koja pokazuju da doksorubicin, unatoč učinkovitom uklanjanju većine tumorskih stanica, ne mora jednako učinkovito eliminirati subpopulacije s obilježjima TMS [258,259]. U kontekstu mogućih mehanizama kemorezistencije, važno je istaknuti i transportere iz obitelji ABC, koji mogu sudjelovati u izbacivanju citostatika iz stanice. Međutim, u ovom istraživanju ekspresija *ABCC1* bila je statistički značajno smanjena u uzorku recidiva, što ne podupire njegovu ulogu u pojačanom izbacivanju doksorubicina kao mogućem mehanizmu smanjene osjetljivosti. Unatoč visokoj učinkovitosti doksorubicina, povećana ekspresija *ALDH1A1* i *PARP1* mogla bi upućivati na prisutnost staničnih subpopulacija s obilježjima tumorske matičnosti, koje bi zahvaljujući metaboličkoj detoksifikaciji i odgovoru na oštećenje DNA mogle zadržati sposobnost preživljavanja i ponovnog rasta nakon terapije te potencijalno pridonijeti razvoju recidiva. Dodatno, povećana ekspresija *GREM1* u uzorku recidiva može upućivati na promjene molekularnih karakteristika tumora tijekom njegove evolucije. Zanimljivo je da je nedavno istraživanje na modelima osteosarkoma pokazalo kako *GREM1* može povećati osjetljivost tumorskih stanica na doksorubicin putem mehanizama povezanih s nakupljanjem reaktivnih kisikovih spojeva i indukcijom apoptoze [260]. Također, Neckmann i suradnici (2019.) povezali su povećanu ekspresiju *GREM1* s metastatskim potencijalom i lošijom prognozom u ER-negativnom raku dojke [261]. Stoga se uloga *GREM1* u analiziranom modelu ne može jednoznačno povezati s kemorezistencijom, već je treba promatrati u kontekstu njegove moguće uloge u tumorskoj progresiji.

Kod cisplatina, tijekom progresije bolesti nije uočena značajna promjena osjetljivosti u 2D kulturama, dok su 3D sferoidi iz recidivnog uzorka pokazali izraženu otpornost. Ovaj nalaz dodatno potvrđuje važnost mikrookoliša u razvoju rezistencije. U osteosarkomu i drugim solidnim tumorima pokazano je da 3D organizacija tumorskih stanica povećava otpornost na cisplatin kroz mikrookolišne čimbenike i selekciju subpopulacija s aktiviranim mehanizmima popravka DNA i preživljenja [262,263]. U osteosarkomu su dodatno identificirani putevi popravka DNA kao ključni regulatori odgovora na cisplatin [253]. Pojačana ekspresija transportera *SLC31A1 (CTR1)* u uzorku recidiva upućuje na povećani potencijal unosa cisplatina, zbog čega smanjeni unos lijeka nije vjerojatno dominantan mehanizam rezistencije u ovom modelu. Umjesto toga, rezistentni fenotip može se pripisati povećanom izlazku lijeka putem transportera poput ABCC1, kao i s povećanim popravkom lezija DNA induciranih cisplatinom. Posebno se ističe uloga nukleotidnog ekscizijskog popravka (NER), gdje XPA i kompleks ERCC1–XPF omogućuju prepoznavanje i uklanjanje cisplatinom induciranih adukata DNA [264,265]. S druge strane, ekspresija *APEX1*, gena koji kodira za ključni enzim baznog ekscizijskog popravka (BER), u ovom istraživanju nije pokazala statistički značajnu promjenu između uzoraka dijagnoze i recidiva, ali ekspresija je bila visoka [266]. U prilog tome, pojačana zastupnjenost povezuju se s povećanom rezistencijom na cisplatin i lošijom prognozom kod pacijenata s osteosarkomom [262]. Nasuprot tome, značajno povećana ekspresija *XIAP*-a u uzorku recidiva upućuje na pojačanu antiapoptotsku aktivnost, budući da ovaj protein izravno inhibira aktivnost kaspaza [267–269]. Takva promjena mogla bi pridonijeti preživljavanju tumorskih stanica unatoč prisutnosti genotoksičnih oštećenja izazvanih cisplatinom.

Kod metotreksata, rezultati pokazuju smanjenu ekspresiju transportera *SLC19A1* i visoku ekspresiju *DHFR*-a. Ovaj obrazac predstavlja klasičan mehanizam rezistencije koji je dobro opisan u osteosarkomu i drugim tumorima. Smanjeni unos lijeka, u kombinaciji s povećanom količinom ciljnog enzima, značajno smanjuje učinkovitost ovog kemoterapeutika [270]. Štoviše, u uzorku recidiva osteosarkoma utvrđena je smanjena ekspresija *FPGS-a* u usporedbi s uzorkom pri dijagnozi. Budući da *FPGS* katalizira poliglutamilaciju metotreksata, čime se povećavaju njegovo unutarstanično zadržavanje i citotoksični učinak, smanjena ekspresija ovog enzima mogla bi pridonijeti razvoju rezistencije. Ovaj nalaz u skladu je s istraživanjem Yu i suradnika (2019.), koji su pokazali da inhibicija transkripcije *FPGS-a* pridonosi rezistenciji na metotreksat u osteosarkomu [271]. Nadalje, istraživanje usmjereno na povećanje ekspresije *FPGS*-a u stanicama osteosarkoma pokazalo je da povećana ekspresija ovog enzima može pojačati citotoksični učinak [272]. U sferoidima, ovi efekti su još izraženiji

zbog ograničene difuzije lijeka i metaboličkih prilagodbi stanica unutar sferoida. U nekim studijama zabilježeno je i do 80-struko povećanje IC_{50} vrijednosti za cisplatin te više od 50-struko za doksorubicin u sferoidima u odnosu na adherentne stanice. Ovi rezultati naglašavaju da adherentni modeli često podcjenjuju stvarnu otpornost tumora i mogu dovesti do precjenjivanja učinkovitosti terapije [273–276].

Sveukupno, rezultati potvrđuju da 3D sferoidni modeli, u kombinaciji s transkriptomskom analizom, omogućuju dublje razumijevanje mehanizama kemorezistencije u osteosarkomu. Tijekom progresije bolesti dolazi do selektivne ekspanzije subpopulacija stanica sličnih TMS koje kombiniraju povećanu detoksifikaciju lijekova, pojačani popravak DNA, aktivaciju antiapoptotskih puteva te promjene u transportu i metabolizmu citostatika. Ovi međusobno povezani mehanizmi rezultiraju agresivnim, terapijski refraktornim fenotipom koji je osobito izražen u recidivnim uzorcima. Dodatno, naglašavaju potrebu za korištenjem sferoidnih u pretkliničkim istraživanjima te ukazuju na potencijalne terapijske ciljeve usmjerene na TMS, mehanizme popravka DNA i signalne puteve preživljavanja, kako bi se poboljšala učinkovitost liječenja osteosarkoma i smanjila učestalost recidiva.

6. ZAKLJUČAK

Longitudinalna usporedba uzorka osteosarkoma pri postavi dijagnoze i uzorka recidiva pružila je uvid u funkcionalne i molekularne promjene tijekom progresije bolesti. Recidiv se pokazao kao biološki distinktivna faza bolesti, obilježena pojavom jedinstvene stanične populacije s izraženim obilježjima matičnosti. Unatoč analizi samo jednog tumora, ovakav pristup omogućio je praćenje njegove evolucije i povezivanje funkcionalnih promjena s molekularnim obilježjima. Dobiveni nalazi podupiru hipotezu da terapijski pritisak može pogodovati selekciji tumorskih stanica s izraženijim matičnim karakteristikama, povećanom plastičnošću i invazivnim potencijalom te promijenjenom osjetljivošću na terapiju. Molekularna karakteriziracija razvoja i progresije osteosarkoma, s fokusom na subpopulaciju tumorskih matičnih stanica, ostvarena je postizanjem sljedećih specifičnih ciljeva:

1. Uspješno su uspostavljene primarne (parentalne) stanične kulture i izolirane populacije tumorskih matičnih stanica prve generacije iz dvaju uzoraka tumorskog tkiva istog pacijenta, prikupljenih pri uspostavi dijagnoze i pri resekciji recidiva osteosarkoma.

2. Matične stanice iz uzorka recidiva pokazivale su naglašeniji mezenhimski fenotip, uz veći opseg, nepravilniji oblik i promijenjenu optičku debljinu u odnosu na stanice iz ranijeg stadija osteosarkoma. Uočene morfološke promjene praćene su promjenama ekspresije gena povezanih s organizacijom i dinamikom citoskeleta, mezenhimskim obilježjima, regulacijom staničnog polariteta te remodeliranjem fokalnih adhezija, što upućuje na fenotip obilježen pojačanom mezenhimskom plastičnošću i dinamikom citoskeleta.

3. Karakterizacija tumorskih sferoida pokazala je da sferoidi iz uzorka recidiva, unatoč povećanom optičkom volumenu i masi, imaju smanjenu masenu gustoću, što upućuje na promijenjenu strukturnu organizaciju i potencijalno rahliju raspodjelu stanica.

4. Testom formiranja sferoida potvrđena je sposobnost stanica, iz oba uzorka, da formiraju trodimenzionalne strukture, što je u skladu s prisutnošću stanica koje imaju potencijal iniciranja tumora. Stanice iz uzorka recidiva pokazuju povećanu migracijsku sposobnost i promijenjena molekularna obilježja povezana sa staničnom plastičnošću koja se očituje aktivacijom mehanizma sličnog epitelno–mezenhimskoj tranziciji, miogenom i aktomiozinskom kontrakcijom, adhezijom i remodeliranjem izvanstaničnog matriksa.

5. Uzorci osteosarkoma pokazali su odsutnost ekspresije *hTERT*-a i prisutnost izrazito kratkih telomera, uz molekularna obilježja koja upućuju na moguću uključenost alternativnog produljivanja telomera.

6. Analiza osjetljivosti TMS-a iz različitih stadija osteosarkoma pokazala je da 2D i 3D modeli ne pokazuju isti odgovor na terapiju. Osjetljivost stanica recidiva na doksorubicin u 2D kulturi nije potvrđena u 3D kulturi. Nasuprot tome, 3D kulture ukazuju na razvoj rezistencije na metotreksat i cisplatinu. Molekularni profil upućuje na mogućnost pojačanog izbacivanja cisplatine iz stanice, promjene mehanizma popravka DNA, uključujući putove NER i BER, te jačanje antiapoptotskih procesa. Mogući mehanizmi rezistencije na metotreksat povezani su sa smanjenim unosom lijeka i povećanom ekspresijom njegova ciljnog enzima.

7. LITERATURA

1. Kansara, M.; Teng, M.W.; Smyth, M.J.; Thomas, D.M. Translational Biology of Osteosarcoma. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 722–735, doi:10.1038/nrc3838.

2. Isakoff, M.S.; Bielack, S.S.; Meltzer, P.; Gorlick, R. Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success. *Journal of Clinical Oncology* **2015**, *33*, 3029–3035, doi:10.1200/JCO.2014.59.4895.

3. Batlle, E.; Clevers, H. Cancer Stem Cells Revisited. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 1124–1134, doi:10.1038/nm.4409.

4. Wang, D.; Niu, X.; Wang, Z.; Song, C.-L.; Huang, Z.; Chen, K.-N.; Duan, J.; Bai, H.; Xu, J.; Zhao, J.; et al. Multiregion Sequencing Reveals the Genetic Heterogeneity and Evolutionary History of Osteosarcoma and Matched Pulmonary Metastases. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 7–20, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1086.

5. Shay, J.W.; Wright, W.E. Role of Telomeres and Telomerase in Cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2011**, *21*, 349–353, doi:10.1016/j.semcancer.2011.10.001.

6. Kalluri, R.; Weinberg, R.A. The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition. *Journal of Clinical Investigation* **2009**, *119*, 1420–1428, doi:10.1172/JCI39104.

7. Gialeli, C.; Theocharis, A.D.; Karamanos, N.K. Roles of Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression and Their Pharmacological Targeting. *FEBS J.* **2011**, *278*, 16–27, doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x.

8. Mani, S.A.; Guo, W.; Liao, M.-J.; Eaton, E.Ng.; Ayyanan, A.; Zhou, A.Y.; Brooks, M.; Reinhard, F.; Zhang, C.C.; Shipitsin, M.; et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* **2008**, *133*, 704–715, doi:10.1016/j.cell.2008.03.027.

9. Reya, T.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F.; Weissman, I.L. Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Nature* **2001**, *414*, 105–111, doi:10.1038/35102167.

10. Bustin, S. Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition; ISBN: 9780815344643; and Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition, The Problems Book; ISBN 9780815344537. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 28123–28125, doi:10.3390/ijms161226074.

11. Williams, G.H.; Stoeber, K. The Cell Cycle and Cancer. *J. Pathol.* **2012**, *226*, 352–364, doi:10.1002/path.3022.

12. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70, doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

13. Carbone, A. Cancer Classification at the Crossroads. *Cancers (Basel).* **2020**, *12*, 980, doi:10.3390/cancers12040980.

14. Rosai, J.; Ackerman, L. V. The Pathology of Tumors, Part III: Grading, Staging & Classification. *CA Cancer J. Clin.* **1979**, *29*, 66–77, doi:10.3322/canjclin.29.2.66.

15. Union for International Cancer Control TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition.

16. Brierley, J.; O'Sullivan, B.; Asamura, H.; Byrd, D.; Huang, S.H.; Lee, A.; Piñeros, M.; Mason, M.; Moraes, F.Y.; Rösler, W.; et al. Global Consultation on Cancer Staging: Promoting Consistent Understanding and Use. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2019**, *16*, 763–771, doi:10.1038/s41571-019-0253-x.

17. Nowell, P.C. The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations. *Science (1979).* **1976**, *194*, 23–28, doi:10.1126/science.959840.

18. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd Edition. The Development and Causes of Cancer*;

19. Henry C. Pitot The Molecular Biology of Carcinogenesis. *Cancer* **1993**, *72*, 962–970.

20. Thomas, F.; DeGregori, J.; Marusyk, A.; Dujon, A.M.; Ujvari, B.; Capp, J.-P.; Gatenby, R.; Nedelcu, A.M. A New Perspective on Tumor Progression. *Evol. Med. Public Health* **2024**, *12*, 172–177, doi:10.1093/emph/eoae021.

21. Thomas, F.; DeGregori, J.; Marusyk, A.; Dujon, A.M.; Ujvari, B.; Capp, J.-P.; Gatenby, R.; Nedelcu, A.M. A New Perspective on Tumor Progression. *Evol. Med. Public Health* **2024**, *12*, 172–177, doi:10.1093/emph/eoae021.

22. Zhang, S.; Xiao, X.; Yi, Y.; Wang, X.; Zhu, L.; Shen, Y.; Lin, D.; Wu, C. Tumor Initiation and Early Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Interventional Targets. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9*, 149, doi:10.1038/s41392-024-01848-7.

23. Shlush, L.I.; Hershkovitz, D. Clonal Evolution Models of Tumor Heterogeneity. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* **2015**, e662–e665, doi:10.14694/EdBook_AM.2015.35.e662.

24. Stanley Shostak Evolution of Cancer Stem Cells. In *IntechOpen*; Web of Science: USA ; pp. 563–566.

25. Bjerkvig, R.; Tysnes, B.B.; Aboody, K.S.; Najbauer, J.; Terzis, A.J.A. The Origin of the Cancer Stem Cell: Current Controversies and New Insights. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 899–904, doi:10.1038/nrc1740.

26. Laplane, L.; Maley, C.C. The Evolutionary Theory of Cancer: Challenges and Potential Solutions. *Nat. Rev. Cancer* **2024**, *24*, 718–733, doi:10.1038/s41568-024-00734-2.

27. Kreso, A.; Dick, J.E. Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell* **2014**, *14*, 275–291, doi:10.1016/j.stem.2014.02.006.

28. Hayflick, L. Mortality and Immortality at the Cellular Level. A Review. *Biochemistry (Mosc).* **1997**, *62*, 1180–1190.

29. Carmeliet, P.; Jain, R.K. Angiogenesis in Cancer and Other Diseases. *Nature* **2000**, *407*, 249–257, doi:10.1038/35025220.

30. Fidler, I.J. The Pathogenesis of Cancer Metastasis: The "seed and Soil" Hypothesis Revisited. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 453–458, doi:10.1038/nrc1098.

31. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

32. Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science (1979).* **1956**, *123*, 309–314, doi:10.1126/science.123.3191.309.

33. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, 31–46, doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

34. Blackburn, E.H. Structure and Function of Telomeres. *Nature* **1991**, *350*, 569–573, doi:10.1038/350569a0.

35. Moyzis, R.K.; Buckingham, J.M.; Cram, L.S.; Dani, M.; Deaven, L.L.; Jones, M.D.; Meyne, J.; Ratliff, R.L.; Wu, J.R. A Highly Conserved Repetitive DNA Sequence, (TTAGGG)n, Present at the Telomeres of Human Chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1988**, *85*, 6622–6626, doi:10.1073/pnas.85.18.6622.

36. Olovnikov, A.M. A Theory of Marginotomy. *J. Theor. Biol.* **1973**, *41*, 181–190, doi:10.1016/0022-5193(73)90198-7.

37. Shay, J.W.; Wright, W.E. Telomeres and Telomerase in Normal and Cancer Stem Cells. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 3819–3825, doi:10.1016/j.febslet.2010.05.026.

38. Maser, R.S.; DePinho, R.A. Connecting Chromosomes, Crisis, and Cancer. *Science (1979).* **2002**, *297*, 565–569, doi:10.1126/science.297.5581.565.

39. Fagagna, F. d'Adda di; Reaper, P.M.; Clay-Farrace, L.; Fiegler, H.; Carr, P.; von Zglinicki, T.; Saretzki, G.; Carter, N.P.; Jackson, S.P. A DNA Damage Checkpoint Response in Telomere-Initiated Senescence. *Nature* **2003**, *426*, 194–198, doi:10.1038/nature02118.

40. Shay, J.W.; Wright, W.E. Senescence and Immortalization: Role of Telomeres and Telomerase. *Carcinogenesis* **2005**, *26*, 867–874, doi:10.1093/carcin/bgh296.

41. Hayashi, M.T.; Cesare, A.J.; Rivera, T.; Karlseder, J. Cell Death during Crisis Is Mediated by Mitotic Telomere Deprotection. *Nature* **2015**, *522*, 492–496, doi:10.1038/nature14513.

42. Jafri, M.A.; Ansari, S.A.; Alqahtani, M.H.; Shay, J.W. Roles of Telomeres and Telomerase in Cancer, and Advances in Telomerase-Targeted Therapies. *Genome Med.* **2016**, *8*, 69, doi:10.1186/s13073-016-0324-x.

43. Zvereva, M.I.; Shcherbakova, D.M.; Dontsova, O.A. Telomerase: Structure, Functions, and Activity Regulation. *Biochemistry (Moscow)* **2010**, *75*, 1563–1583, doi:10.1134/S0006297910130055.

44. Schmitt, C.A. Cellular Senescence and Cancer Treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2007**, *1775*, 5–20, doi:10.1016/j.bbcan.2006.08.005.

45. Horn, S.; Figl, A.; Rachakonda, P.S.; Fischer, C.; Sucker, A.; Gast, A.; Kadel, S.; Moll, I.; Nagore, E.; Hemminki, K.; et al. *TERT* Promoter Mutations in Familial and Sporadic Melanoma. *Science (1979).* **2013**, *339*, 959–961, doi:10.1126/science.1230062.

46. Cong, Y. The Human Telomerase Catalytic Subunit hTERT: Organization of the Gene and Characterization of the Promoter. *Hum. Mol. Genet.* **1999**, *8*, 137–142, doi:10.1093/hmg/8.1.137.

47. de Lange, T. How Shelterin Solves the Telomere End-Protection Problem. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **2010**, *75*, 167–177, doi:10.1101/sqb.2010.75.017.

48. Wang, F.; Podell, E.R.; Zaug, A.J.; Yang, Y.; Baciu, P.; Cech, T.R.; Lei, M. The POT1–TPP1 Telomere Complex Is a Telomerase Processivity Factor. *Nature* **2007**, *445*, 506–510, doi:10.1038/nature05454.

49. Pike, A.M.; Strong, M.A.; Ouyang, J.P.T.; Greider, C.W. TIN2 Functions with TPP1/POT1 To Stimulate Telomerase Processivity. *Mol. Cell. Biol.* **2019**, *39*, doi:10.1128/MCB.00593-18.

50. Hou, K.; Yu, Y.; Li, D.; Zhang, Y.; Zhang, K.; Tong, J.; Yang, K.; Jia, S. Alternative Lengthening of Telomeres and Mediated Telomere Synthesis. *Cancers (Basel).* **2022**, *14*, 2194, doi:10.3390/cancers14092194.

51. Cesare, A.J.; Reddel, R.R. Alternative Lengthening of Telomeres: Models, Mechanisms and Implications. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 319–330, doi:10.1038/nrg2763.

52. Henson, J.D.; Cao, Y.; Huschtscha, L.I.; Chang, A.C.; Au, A.Y.M.; Pickett, H.A.; Reddel, R.R. DNA C-Circles Are Specific and Quantifiable Markers of Alternative-Lengthening-of-Telomeres Activity. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 1181–1185, doi:10.1038/nbt.1587.

53. Chung, I.; Osterwald, S.; Deeg, K.I.; Rippe, K. PML Body Meets Telomere. *Nucleus* **2012**, *3*, 263–275, doi:10.4161/nucl.20326.

54. Dunham, M.A.; Neumann, A.A.; Fasching, C.L.; Reddel, R.R. Telomere Maintenance by Recombination in Human Cells. *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 447–450, doi:10.1038/82586.

55. Arora, R.; Lee, Y.; Wischnewski, H.; Brun, C.M.; Schwarz, T.; Azzalin, C.M. RNaseH1 Regulates TERRA-Telomeric DNA Hybrids and Telomere Maintenance in ALT Tumour Cells. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5220, doi:10.1038/ncomms6220.

56. Heaphy, C.M.; de Wilde, R.F.; Jiao, Y.; Klein, A.P.; Edil, B.H.; Shi, C.; Bettegowda, C.; Rodriguez, F.J.; Eberhart, C.G.; Hebbar, S.; et al. Altered Telomeres in Tumors with *ATRX* and *DAXX* Mutations. *Science (1979).* **2011**, *333*, 425–425, doi:10.1126/science.1207313.

57. Zhao, S.; Wang, F.; Liu, L. Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) in Tumors and Pluripotent Stem Cells. *Genes (Basel).* **2019**, *10*, 1030, doi:10.3390/genes10121030.

58. Maciejowski, J.; de Lange, T. Telomeres in Cancer: Tumour Suppression and Genome Instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 175–186, doi:10.1038/nrm.2016.171.

59. Nieto, M.A.; Huang, R.Y.-J.; Jackson, R.A.; Thiery, J.P. EMT: 2016. *Cell* **2016**, *166*, 21–45, doi:10.1016/j.cell.2016.06.028.

60. Thiery, J.P.; Acloque, H.; Huang, R.Y.J.; Nieto, M.A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* **2009**, *139*, 871–890, doi:10.1016/j.cell.2009.11.007.

61. Wu, J.; Jiang, J.; Chen, B.; Wang, K.; Tang, Y.; Liang, X. Plasticity of Cancer Cell Invasion: Patterns and Mechanisms. *Transl. Oncol.* **2021**, *14*, 100899, doi:10.1016/j.tranon.2020.100899.

62. Shin, K.; Fogg, V.C.; Margolis, B. Tight Junctions and Cell Polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2006**, *22*, 207–235, doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104219.

63. Yang, J.; Antin, P.; Berx, G.; Blanpain, C.; Brabletz, T.; Bronner, M.; Campbell, K.; Cano, A.; Casanova, J.; Christofori, G.; et al. Guidelines and Definitions for Research on Epithelial–Mesenchymal Transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 341–352, doi:10.1038/s41580-020-0237-9.

64. Pastushenko, I.; Blanpain, C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 212–226, doi:10.1016/j.tcb.2018.12.001.

65. Chaffer, C.L.; San Juan, B.P.; Lim, E.; Weinberg, R.A. EMT, Cell Plasticity and Metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* **2016**, *35*, 645–654, doi:10.1007/s10555-016-9648-7.

66. Niina Reunanen; VeliMatti Kähäri. Matrix Metalloproteinases in Cancer Cell Invasion.

67. Egeblad, M.; Werb, Z. New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 161–174, doi:10.1038/nrc745.

68. Niland, S.; Riscanevo, A.X.; Eble, J.A. Matrix Metalloproteinases Shape the Tumor Microenvironment in Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *23*, 146, doi:10.3390/ijms23010146.

69. Luo, F.; Ando, K.; Takemura, Y.; Park, T.-H.; Yayama, T.; Imai, S. Epithelial–Mesenchymal Transition in Osteosarcoma as a Key Driver of Pulmonary Metastasis. *Cancers (Basel).* **2025**, *17*, 2922, doi:10.3390/cancers17172922.

70. Hinton, K.; Kirk, A.; Paul, P.; Persad, S. Regulation of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Osteosarcoma. *Biomolecules* **2023**, *13*, 398, doi:10.3390/biom13020398.

71. Tanabe, S.; Quader, S.; Cabral, H.; Ono, R. Interplay of EMT and CSC in Cancer and the Potential Therapeutic Strategies. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fphar.2020.00904.

72. Croft, D.R.; Olson, M.F. Regulating the Conversion between Rounded and Elongated Modes of Cancer Cell Movement. *Cancer Cell* **2008**, *14*, 349–351, doi:10.1016/j.ccr.2008.10.009.

73. Damerell, V.; Pepper, M.S.; Prince, S. Molecular Mechanisms Underpinning Sarcomas and Implications for Current and Future Therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 246, doi:10.1038/s41392-021-00647-8.

74. Palmini, G.; Zonefrati, R.; Mavilia, C.; Aldinucci, A.; Luzi, E.; Marini, F.; Franchi, A.; Capanna, R.; Tanini, A.; Brandi, M.L. Establishment of Cancer Stem Cell Cultures from Human Conventional Osteosarcoma. *Journal of Visualized Experiments* **2016**, doi:10.3791/53884.

75. Beird, H.C.; Bielack, S.S.; Flanagan, A.M.; Gill, J.; Heymann, D.; Janeway, K.A.; Livingston, J.A.; Roberts, R.D.; Strauss, S.J.; Gorlick, R. Osteosarcoma. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2022**, *8*, 77, doi:10.1038/s41572-022-00409-y.

76. Rojas, G.A.; Hubbard, A.K.; Diessner, B.J.; Ribeiro, K.B.; Spector, L.G. International Trends in Incidence of Osteosarcoma (1988-2012). *Int. J. Cancer* **2021**, *149*, 1044–1053, doi:10.1002/ijc.33673.

77. Anderson, M.E.; DuBois, S.G.; Gebhardt, M.C. Sarcomas of Bone. In *Abeloff's Clinical Oncology*; Elsevier, 2020; pp. 1604-1654.e8.

78. El Motassime, A.; Vitiello, R.; Comodo, R.M.; Capece, G.; Bocchino, G.; Bocchi, M.B.; Maccauro, G.; Meschini, C. Osteosarcoma: A Comprehensive Morphological and Molecular Review with Prognostic Implications. *Biology (Basel).* **2025**, *14*, 1407, doi:10.3390/biology14101407.

79. Ahlawat, S.; Fayad, L.M. Revisiting the WHO Classification System of Bone Tumours: Emphasis on Advanced Magnetic Resonance Imaging Sequences. Part 2. *Pol. J. Radiol.* **2020**, *85*, e409–e419, doi:10.5114/pjr.2020.98686.

80. Klein, M.J.; Siegal, G.P. Osteosarcoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **2006**, *125*, 555–581, doi:10.1309/UC6K-QHLD-9LV2-KENN.

81. Sbaraglia, M.; Bellan, E.; Dei Tos, A.P. The 2020 WHO Classification of Soft Tissue Tumours: News and Perspectives. *Pathologica* **2021**, *113*, 70–84, doi:10.32074/1591-951X-213.

82. Harris, M.B.; Gieser, P.; Goorin, A.M.; Ayala, A.; Shochat, S.J.; Ferguson, W.S.; Holbrook, T.; Link, M.P. Treatment of Metastatic Osteosarcoma at Diagnosis: A Pediatric Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology* **1998**, *16*, 3641–3648, doi:10.1200/JCO.1998.16.11.3641.

83. Bielack, S.S.; Kempf-Bielack, B.; Delling, G.; Exner, G.U.; Flege, S.; Helmke, K.; Kotz, R.; Salzer-Kuntschik, M.; Werner, M.; Winkelmann, W.; et al. Prognostic Factors in High-Grade Osteosarcoma of the Extremities or Trunk: An Analysis of 1,702 Patients Treated on Neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group Protocols. *Journal of Clinical Oncology* **2002**, *20*, 776–790, doi:10.1200/JCO.2002.20.3.776.

84. Benjamin, R.S. Adjuvant and Neoadjuvant Chemotherapy for Osteosarcoma: A Historical Perspective. In; 2020; pp. 1–10.

85. Allison, D.C.; Carney, S.C.; Ahlmann, E.R.; Hendifar, A.; Chawla, S.; Fedenko, A.; Angeles, C.; Menendez, L.R. A Meta-Analysis of Osteosarcoma Outcomes in the Modern Medical Era. *Sarcoma* **2012**, *2012*, 1–10, doi:10.1155/2012/704872.

86. Jaffe, N. Historical Perspective on the Introduction and Use of Chemotherapy for the Treatment of Osteosarcoma. In; 2014; pp. 1–30.

87. Robinson, M.J.; Davis, E.J. Neoadjuvant Chemotherapy for Adults with Osteogenic Sarcoma. *Curr. Treat. Options Oncol.* **2024**, *25*, 1366–1373, doi:10.1007/s11864-024-01269-2.

88. Whelan, J.S.; Bielack, S.S.; Marina, N.; Smeland, S.; Jovic, G.; Hook, J.M.; Krailo, M.; Anninga, J.; Butterfass-Bahloul, T.; Böhling, T.; et al. EURAMOS-1, an International Randomised Study for Osteosarcoma: Results from Pre-Randomisation Treatment. *Annals of Oncology* **2015**, *26*, 407–414, doi:10.1093/annonc/mdu526.

89. Bareke, H.; Ibáñez-Navarro, A.; Guerra-García, P.; González Pérez, C.; Rubio-Aparicio, P.; Plaza López de Sabando, D.; Sastre-Urgelles, A.; Ortiz-Cruz, E.J.; Pérez-Martínez, A. Prospects and Advances in Adoptive Natural Killer Cell Therapy for Unmet Therapeutic Needs in Pediatric Bone Sarcomas. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 8324, doi:10.3390/ijms24098324.

90. Li, L.; Tao, W.; Eid, J.E.; Gupta, S.; Zheng, S.; Taswell, C.S.; Trent, J.C. Advances in Radiation Therapy for Primary Bone Malignancies. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2026**, *25*, doi:10.1177/15330338261425345.

91. DeVita; Hellman; Rosenberg *Principles and Practice of Oncology*; 10th ed.; 2015;

92. DeVita; Hellman; Rosenberg *Principles & Practice of Oncology: Alkylating Agents*; 2015; Vol. 10;.

93. Cepeda, V.; Fuertes, M.A.; Castilla, J.; Alonso, C.; Quevedo, C.; Perez, J.M. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2007**, *7*, 3–18, doi:10.2174/187152007779314044.

94. Lee, J.; Prohaska, J.R.; Thiele, D.J. Essential Role for Mammalian Copper Transporter Ctr1 in Copper Homeostasis and Embryonic Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98*, 6842–6847, doi:10.1073/pnas.111058698.

95. Zisowsky, J.; Koegel, S.; Leyers, S.; Devarakonda, K.; Kassack, M.U.; Osmak, M.; Jaehde, U. Relevance of Drug Uptake and Efflux for Cisplatin Sensitivity of Tumor Cells. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 298–307, doi:10.1016/j.bcp.2006.10.003.

96. Galluzzi, L.; Senovilla, L.; Vitale, I.; Michels, J.; Martins, I.; Kepp, O.; Castedo, M.; Kroemer, G. Molecular Mechanisms of Cisplatin Resistance. *Oncogene* **2012**, *31*, 1869–1883, doi:10.1038/onc.2011.384.

97. Jolivet, J.; Cowan, K.H.; Curt, G.A.; Clendeninn, N.J.; Chabner, B.A. The Pharmacology and Clinical Use of Methotrexate. *New England Journal of Medicine* **1983**, *309*, 1094–1104, doi:10.1056/NEJM198311033091805.

98. Assaraf, Y.G. Molecular Basis of Antifolate Resistance. *Cancer and Metastasis Reviews* **2007**, *26*, 153–181, doi:10.1007/s10555-007-9049-z.

99. Gorlick, R.; Khanna, C. Osteosarcoma. *Journal of Bone and Mineral Research* **2010**, *25*, 683–691, doi:10.1002/jbmr.77.

100. Chen, X.; Bahrami, A.; Pappo, A.; Easton, J.; Dalton, J.; Hedlund, E.; Ellison, D.; Shurtleff, S.; Wu, G.; Wei, L.; et al. Recurrent Somatic Structural Variations Contribute to Tumorigenesis in Pediatric Osteosarcoma. *Cell Rep.* **2014**, *7*, 104–112, doi:10.1016/j.celrep.2014.03.003.

101. Morrow, J.J.; Khanna, C. Osteosarcoma Genetics and Epigenetics: Emerging Biology and Candidate Therapies. *Crit. Rev. Oncog.* **2015**, *20*, 173–197, doi:10.1615/CritRevOncog.2015013713.

102. Nirala, B.K.; Yamamichi, T.; Yustein, J.T. Deciphering the Signaling Mechanisms of Osteosarcoma Tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 11367, doi:10.3390/ijms241411367.

103. Singla, A.; Wang, J.; Yang, R.; Geller, D.S.; Loeb, D.M.; Hoang, B.H. Wnt Signaling in Osteosarcoma. In; 2020; pp. 125–139.

104. Zhang, Z.; Wu, W.; Shao, Z. NOTCH Signaling in Osteosarcoma. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2023**, *45*, 2266–2283, doi:10.3390/cimb45030146.

105. Tian, Z.; Niu, X.; Yao, W. Receptor Tyrosine Kinases in Osteosarcoma Treatment: Which Is the Key Target? *Front. Oncol.* **2020**, *10*, doi:10.3389/fonc.2020.01642.

106. Gao, Y.-M.; Pei, Y.; Zhao, F.-F.; Wang, L. Osteoclasts in Osteosarcoma: Mechanisms, Interactions, and Therapeutic Prospects. *Cancer Manag. Res.* **2023**, *15*, 1323–1337, doi:10.2147/CMAR.S431213.

107. Lo, W.W.; Wunder, J.S.; Dickson, B.C.; Campbell, V.; McGovern, K.; Alman, B.A.; Andrulis, I.L. Involvement and Targeted Intervention of Dysregulated Hedgehog Signaling in Osteosarcoma. *Cancer* **2014**, *120*, 537–547, doi:10.1002/cncr.28439.

108. Lamora, A.; Talbot, J.; Mullard, M.; Brounais-Le Royer, B.; Redini, F.; Verrecchia, F. TGF-β Signaling in Bone Remodeling and Osteosarcoma Progression. *J. Clin. Med.* **2016**, *5*, 96, doi:10.3390/jcm5110096.

109. Batlle, E.; Clevers, H. Cancer Stem Cells Revisited. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 1124–1134, doi:10.1038/nm.4409.

110. Gupta, P.B.; Fillmore, C.M.; Jiang, G.; Shapira, S.D.; Tao, K.; Kuperwasser, C.; Lander, E.S. Stochastic State Transitions Give Rise to Phenotypic Equilibrium in Populations of Cancer Cells. *Cell* **2011**, *146*, 633–644, doi:10.1016/j.cell.2011.07.026.

111. Tang, D.G. Understanding Cancer Stem Cell Heterogeneity and Plasticity. *Cell Res.* **2012**, *22*, 457–472, doi:10.1038/cr.2012.13.

112. Reya, T.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F.; Weissman, I.L. Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Nature* **2001**, *414*, 105–111, doi:10.1038/35102167.

113. Loh, J.-J.; Ma, S. Hallmarks of Cancer Stemness. *Cell Stem Cell* **2024**, *31*, 617–639, doi:10.1016/j.stem.2024.04.004.

114. Morrison, S.J.; Kimble, J. Asymmetric and Symmetric Stem-Cell Divisions in Development and Cancer. *Nature* **2006**, *441*, 1068–1074, doi:10.1038/nature04956.

115. Bonnet, D.; Dick, J.E. Human Acute Myeloid Leukemia Is Organized as a Hierarchy That Originates from a Primitive Hematopoietic Cell. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 730–737, doi:10.1038/nm0797-730.

116. Baccelli, I.; Trumpp, A. The Evolving Concept of Cancer and Metastasis Stem Cells. *Journal of Cell Biology* **2012**, *198*, 281–293, doi:10.1083/jcb.201202014.

117. Takebe, N.; Miele, L.; Harris, P.J.; Jeong, W.; Bando, H.; Kahn, M.; Yang, S.X.; Ivy, S.P. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt Pathways in Cancer Stem Cells: Clinical Update. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2015**, *12*, 445–464, doi:10.1038/nrclinonc.2015.61.

118. Dean, M.; Fojo, T.; Bates, S. Tumour Stem Cells and Drug Resistance. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 275–284, doi:10.1038/nrc1590.

119. Abdullah, L.N.; Chow, E.K. Mechanisms of Chemoresistance in Cancer Stem Cells. *Clin. Transl. Med.* **2013**, *2*, doi:10.1186/2001-1326-2-3.

120. Dean, M.; Fojo, T.; Bates, S. Tumour Stem Cells and Drug Resistance. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 275–284, doi:10.1038/nrc1590.

121. Walcher, L.; Kistenmacher, A.-K.; Suo, H.; Kitte, R.; Dluczek, S.; Strauß, A.; Blaudszun, A.-R.; Yevsa, T.; Fricke, S.; Kossatz-Boehlert, U. Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1280, doi:10.3389/fimmu.2020.01280.

122. Al-Hajj, M.; Clarke, M.F. Self-Renewal and Solid Tumor Stem Cells. *Oncogene* **2004**, *23*, 7274–7282, doi:10.1038/sj.onc.1207947.

123. Ginestier, C.; Hur, M.H.; Charafe-Jauffret, E.; Monville, F.; Dutcher, J.; Brown, M.; Jacquemier, J.; Viens, P.; Kleer, C.G.; Liu, S.; et al. ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell* **2007**, *1*, 555–567, doi:10.1016/j.stem.2007.08.014.

124. Kapałczyńska, M.; Kolenda, T.; Przybyła, W.; Zajączkowska, M.; Teresiak, A.; Filas, V.; Ibbs, M.; Bliźniak, R.; Łuczewski, Ł.; Lamperska, K. 2D and 3D Cell Cultures - a Comparison of Different Types of Cancer Cell Cultures. *Arch. Med. Sci.* **2018**, *14*, 910–919, doi:10.5114/aoms.2016.63743.

125. Salinas-Vera, Y.M.; Valdés, J.; Pérez-Navarro, Y.; Mandujano-Lazaro, G.; Marchat, L.A.; Ramos-Payán, R.; Nuñez-Olvera, S.I.; Pérez-Plascencia, C.; López-Camarillo, C. Three-Dimensional 3D Culture Models in Gynecological and Breast Cancer Research. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, doi:10.3389/fonc.2022.826113.

126. Edmondson, R.; Broglie, J.J.; Adcock, A.F.; Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev. Technol.* **2014**, *12*, 207–218, doi:10.1089/adt.2014.573.

127. Pampaloni, F.; Reynaud, E.G.; Stelzer, E.H.K. The Third Dimension Bridges the Gap between Cell Culture and Live Tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 839–845, doi:10.1038/nrm2236.

128. Saydé, T.; El Hamoui, O.; Alies, B.; Gaudin, K.; Lespes, G.; Battu, S. Biomaterials for Three-Dimensional Cell Culture: From Applications in Oncology to Nanotechnology. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 481, doi:10.3390/nano11020481.

129. Pastrana, E.; Silva-Vargas, V.; Doetsch, F. Eyes Wide Open: A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay for Stem Cells. *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 486–498, doi:10.1016/j.stem.2011.04.007.

130. 10x Genomics Universal-Three-Prime-Gene-Expression/Documentation/Steps/Library-Prep/Chromium-Single-Cell-3-Reagent-Kits-User-Guide-v-3-1-Chemistry-Dual-Index.

131. Andrews, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Available online: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc (accessed on 3 November 2026).

132. Zheng, G.X.Y.; Terry, J.M.; Belgrader, P.; Ryvkin, P.; Bent, Z.W.; Wilson, R.; Ziraldo, S.B.; Wheeler, T.D.; McDermott, G.P.; Zhu, J.; et al. Massively Parallel Digital Transcriptional Profiling of Single Cells. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14049, doi:10.1038/ncomms14049.

133. Satija, R.; Farrell, J.A.; Gennert, D.; Schier, A.F.; Regev, A. Spatial Reconstruction of Single-Cell Gene Expression Data. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 495–502, doi:10.1038/nbt.3192.

134. Hafemeister, C.; Satija, R. Normalization and Variance Stabilization of Single-Cell RNA-Seq Data Using Regularized Negative Binomial Regression. *Genome Biol.* **2019**, *20*, 296, doi:10.1186/s13059-019-1874-1.

135. Choudhary, S.; Satija, R. Comparison and Evaluation of Statistical Error Models for scRNA-Seq. *Genome Biol.* **2022**, *23*, 27, doi:10.1186/s13059-021-02584-9.

136. CellDynamics W8 Available online: https://celldynamics.it/ (accessed on 3 November 2026).

137. Institut za hrvatski jezik i jezikoslovlje Stokesov Zakon, Struna Available online: https://struna.ihjj.hr/naziv/stokesov-zakon/7931/ (accessed on 3 November 2026).

138. Phi AB. Reports Manual Available online: https://www.thistlescientific.com/brands/phi-ab/ (accessed on 3 November 2026).

139. Gong, C.; Yang, H.; Wang, S.; Liu, J.; Li, Z.; Hu, Y.; Chen, Y.; Huang, Y.; Luo, Q.; Wu, Y.; et al. hTERT Promotes CRC Proliferation and Migration by Recruiting YBX1 to Increase NRF2 Expression. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, doi:10.3389/fcell.2021.658101.

140. Zymo Research Quick-DNA-RNA-Miniprep-Plus-Kit.

141. Promega Celltiter-Glo-3d-Cell-Viability-Assay.

142. Wang, L.; Park, P.; Zhang, H.; La Marca, F.; Lin, C. Prospective Identification of Tumorigenic Osteosarcoma Cancer Stem Cells in OS99-1 Cells Based on High Aldehyde Dehydrogenase Activity. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 294–303, doi:10.1002/ijc.25331.

143. Hockfield, S.; McKay, R. Identification of Major Cell Classes in the Developing Mammalian Nervous System. *The Journal of Neuroscience* **1985**, *5*, 3310–3328, doi:10.1523/JNEUROSCI.05-12-03310.1985.

144. Hermanova, M. Nestin Expression in High-Grade Osteosarcomas and Its Clinical Significance. *Oncol. Rep.* **2012**, doi:10.3892/or.2012.1687.

145. Matsuda, Y.; Hagio, M.; Ishiwata, T. Nestin: A Novel Angiogenesis Marker and Possible Target for Tumor Angiogenesis. *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19*, 42–48, doi:10.3748/wjg.v19.i1.42.

146. Kleeberger, W.; Bova, G.S.; Nielsen, M.E.; Herawi, M.; Chuang, A.-Y.; Epstein, J.I.; Berman, D.M. Roles for the Stem Cell–Associated Intermediate Filament Nestin in Prostate Cancer Migration and Metastasis. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 9199–9206, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0806.

147. Schmitt, M.; Sinnberg, T.; Nalpas, N.C.; Maass, A.; Schittek, B.; Macek, B. Quantitative Proteomics Links the Intermediate Filament Nestin to Resistance to Targeted BRAF Inhibition

in Melanoma Cells. *Molecular & Cellular Proteomics* **2019**, *18*, 1096–1109, doi:10.1074/mcp.RA119.001302.

148. Jaggupilli, A.; Elkord, E. Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, *2012*, 1–11, doi:10.1155/2012/708036.

149. Altevogt, P.; Sammar, M.; Hüser, L.; Kristiansen, G. Novel Insights into the Function of <scp>CD24</Scp> : A Driving Force in Cancer. *Int. J. Cancer* **2021**, *148*, 546–559, doi:10.1002/ijc.33249.

150. Tang, J.; Cai, H.; Lin, L.; Xie, P.; Zhong, W.; Tang, M. Increased Expression of CD24 Is Associated with Tumor Progression and Prognosis in Patients Suffering Osteosarcoma. *Clinical and Translational Oncology* **2013**, *15*, 541–547, doi:10.1007/s12094-012-0961-5.

151. Chen, D.; Hu, C.; Wen, G.; Yang, Q.; Zhang, C.; Yang, H. DownRegulated SOX4 Expression Suppresses Cell Proliferation, Migration, and Induces Apoptosis in Osteosarcoma In Vitro and In Vivo. *Calcif. Tissue Int.* **2018**, *102*, 117–127, doi:10.1007/s00223-017-0340-x.

152. Peng, X.; Liu, G.; Peng, H.; Chen, A.; Zha, L.; Wang, Z. SOX4 Contributes to TGF-β-Induced Epithelial–Mesenchymal Transition and Stem Cell Characteristics of Gastric Cancer Cells. *Genes Dis.* **2018**, *5*, 49–61, doi:10.1016/j.gendis.2017.12.005.

153. Li, W.; Liu, J.; Cai, T.; Hu, X. TCF12 Transcriptionally Activates SPHK1 to Induce Osteosarcoma Angiogenesis by Promoting the S1P/S1PR4/STAT3 Axis. *Mol. Cell. Biol.* **2024**, *44*, 178–193, doi:10.1080/10985549.2024.2341781.

154. Pang, Y.; Zhou, S.; Zumbo, P.; Betel, D.; Cisse, B. TCF12 Deficiency Impairs the Proliferation of Glioblastoma Tumor Cells and Improves Survival. *Cancers (Basel).* **2023**, *15*, 2033, doi:10.3390/cancers15072033.

155. Won, K.Y.; Park, H.-R.; Park, Y.-K. Prognostic Implication of Immunohistochemical Runx2 Expression in Osteosarcoma. *Tumori Journal* **2009**, *95*, 311–316, doi:10.1177/030089160909500307.

156. Sadikovic, B.; Thorner, P.; Chilton-Macneill, S.; Martin, J.W.; Cervigne, N.K.; Squire, J.; Zielenska, M. Expression Analysis of Genes Associated with Human Osteosarcoma Tumors Shows Correlation of RUNX2 Overexpression with Poor Response to Chemotherapy. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 202, doi:10.1186/1471-2407-10-202.

157. Zheng, Z.; Liao, Z.; Pang, L.; Xu, Z.; Zhu, Y.; Jia, P.; Wang, Q. MEF2C Is a Potential Prognostic Biomarker for Osteosarcoma. *Medicine* **2025**, *104*, e44313, doi:10.1097/MD.0000000000044313.

158. Stephens, A.S.; Stephens, S.R.; Hobbs, C.; Hutmacher, D.W.; Bacic-Welsh, D.; Woodruff, M.A.; Morrison, N.A. Myocyte Enhancer Factor 2C, an Osteoblast Transcription Factor Identified by Dimethyl Sulfoxide (DMSO)-Enhanced Mineralization. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 30071–30086, doi:10.1074/jbc.M111.253518.

159. Guo, L.; Yan, T.; Guo, W.; Niu, J.; Wang, W.; Ren, T.; Huang, Y.; Xu, J.; Wang, B. Molecular Subtypes of Osteosarcoma Classified by Cancer Stem Cell Related Genes Define Immunological Cell Infiltration and Patient Survival. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, doi:10.3389/fimmu.2022.986785.

160. Morice, S.; Mullard, M.; Brion, R.; Dupuy, M.; Renault, S.; Tesfaye, R.; Brounais-Le Royer, B.; Ory, B.; Redini, F.; Verrecchia, F. The YAP/TEAD Axis as a New Therapeutic Target in

Osteosarcoma: Effect of Verteporfin and CA3 on Primary Tumor Growth. *Cancers (Basel).* **2020**, *12*, 3847, doi:10.3390/cancers12123847.

161. Yang, S.; Ye, Z.; Wang, Z.; Wang, L. High Mobility Group Box 2 Modulates the Progression of Osteosarcoma and Is Related with Poor Prognosis. *Ann. Transl. Med.* **2020**, *8*, 1082–1082, doi:10.21037/atm-20-4801.

162. Gibbs, C.P.; Kukekov, V.G.; Reith, J.D.; Tchigrinova, O.; Suslov, O.N.; Scott, E.W.; Ghivizzani, S.C.; Ignatova, T.N.; Steindler, D.A. Stem-Like Cells in Bone Sarcomas: Implications for Tumorigenesis. *Neoplasia* **2005**, *7*, 967–976, doi:10.1593/neo.05394.

163. 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*, 1381–1386.

164. Wang, L.; Park, P.; Lin, C.-Y. Characterization of Stem Cell Attributes in Human Osteosarcoma Cell Lines. *Cancer Biol. Ther.* **2009**, *8*, 543–552, doi:10.4161/cbt.8.6.7695.

165. Palmini, G.; Zonefrati, R.; Mavilia, C.; Aldinucci, A.; Luzi, E.; Marini, F.; Franchi, A.; Capanna, R.; Tanini, A.; Brandi, M.L. Establishment of Cancer Stem Cell Cultures from Human Conventional Osteosarcoma. *Journal of Visualized Experiments* **2016**, doi:10.3791/53884.

166. Kim, Y.-N.; Koo, K.H.; Sung, J.Y.; Yun, U.-J.; Kim, H. Anoikis Resistance: An Essential Prerequisite for Tumor Metastasis. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, *2012*, 1–11, doi:10.1155/2012/306879.

167. Cristaldi, D.A.; Sargenti, A.; Bonetti, S.; Musmeci, F.; Delprete, C.; Bacchi, F.; Pasqua, S.; Cavallo, C.; Bonsi, L.; Alviano, F.; et al. A Reliable Flow-Based Method for the Accurate Measure of Mass Density, Size and Weight of Live 3D Tumor Spheroids. *Micromachines (Basel).* **2020**, *11*, 465, doi:10.3390/mi11050465.

168. Sauer, F.; Grosser, S.; Shahryari, M.; Hayn, A.; Guo, J.; Braun, J.; Briest, S.; Wolf, B.; Aktas, B.; Horn, L.; et al. Changes in Tissue Fluidity Predict Tumor Aggressiveness In Vivo. *Advanced Science* **2023**, *10*, doi:10.1002/advs.202303523.

169. Raghavan, S.; Mehta, P.; Horst, E.N.; Ward, M.R.; Rowley, K.R.; Mehta, G. Comparative Analysis of Tumor Spheroid Generation Techniques for Differential *in Vitro* Drug Toxicity. *Oncotarget* **2016**, *7*, 16948–16961, doi:10.18632/oncotarget.7659.

170. Pandey, M.; Suh, Y.J.; Kim, M.; Davis, H.J.; Segall, J.E.; Wu, M. Mechanical Compression Regulates Tumor Spheroid Invasion into a 3D Collagen Matrix. *Phys. Biol.* **2024**, *21*, 036003, doi:10.1088/1478-3975/ad3ac5.

171. van der Net, A.; Rahman, Z.; Bordoloi, A.D.; Muntz, I.; Ten Dijke, P.; Boukany, P.E.; Koenderink, G.H. EMT-Related Cell-Matrix Interactions Are Linked to States of Cell Unjamming in Cancer Spheroid Invasion. *iScience* **2024**, *27*, 111424, doi:10.1016/j.isci.2024.111424.

172. Yilmaz, M.; Christofori, G. EMT, the Cytoskeleton, and Cancer Cell Invasion. *Cancer and Metastasis Reviews* **2009**, *28*, 15–33, doi:10.1007/s10555-008-9169-0.

173. Lyons, S.M.; Alizadeh, E.; Mannheimer, J.; Schuamberg, K.; Castle, J.; Schroder, B.; Turk, P.; Thamm, D.; Prasad, A. Changes in Cell Shape Are Correlated with Metastatic Potential in Murine and Human Osteosarcomas. *Biol. Open* **2016**, *5*, 289–299, doi:10.1242/bio.013409.

174. Mir, M.; Wang, Z.; Shen, Z.; Bednarz, M.; Bashir, R.; Golding, I.; Prasanth, S.G.; Popescu, G. Optical Measurement of Cycle-Dependent Cell Growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 13124–13129, doi:10.1073/pnas.1100506108.

175. Guo, P.; Huang, J.; Moses, M.A. Characterization of Dormant and Active Human Cancer Cells by Quantitative Phase Imaging. *Cytometry Part A* **2017**, *91*, 424–432, doi:10.1002/cyto.a.23083.

176. Friedl, P.; Wolf, K. Tumour-Cell Invasion and Migration: Diversity and Escape Mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 362–374, doi:10.1038/nrc1075.

177. Kita, K.; Asanuma, K.; Okamoto, T.; Kawamoto, E.; Nakamura, K.; Hagi, T.; Nakamura, T.; Shimaoka, M.; Sudo, A. Cytoskeletal Actin Structure in Osteosarcoma Cells Determines Metastatic Phenotype via Regulating Cell Stiffness, Migration, and Transmigration. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2021**, *43*, 1255–1266, doi:10.3390/cimb43030089.

178. Sittiju, P.; Chaiyawat, P.; Pruksakorn, D.; Klangjorhor, J.; Wongrin, W.; Phinyo, P.; Kamolphiwong, R.; Phanphaisarn, A.; Teeyakasem, P.; Kongtawelert, P.; et al. Osteosarcoma-Specific Genes as a Diagnostic Tool and Clinical Predictor of Tumor Progression. *Biology (Basel).* **2022**, *11*, 698, doi:10.3390/biology11050698.

179. Cui, Y.; Wu, Y.; Jiang, D.; Ding, T. Single-Cell and Spatial Transcriptomics Reveal Post-Translational Modifications in Osteosarcoma Progression and Tumor Microenvironment. *PLoS One* **2025**, *20*, e0333809, doi:10.1371/journal.pone.0333809.

180. Lopez-Guerrero, A.M.; Espinosa-Bermejo, N.; Sanchez-Lopez, I.; Macartney, T.; Pascual-Caro, C.; Orantos-Aguilera, Y.; Rodriguez-Ruiz, L.; Perez-Oliva, A.B.; Mulero, V.; Pozo-Guisado, E.; et al. RAC1-Dependent ORAI1 Translocation to the Leading Edge Supports Lamellipodia Formation and Directional Persistence. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 6580, doi:10.1038/s41598-020-63353-5.

181. Liu, Z.-J.; Chen, S.-G.; Yang, Y.-Z.; Lu, S.-J.; Zhao, X.-M.; Hu, B.; Zhang, L. miR-29a Inhibits Adhesion, Migration, and Invasion of Osteosarcoma Cells by Suppressing CDC42. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2019**, *12*, 4171–4180.

182. Yui, Y.; Itoh, K.; Yoshioka, K.; Naka, N.; Watanabe, M.; Hiraumi, Y.; Matsubara, H.; Watanabe, K.; Sano, K.; Nakahata, T.; et al. Mesenchymal Mode of Migration Participates in Pulmonary Metastasis of Mouse Osteosarcoma LM8. *Clin. Exp. Metastasis* **2010**, *27*, 619–630, doi:10.1007/s10585-010-9352-x.

183. Chen, X.; Cates, J.M.M.; Du, Y.-C.; Jain, A.; Jung, S.Y.; Li, X.-N.; Hicks, J.M.; Man, T. Mislocalized Cytoplasmic P27 Activates PAK1-mediated Metastasis and Is a Prognostic Factor in Osteosarcoma. *Mol. Oncol.* **2020**, *14*, 846–864, doi:10.1002/1878-0261.12624.

184. Arlt, M.J.; Kuzmanov, A.; Snedeker, J.G.; Fuchs, B.; Silvan, U.; Sabile, A.A. Fascin-1 Enhances Experimental Osteosarcoma Tumor Formation and Metastasis and Is Related to Poor Patient Outcome. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 83, doi:10.1186/s12885-019-5303-3.

185. Azuma, K.; Tanaka, M.; Uekita, T.; Inoue, S.; Yokota, J.; Ouchi, Y.; Sakai, R. Tyrosine Phosphorylation of Paxillin Affects the Metastatic Potential of Human Osteosarcoma. *Oncogene* **2005**, *24*, 4754–4764, doi:10.1038/sj.onc.1208654.

186. Carisey, A.; Tsang, R.; Greiner, A.M.; Nijenhuis, N.; Heath, N.; Nazgiewicz, A.; Kemkemer, R.; Derby, B.; Spatz, J.; Ballestrem, C. Vinculin Regulates the Recruitment and Release of Core Focal Adhesion Proteins in a Force-Dependent Manner. *Current Biology* **2013**, *23*, 271–281, doi:10.1016/j.cub.2013.01.009.

187. Grashoff, C.; Hoffman, B.D.; Brenner, M.D.; Zhou, R.; Parsons, M.; Yang, M.T.; McLean, M.A.; Sligar, S.G.; Chen, C.S.; Ha, T.; et al. Measuring Mechanical Tension across Vinculin Reveals Regulation of Focal Adhesion Dynamics. *Nature* **2010**, *466*, 263–266, doi:10.1038/nature09198.

188. Khanna, C.; Wan, X.; Bose, S.; Cassaday, R.; Olomu, O.; Mendoza, A.; Yeung, C.; Gorlick, R.; Hewitt, S.M.; Helman, L.J. The Membrane-Cytoskeleton Linker Ezrin Is Necessary for Osteosarcoma Metastasis. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 182–186, doi:10.1038/nm982.

189. Liu, P.; Yang, P.; Zhang, Z.; Liu, M.; Hu, S. Ezrin/NF-κB Pathway Regulates EGF-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), Metastasis, and Progression of Osteosarcoma. *Medical Science Monitor* **2018**, *24*, 2098–2108, doi:10.12659/MSM.906945.

190. Sáinz-Jaspeado, M.; Smith, R.O.; Plunde, O.; Pawelzik, S.-C.; Jin, Y.; Nordling, S.; Ding, Y.; Aspenström, P.; Hedlund, M.; Bastianello, G.; et al. Palmdelphin Regulates Nuclear Resilience to Mechanical Stress in the Endothelium. *Circulation* **2021**, *144*, 1629–1645, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.121.054182.

191. Nie, Y.; Chen, H.; Guo, C.; Yuan, Z.; Zhou, X.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Mo, D.; Chen, Y. Palmdelphin Promotes Myoblast Differentiation and Muscle Regeneration. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41608, doi:10.1038/srep41608.

192. Gibbs, C.P.; Kukekov, V.G.; Reith, J.D.; Tchigrinova, O.; Suslov, O.N.; Scott, E.W.; Ghivizzani, S.C.; Ignatova, T.N.; Steindler, D.A. Stem-Like Cells in Bone Sarcomas: Implications for Tumorigenesis. *Neoplasia* **2005**, *7*, 967–976, doi:10.1593/neo.05394.

193. Wang, L.; He, Y.; Wu, L.; Chen, D.; Fan, H.; Jia, W. [Isolation and Characterization of Human Breast Tumor Stem Cells]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* **2012**, *28*, 1261–1264.

194. O'Brien, C.A.; Pollett, A.; Gallinger, S.; Dick, J.E. A Human Colon Cancer Cell Capable of Initiating Tumour Growth in Immunodeficient Mice. *Nature* **2007**, *445*, 106–110, doi:10.1038/nature05372.

195. Galli, R.; Binda, E.; Orfanelli, U.; Cipelletti, B.; Gritti, A.; De Vitis, S.; Fiocco, R.; Foroni, C.; Dimeco, F.; Vescovi, A. Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7011–7021, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1364.

196. Parri, M.; Chiarugi, P. Rac and Rho GTPases in Cancer Cell Motility Control. *Cell Communication and Signaling* **2010**, *8*, 23, doi:10.1186/1478-811X-8-23.

197. Sharili, A.-S.; Allen, S.; Smith, K.; Price, J.; McGonnell, I.M. Snail2 Promotes Osteosarcoma Cell Motility through Remodelling of the Actin Cytoskeleton and Regulates Tumor Development. *Cancer Lett.* **2013**, *333*, 170–179, doi:10.1016/j.canlet.2013.01.027.

198. Cano, A.; Pérez-Moreno, M.A.; Rodrigo, I.; Locascio, A.; Blanco, M.J.; del Barrio, M.G.; Portillo, F.; Nieto, M.A. The Transcription Factor Snail Controls Epithelial–Mesenchymal Transitions by Repressing E-Cadherin Expression. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 76–83, doi:10.1038/35000025.

199. Sharili, A.-S.; Allen, S.; Smith, K.; Hargreaves, J.; Price, J.; McGonnell, I. Expression of Snail2 in Long Bone Osteosarcomas Correlates with Tumour Malignancy. *Tumor Biology* **2011**, *32*, 515–526, doi:10.1007/s13277-010-0146-1.

200. Fonseca, E. V.; Olaya, N.; Patiño, E.F.; Aponte, N.H.; Linares Ballesteros, A. Identificación de Marcadores de Transición Epitelio-Mesénquima (TEM) Por Inmunohistoquímica En Osteosarcoma Pediátrico y Asociación Con Desenlaces Clínicos. *Andes Pediatrica* **2022**, *93*, 868–877, doi:10.32641/andespediatr.v93i6.4255.

201. Yang, J.; Mani, S.A.; Donaher, J.L.; Ramaswamy, S.; Itzykson, R.A.; Come, C.; Savagner, P.; Gitelman, I.; Richardson, A.; Weinberg, R.A. Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis. *Cell* **2004**, *117*, 927–939, doi:10.1016/j.cell.2004.06.006.

202. Liu, C.; Lin, J. Long Noncoding RNA ZEB1-AS1 Acts as an Oncogene in Osteosarcoma by Epigenetically Activating ZEB1. *Am. J. Transl. Res.* **2016**, *8*, 4095–4105.

203. Cáceres-Calle, D.; Torre-Cea, I.; Marcos-Zazo, L.; Carrera-Aguado, I.; Guerra-Paes, E.; Berlana-Galán, P.; Muñoz-Félix, J.M.; Sánchez-Juanes, F. Integrins as Key Mediators of Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 904, doi:10.3390/ijms26030904.

204. Li, R.; Shi, Y.; Zhao, S.; Shi, T.; Zhang, G. NF-κB Signaling and Integrin-B1 Inhibition Attenuates Osteosarcoma Metastasis via Increased Cell Apoptosis. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *123*, 1035–1043, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.003.

205. Wang, J.; Zhang, H.; Sun, X.; Wang, X.; Ren, T.; Huang, Y.; Zhang, R.; Zheng, B.; Guo, W. Exosomal PD-L1 and N-Cadherin Predict Pulmonary Metastasis Progression for Osteosarcoma Patients. *J. Nanobiotechnology* **2020**, *18*, 151, doi:10.1186/s12951-020-00710-6.

206. Wang, S.; Liang, F.; Wei, H.; Huang, X.; Lin, H.; Chen, F.; Lin, R.; Huang, Z.; Lin, J.; Wu, Z. Licochalcone B Targets Neural Cell Adhesion Molecule 1 to Inhibit Osteosarcoma Progression and Ferroptosis Resistance via Extracellular Signal-Regulated Kinase 5 and Nuclear Factor Kappa B Pathways. *Phytomedicine* **2026**, *150*, 157584, doi:10.1016/j.phymed.2025.157584.

207. Yu, X.; Yustein, J.T.; Xu, J. Research Models and Mesenchymal/Epithelial Plasticity of Osteosarcoma. *Cell Biosci.* **2021**, *11*, 94, doi:10.1186/s13578-021-00600-w.

208. Reith, J.D.; Donahue, F.I.; Hornicek, F.J. Dedifferentiated Parosteal Osteosarcoma with Rhabdomyosarcomatous Differentiation. *Skeletal Radiol.* **1999**, *28*, 527–531, doi:10.1007/s002560050557.

209. Bishop, J.A.; Thompson, L.D.R.; Cardesa, A.; Barnes, L.; Lewis, J.S.; Triantafyllou, A.; Hellquist, H.; Stenman, G.; Hunt, J.L.; Williams, M.D.; et al. Rhabdomyoblastic Differentiation in Head and Neck Malignancies Other Than Rhabdomyosarcoma. *Head Neck Pathol.* **2015**, *9*, 507–518, doi:10.1007/s12105-015-0624-2.

210. Toki, S.; Wakai, S.; Sekimizu, M.; Mori, T.; Ichikawa, H.; Kawai, A.; Yoshida, A. <scp>PAX</Scp> 7 Immunohistochemical Evaluation of Ewing Sarcoma and Other Small Round Cell Tumours. *Histopathology* **2018**, *73*, 645–652, doi:10.1111/his.13689.

211. Dodd, R.D.; Sachdeva, M.; Mito, J.K.; Eward, W.C.; Brigman, B.E.; Ma, Y.; Dodd, L.; Kim, Y.; Lev, D.; Kirsch, D.G. Myogenic Transcription Factors Regulate Pro-Metastatic miR-182. *Oncogene* **2016**, *35*, 1868–1875, doi:10.1038/onc.2015.252.

212. Hakibilen, C.; Delort, F.; Daher, M.-T.; Joanne, P.; Cabet, E.; Cardoso, O.; Bourgois-Rocha, F.; Tian, C.; Rivas, E.; Madruga, M.; et al. Desmin Modulates Muscle Cell Adhesion and Migration. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, doi:10.3389/fcell.2022.783724.

213. Licht, A.H.; Nübel, T.; Feldner, A.; Jurisch-Yaksi, N.; Marcello, M.; Demicheva, E.; Hu, J.-H.; Hartenstein, B.; Augustin, H.G.; Hecker, M.; et al. Junb Regulates Arterial Contraction Capacity, Cellular Contractility, and Motility via Its Target Myl9 in Mice. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 2307–2318, doi:10.1172/JCI41749.

214. Zhao, S.; Xiong, W.; Xu, K. MiR-663a, Regulated by lncRNA GAS5, Contributes to Osteosarcoma Development through Targeting MYL9. *Hum. Exp. Toxicol.* **2020**, *39*, 1607–1618, doi:10.1177/0960327120937330.

215. Asif, M.; Oprescu, S.N.; Shang, R.; Zhang, Z.; Yue, F.; Bi, P.; Kuang, S. ASB5 Is a Specific Marker for Muscle Satellite Cells but Dispensable for Skeletal Muscle Development and Regeneration. *Skelet. Muscle* **2026**, *16*, 15, doi:10.1186/s13395-025-00409-y.

216. Ferrena, A.; Zhang, R.; Wang, J.; Zheng, X.Y.; Göker, B.; Barotti, G.; Borjihan, H.; Chae, S.-S.; Lo, Y.; Zhao, H.; et al. Single-Cell RNA Analysis of Murine Osteosarcoma Uncovers *Skp2* Function in Metastasis, Genomic Instability, and Immune Activation and Reveals Additional Target Pathways. *Cancer Research Communications* **2026**, *6*, 923–945, doi:10.1158/2767-9764.CRC-25-0294.

217. Lu, P.; Takai, K.; Weaver, V.M.; Werb, Z. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a005058–a005058, doi:10.1101/cshperspect.a005058.

218. Mayr, L.; Pirker, C.; Lötsch, D.; Van Schoonhoven, S.; Windhager, R.; Englinger, B.; Berger, W.; Kubista, B. CD44 Drives Aggressiveness and Chemoresistance of a Metastatic Human Osteosarcoma Xenograft Model. *Oncotarget* **2017**, *8*, 114095–114108, doi:10.18632/oncotarget.23125.

219. Kong, L.; Ji, H.; Gan, X.; Cao, S.; Li, Z.; Jin, Y. Knockdown of CD44 Inhibits Proliferation, Migration and Invasion of Osteosarcoma Cells Accompanied by Downregulation of Cathepsin S. *J. Orthop. Surg. Res.* **2022**, *17*, 154, doi:10.1186/s13018-022-03048-x.

220. Bjørnland, K.; Flatmark, K.; Pettersen, S.; Aaasen, A.O.; Fodstad, Ø.; Mælandsmo, G.M. Matrix Metalloproteinases Participate in Osteosarcoma Invasion. *Journal of Surgical Research* **2005**, *127*, 151–156, doi:10.1016/j.jss.2004.12.016.

221. Wang, X.; Zhao, X.; Yi, Z.; Ma, B.; Wang, H.; Pu, Y.; Wang, J.; Wang, S. WNT5A Promotes Migration and Invasion of Human Osteosarcoma Cells via SRC/ERK/MMP-14 Pathway. *Cell Biol. Int.* **2018**, *42*, 598–607, doi:10.1002/cbin.10936.

222. Kido, A.; Krueger, S.; Haeckel, C.; Roessner, A. Inhibitory Effect of Antisense Aminopeptidase N (APN/CD13) cDNA Transfection on the Invasive Potential of Osteosarcoma Cells. *Clin. Exp. Metastasis* **2003**, *20*, 585–592, doi:10.1023/A:1027383729767.

223. Zhou, Y.; Yin, L.; Li, H.; Liu, L.-H.; Xiao, T. The LncRNA LINC00963 Facilitates Osteosarcoma Proliferation and Invasion by Suppressing miR-204-3p/FN1 Axis. *Cancer Biol. Ther.* **2019**, *20*, 1141–1148, doi:10.1080/15384047.2019.1598766.

224. Xu, C.; Wang, Z.; Zhang, L.; Feng, Y.; Lv, J.; Wu, Z.; Yang, R.; Wu, T.; Li, J.; Zhou, R.; et al. Periostin Promotes the Proliferation and Metastasis of Osteosarcoma by Increasing Cell Survival and Activates the PI3K/Akt Pathway. *Cancer Cell Int.* **2022**, *22*, 34, doi:10.1186/s12935-021-02441-6.

225. Dalla-Torre, C.A.; Yoshimoto, M.; Lee, C.-H.; Joshua, A.M.; de Toledo, S.R.; Petrilli, A.S.; Andrade, J.A.; Chilton-MacNeill, S.; Zielenska, M.; Squire, J.A. Effects of THBS3, SPARC and SPP1 Expression on Biological Behavior and Survival in Patients with Osteosarcoma. *BMC Cancer* **2006**, *6*, 237, doi:10.1186/1471-2407-6-237.

226. Yang, Y.; Niu, X.; Liu, W.; Xu, H. Expression and Significance of Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine in Human Osteosarcoma. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 5491–5496, doi:10.3892/ol.2017.6871.

227. Ma, J.; Chen, Z.; Li, Q.; Wang, L.; Chen, J.; Yang, X.; Yang, C.; Quan, Z. RARRES2 Is Involved in the “Lock-and-Key” Interactions between Osteosarcoma Stem Cells and Tumor-Associated Macrophages. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 2267, doi:10.1038/s41598-024-52738-5.

228. Yin, P.; Tong, C. LncRNA RGMB-AS1 up-Regulates ANKRD1 Through Competitively Sponging miR-3614-5p to Promote OSA Cell Proliferation and Invasion. *Arch. Med. Res.* **2022**, *53*, 131–137, doi:10.1016/j.arcmed.2021.08.004.

229. Chinni, S.R.; Sivalogan, S.; Dong, Z.; Filho, J.C.T.; Deng, X.; Bonfil, R.D.; Cher, M.L. CXCL12/CXCR4 Signaling Activates Akt-1 and MMP-9 Expression in Prostate Cancer Cells: The Role of Bone Microenvironment-associated CXCL12. *Prostate* **2006**, *66*, 32–48, doi:10.1002/pros.20318.

230. Perissinotto, E.; Cavalloni, G.; Leone, F.; Fonsato, V.; Mitola, S.; Grignani, G.; Surrenti, N.; Sangiolo, D.; Bussolino, F.; Piacibello, W.; et al. Involvement of Chemokine Receptor 4/Stromal Cell–Derived Factor 1 System during Osteosarcoma Tumor Progression. *Clinical Cancer Research* **2005**, *11*, 490–497, doi:10.1158/1078-0432.490.11.2.

231. Neklyudova, O.; Arlt, M.J.E.; Brennecke, P.; Thelen, M.; Gvozdenovic, A.; Kuzmanov, A.; Robl, B.; Botter, S.M.; Born, W.; Fuchs, B. Altered CXCL12 Expression Reveals a Dual Role of CXCR4 in Osteosarcoma Primary Tumor Growth and Metastasis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2016**, *142*, 1739–1750, doi:10.1007/s00432-016-2185-5.

232. Baumhoer, D.; Smida, J.; Zillmer, S.; Rosemann, M.; Atkinson, M.J.; Nelson, P.J.; Jundt, G.; Luettichau, I. von; Nathrath, M. Strong Expression of CXCL12 Is Associated with a Favorable Outcome in Osteosarcoma. *Modern Pathology* **2012**, *25*, 522–528, doi:10.1038/modpathol.2011.193.

233. LIAO, Y.-X.; ZHOU, C.-H.; ZENG, H.; ZUO, D.-Q.; WANG, Z.-Y.; YIN, F.; HUA, Y.-Q.; CAI, Z.-D. The Role of the CXCL12-CXCR4/CXCR7 Axis in the Progression and Metastasis of Bone Sarcomas (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2013**, *32*, 1239–1246, doi:10.3892/ijmm.2013.1521.

234. Feng, S.; Shi, X.; Ren, K.; Wu, S.; Sun, X. [Corrigendum] Focal Adhesion Kinase Is Involved in the Migration of Human Osteosarcoma Cells. *Oncol. Lett.* **2020**, *21*, 135, doi:10.3892/ol.2020.12396.

235. Gu, H.; Zhou, B. Focal Adhesion Kinase Promotes Progression and Predicts Poor Clinical Outcomes in Patients with Osteosarcoma. *Oncol. Lett.* **2018**, doi:10.3892/ol.2018.8152.

236. Sotillo-Piñeiro, E.; Sierrasesúmaga, L.; Patiño-García, A. Telomerase Activity and Telomere Length in Primary and Metastatic Tumors from Pediatric Bone Cancer Patients. *Pediatr. Res.* **2004**, *55*, 231–235, doi:10.1203/01.PDR.0000102455.36737.3C.

237. Sanders, R.P.; Drissi, R.; Billups, C.A.; Daw, N.C.; Valentine, M.B.; Dome, J.S. Telomerase Expression Predicts Unfavorable Outcome in Osteosarcoma. *Journal of Clinical Oncology* **2004**, *22*, 3790–3797, doi:10.1200/JCO.2004.03.043.

238. Zhang, J.-M.; Genois, M.-M.; Ouyang, J.; Lan, L.; Zou, L. Alternative Lengthening of Telomeres Is a Self-Perpetuating Process in ALT-Associated PML Bodies. *Mol. Cell* **2021**, *81*, 1027-1042.e4, doi:10.1016/j.molcel.2020.12.030.

239. de Nonneville, A.; Salas, S.; Bertucci, F.; Sobinoff, A.P.; Adélaïde, J.; Guille, A.; Finetti, P.; Noble, J.R.; Churikov, D.; Chaffanet, M.; et al. TOP3A Amplification and ATRX Inactivation Are Mutually Exclusive Events in Pediatric Osteosarcomas Using ALT. *EMBO Mol. Med.* **2022**, *14*, EMMM202215859, doi:10.15252/emmm.202215859.

240. Root, H.; Larsen, A.; Komosa, M.; Al-Azri, F.; Li, R.; Bazett-Jones, D.P.; Stephen Meyn, M. FANCD2 Limits BLM-Dependent Telomere Instability in the Alternative Lengthening of Telomeres Pathway. *Hum. Mol. Genet.* **2016**, *25*, 3255–3268, doi:10.1093/hmg/ddw175.

241. Taglialatela, A.; Lee, J.; Azeroglu, B.; Chen, X.; Dello Stritto, M.R.; Gouge, A.; Lama-Diaz, T.; Vaitsiankova, A.; Leuzzi, G.; Dela Cruz, F.; et al. SMARCAL1 Is a Candidate Therapeutic Target for ALT-Positive Tumors. *Genes Dev.* **2026**, *40*, 1283–1303, doi:10.1101/gad.353377.125.

242. Francia, S.; Weiss, R.S.; Hande, M.P.; Freire, R.; d'Adda di Fagagna, F. Telomere and Telomerase Modulation by the Mammalian Rad9/Rad1/Hus1 DNA-Damage-Checkpoint Complex. *Current Biology* **2006**, *16*, 1551–1558, doi:10.1016/j.cub.2006.06.066.

243. Bryan, T.M.; Englezou, A.; Gupta, J.; Bacchetti, S.; Reddel, R.R. Telomere Elongation in Immortal Human Cells without Detectable Telomerase Activity. *EMBO J.* **1995**, *14*, 4240–4248, doi:10.1002/j.1460-2075.1995.tb00098.x.

244. Henson, J.D.; Hannay, J.A.; McCarthy, S.W.; Royds, J.A.; Yeager, T.R.; Robinson, R.A.; Wharton, S.B.; Jellinek, D.A.; Arbuckle, S.M.; Yoo, J.; et al. A Robust Assay for Alternative Lengthening of Telomeres in Tumors Shows the Significance of Alternative Lengthening of Telomeres in Sarcomas and Astrocytomas. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 217–225.

245. Neumann, A.A.; Reddel, R.R. Telomere Maintenance and Cancer ? Look, No Telomerase. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 879–884, doi:10.1038/nrc929.

246. Bryan, T.M.; Englezou, A.; Dalla-Pozza, L.; Dunham, M.A.; Reddel, R.R. Evidence for an Alternative Mechanism for Maintaining Telomere Length in Human Tumors and Tumor-Derived Cell Lines. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 1271–1274, doi:10.1038/nm1197-1271.

247. Gary A. Ulaner; Hsuan-Ying Huang; Jesse Otero; Zhiquan Zhao; Leah Ben-Porat; Jaya M. Satagopan; Richard Gorlick; Paul Meyers; John H. Healey; Andrew G. Huvos; et al. Absence of a Telomere Maintenance Mechanism as a Favorable Prognostic Factor in Patients with Osteosarcoma. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 1759–1763.

248. Lovejoy, C.A.; Li, W.; Reisenweber, S.; Thongthip, S.; Bruno, J.; de Lange, T.; De, S.; Petrini, J.H.J.; Sung, P.A.; Jasin, M.; et al. Loss of ATRX, Genome Instability, and an Altered DNA Damage Response Are Hallmarks of the Alternative Lengthening of Telomeres Pathway. *PLoS Genet.* **2012**, *8*, e1002772, doi:10.1371/journal.pgen.1002772.

249. Heaphy, C.M.; Subhawong, A.P.; Hong, S.-M.; Goggins, M.G.; Montgomery, E.A.; Gabrielson, E.; Netto, G.J.; Epstein, J.I.; Lotan, T.L.; Westra, W.H.; et al. Prevalence of the Alternative Lengthening of Telomeres Telomere Maintenance Mechanism in Human Cancer Subtypes. *Am. J. Pathol.* **2011**, *179*, 1608–1615, doi:10.1016/j.ajpath.2011.06.018.

250. Garcia-Ortega, D.Y.; Cabrera-Nieto, S.A.; Caro-Sánchez, H.S.; Cruz-Ramos, M. An Overview of Resistance to Chemotherapy in Osteosarcoma and Future Perspectives. *Cancer Drug Resistance* **2022**, *5*, 762–793, doi:10.20517/cdr.2022.18.

251. Sagheb, I.S.; Coonan, T.P.; Randall, R.L.; Griffin, K.H.; Leach, J.K. Extracellular Matrix Production and Oxygen Diffusion Regulate Chemotherapeutic Response in Osteosarcoma Spheroids. *Cancer Med.* **2024**, *13*, doi:10.1002/cam4.70239.

252. Sandhu, V.; Bakkalci, D.; Wei, S.; Cheema, U. Enhanced Biomimetics of Three-Dimensional Osteosarcoma Models: A Scoping Review. *Cancers (Basel).* **2023**, *16*, 164, doi:10.3390/cancers16010164.

253. Sutherland, R.M. Cell and Environment Interactions in Tumor Microregions: The Multicell Spheroid Model. *Science (1979).* **1988**, *240*, 177–184, doi:10.1126/science.2451290.

254. Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell* **2012**, *148*, 399–408, doi:10.1016/j.cell.2012.01.021.

255. Lei, H.-M.; Zhang, K.-R.; Wang, C.H.; Wang, Y.; Zhuang, G.-L.; Lu, L.-M.; Zhang, J.; Shen, Y.; Chen, H.-Z.; Zhu, L. Aldehyde Dehydrogenase 1A1 Confers Erlotinib Resistance via Facilitating the Reactive Oxygen Species-Reactive Carbonyl Species Metabolic Pathway in Lung Adenocarcinomas. *Theranostics* **2019**, *9*, 7122–7139, doi:10.7150/thno.35729.

256. Lohberger, B.; Rinner, B.; Stuendl, N.; Absenger, M.; Liegl-Atzwanger, B.; Walzer, S.M.; Windhager, R.; Leithner, A. Aldehyde Dehydrogenase 1, a Potential Marker for Cancer Stem Cells in Human Sarcoma. *PLoS One* **2012**, *7*, e43664, doi:10.1371/journal.pone.0043664.

257. Yokoyama, T.; Saitoh, M.; Miyazawa, K. <scp>TGF</Scp> -β Enhances Doxorubicin Resistance and Anchorage-Independent Growth in Cancer Cells by Inducing <scp> *ALDH1A1* </Scp> Expression. *Cancer Sci.* **2025**, *116*, 2176–2188, doi:10.1111/cas.70109.

258. Gonçalves, C.; Martins-Neves, S.R.; Paiva-Oliveira, D.; Oliveira, V.E.B.; Fontes-Ribeiro, C.; Gomes, C.M.F. Sensitizing Osteosarcoma Stem Cells to Doxorubicin-Induced Apoptosis through Retention of Doxorubicin and Modulation of Apoptotic-Related Proteins. *Life Sci.* **2015**, *130*, 47–56, doi:10.1016/j.lfs.2015.03.009.

259. Martins-Neves, S.R.; Paiva-Oliveira, D.I.; Wijers-Koster, P.M.; Abrunhosa, A.J.; Fontes-Ribeiro, C.; Bovée, J.V.M.G.; Cleton-Jansen, A.-M.; Gomes, C.M.F. Chemotherapy Induces Stemness in Osteosarcoma Cells through Activation of Wnt/β-Catenin Signaling. *Cancer Lett.* **2016**, *370*, 286–295, doi:10.1016/j.canlet.2015.11.013.

260. Han, Y.; Li, H.; Xue, C.; Pan, L.; Liu, L.; Chen, H.; Wang, Z.; Ji, F.; Zhang, Y.; Kang, X.; et al. C/EBP Alpha Agonist ICCB280 Overcomes Doxorubicin Resistance in Osteosarcoma through Mitochondrial Dynamics-Dependent GREM1-MAPK Activation. *Cell Death Dis.* **2026**, *17*, 783, doi:10.1038/s41419-026-08980-y.

261. Neckmann, U.; Wolowczyk, C.; Hall, M.; Almaas, E.; Ren, J.; Zhao, S.; Johannessen, B.; Skotheim, R.I.; Bjørkøy, G.; ten Dijke, P.; et al. GREM1 Is Associated with Metastasis and Predicts Poor Prognosis in ER-Negative Breast Cancer Patients. *Cell Communication and Signaling* **2019**, *17*, 140, doi:10.1186/s12964-019-0467-7.

262. Fanelli, M.; Tavanti, E.; Patrizio, M.P.; Vella, S.; Fernandez-Ramos, A.; Magagnoli, F.; Luppi, S.; Hattinger, C.M.; Serra, M. Cisplatin Resistance in Osteosarcoma: In Vitro Validation of Candidate DNA Repair-Related Therapeutic Targets and Drugs for Tailored Treatments. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, doi:10.3389/fonc.2020.00331.

263. Yu, L.; Fan, Z.; Fang, S.; Yang, J.; Gao, T.; Simões, B.M.; Eyre, R.; Guo, W.; Clarke, R.B. Cisplatin Selects for Stem-like Cells in Osteosarcoma by Activating Notch Signaling. *Oncotarget* **2016**, *7*, 33055–33068, doi:10.18632/oncotarget.8849.

264. Igarashi, K.; Yamamoto, N.; Shirai, T.; Hayashi, K.; Nishida, H.; Kimura, H.; Takeuchi, A.; Miwa, S.; Inatani, H.; Shimozaki, S.; et al. Impact of Excision Repair Cross-Complementation Group 1 (ERCC1) Protein on Survival of Patients with Osteosarcoma Treated with Cisplatin-Based Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* **2014**, *32*, 10535–10535, doi:10.1200/jco.2014.32.15_suppl.10535.

265. Cao, Z.H.; Yin, H.P.; Jiang, N.; Yu, B. Association between ERCC1 and ERCC2 Gene Polymorphisms and Chemotherapy Response and Overall Survival in Osteosarcoma. *Genetics and Molecular Research* **2015**, *14*, 10145–10151, doi:10.4238/2015.August.21.21.

266. Goričar, K.; Kovač, V.; Jazbec, J.; Zakotnik, B.; Lamovec, J.; Dolžan, V. Genetic Variability of DNA Repair Mechanisms and Glutathione-S-Transferase Genes Influences Treatment Outcome in Osteosarcoma. *Cancer Epidemiol.* **2015**, *39*, 182–188, doi:10.1016/j.canep.2014.12.009.

267. Liu, Y.; Wu, X.; Sun, Y.; Chen, F. Silencing of X-Linked Inhibitor of Apoptosis Decreases Resistance to Cisplatin and Paclitaxel but Not Gemcitabine in Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of International Medical Research* **2011**, *39*, 1682–1692, doi:10.1177/147323001103900510.

268. Deveraux, Q.L.; Roy, N.; Stennicke, H.R.; Van Arsdale, T.; Zhou, Q.; Srinivasula, S.M.; Alnemri, E.S.; Salvesen, G.S.; Reed, J.C. IAPs Block Apoptotic Events Induced by Caspase-8 and Cytochrome c by Direct Inhibition of Distinct Caspases. *EMBO J.* **1998**, *17*, 2215–2223, doi:10.1093/emboj/17.8.2215.

269. Abbas, R.; Larisch, S. Targeting XIAP for Promoting Cancer Cell Death-The Story of ARTS and SMAC. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/cells9030663.

270. Guo, W.; Healey, J.H.; Meyers, P.A.; Ladanyi, M.; Huvos, A.G.; Bertino, J.R.; Gorlick, R. Mechanisms of Methotrexate Resistance in Osteosarcoma. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 621–627.

271. Yu, W.; Min, D.; Lin, F.; Zheng, S.; Tang, L.; He, A.; Hu, H.; Shen, Z. <scp>SKA</Scp> 1 Induces *de Novo* <scp>MTX</Scp> -resistance in Osteosarcoma through Inhibiting <scp>FPGS</Scp> Transcription. *FEBS J.* **2019**, *286*, 2399–2414, doi:10.1111/febs.14808.

272. Bienemann, K.; Staege, M.S.; Howe, S.J.; Sena-Esteves, M.; Hanenberg, H.; Kramm, C.M. Targeted Expression of Human Folylpolyglutamate Synthase for Selective Enhancement of Methotrexate Chemotherapy in Osteosarcoma Cells. *Cancer Gene Ther.* **2013**, *20*, 514–520, doi:10.1038/cgt.2013.48.

273. Collier, C.D.; Wirtz, E.C.; Knafler, G.J.; Morris, W.Z.; Getty, P.J.; Greenfield, E.M. Micrometastatic Drug Screening Platform Shows Heterogeneous Response to MAP Chemotherapy in Osteosarcoma Cell Lines. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2018**, *476*, 1400–1411, doi:10.1007/s11999.0000000000000059.

274. Sandhu, V.; Bakkalci, D.; Wei, S.; Cheema, U. Enhanced Biomimetics of Three-Dimensional Osteosarcoma Models: A Scoping Review. *Cancers (Basel).* **2023**, *16*, 164, doi:10.3390/cancers16010164.

275. Palubeckaitė, I.; Venneker, S.; Briaire-de Bruijn, I.H.; van den Akker, B.E.; Krol, A.D.; Gelderblom, H.; Bovée, J.V.M.G. Selection of Effective Therapies Using Three-Dimensional in Vitro Modeling of Chondrosarcoma. *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *7*, doi:10.3389/fmolb.2020.566291.

276. Cortini, M.; Macchi, F.; Reggiani, F.; Vitale, E.; Lipreri, M.V.; Perut, F.; Ciarrocchi, A.; Baldini, N.; Avnet, S. Endogenous Extracellular Matrix Regulates the Response of Osteosarcoma 3D Spheroids to Doxorubicin. *Cancers (Basel).* **2023**, *15*, 1221, doi:10.3390/cancers15041221.

8. ŽIVOTOPIS

Karla Ostojić rođena je 30. srpnja 1996. godine u Zagrebu. Nakon završetka osnovne škole u Zagrebu, upisuje II. opću gimnaziju u Križanićevoj ulici, gdje maturira 2018. godine. Iste godine upisuje studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu. Završni rad pod naslovom „Biomarkeri u dječjoj onkologiji" izrađuje 2018. godine pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Jasminke Stepan Giljević te stiče akademski naziv prvostupnice medicinsko-laboratorijske dijagnostike. Nakon završetka preddiplomskog studija upisuje diplomski studij kliničkog nutricionizma na Zdravstvenim studijima Sveučilišta u Rijeci. Diplomski rad pod naslovom „Utjecaj luteolina i krizina na staničnu vijabilnost i oksidativni stres stanica osteosarkoma, glioblastoma i humanih embrionalnih stanica bubrega" izrađuje na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Sandre Kraljević Pavelić i uz laboratorijsko vodstvo prof. dr. sc. Inge Urlić. Diplomski rad obranila je 2021. godine. Godine 2022. upisuje doktorski studij biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Doktorsko istraživanje provodi u istraživačkoj grupi prof. dr. sc. Inge Urlić u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Razvoj metoda matematičkog modeliranja u biologiji i medicini". U studenome 2024. godine uspješno obrani prijavu teme doktorske disertacije. Tijekom doktorskog studija rezultate svojih istraživanja predstavlja na znanstvenim kongresima u Hrvatskoj i inozemstvu. Na 7. konferenciji Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR) osvaja nagradu Europskog društva za istraživanje raka (European Association for Cancer Research, EACR) za najbolje postersko priopćenje. U sklopu akademske mobilnosti provela je gotovo tri mjeseca u Valenciji, na Institutu za tkivno inženjerstvo (ICTB). Dosad je objavila sedam znanstvenih radova. Sudjelovala je u izvođenju nastave na kolegiju „Metode istraživanja u molekularnoj biologiji", neposredno vodila, odnosno sumentorira, dva diplomska rada te sudjelovala u organizaciji Europske olimpijade eksperimentalne znanosti (EOES) u Zagrebu. Članica je Hrvatskog društva za istraživanje raka, Europskog društva za istraživanje raka (EACR) i Hrvatskog biološkog društva. Trenutačno je zaposlena na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na radnom mjestu suradnice u sklopu inovativnog projekta LUMINATE, financiranog sredstvima programa Obzor Europa (Horizon Europe).