Onkolitička viroterapija osteosarkoma visokog stupnja malignosti

Jovičić, Sandro

Professional thesis / Završni specijalistički

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:904929

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO - BIOKEMIJSKI FAKULTET

Sandro Jovičić

Onkolitička viroterapija osteosarkoma visokog stupnja malignosti

Specijalistički rad

Zagreb, 2020. godina

Poslijediplomski specijalistički studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: izv.prof.dr.sc. Gordana Maravić Vlahoviček

Specijalistički rad obranjen je dana 31.01.2020.

na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv.prof.dr.sc. Sanja Dabelić

2. izv.prof.dr.sc. Gordana Maravić Vlahoviček

3. dr.sc. Andreja Ambriović Ristov, znanstvena savjetnica

Rad ima 99 listova.

PREDGOVOR

Specijalistički rad je izrađen pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Gordane Maravić Vlahoviček na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Najljepše se zahvaljujem mentorici izv.prof.dr.sc. Gordani Maravić Vlahoviček na pomoći i savjetima pri pisanju ovog rada.

Rad posvećujem svima koji ulažu svoje vrijeme i energiju u istraživanje i liječenje onkoloških bolesti.

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju

Onkolitička viroterapija osteosarkoma visokog stupnja malignosti

CILJ ISTRAŽIVANJA:

Cilj istraživanja je prikazati pregled dosadašnjih spoznaja o mogućnostima i izazovima liječenja primarnog osteosarkoma visokog stupnja malignosti korištenjem genske terapije putem rekombinantnih virusa.

Hipoteze istraživanja su:

1. Genska terapija rekombinantnim virusima predstavlja potencijal za liječenje primarnog osteosarkoma visokog stupnja malignosti.

2. Mehanizam djelovanja virusa razlikuje se od mehanizma djelovanja protutumorskih lijekova na tumorske stanice pa se učinak protutumorskih lijekova može povećati u kombinaciji s viroterapijom.

3. Razvojem viroterapije mogao bi se poboljšati ishod liječenja osteosarkoma.

MATERIJALI I METODE:

Rad daje pregled mogućnosti koje pruža primjena onkolitičke viroterapije u postizanju boljeg ishoda liječenja i kvalitete života osoba oboljelih od primarnog osteosarkoma visokog stupnja malignosti. Prikazani su problemi dosadašnje terapije osteosarkoma kao i razlozi za traženje novih načina liječenja ove vrste tumora. Opisani su onkolitički mehanizmi djelovanja različitih vrsta virusa na tumorske stanice te problemi koje je potrebno riješiti da bi ovakva vrsta terapije bila klinički primjenjiva i uspješna, kao i moguće strategije za rješavanje navedenih izazova.

REZULTATI:

Predloženo istraživanje daje uvid u mehanizme djelovanja rekombinantnih virusa na tumorske stanice, strategije za prevladavanje prepreka pri njihovoj primjeni *in vivo* te potencijalna mjesta djelovanja rekombinantnih virusa na tumorske stanice osteosarkoma, što bi moglo poslužiti kao izvor informacija za istraživanje novih načina liječenja osteosarkoma kao i liječenja drugih vrsta malignih tumora kod ljudi.

ZAKLJUČAK:

Nemogućnost izliječenja svih osoba oboljelih od osteosarkoma visokog stupnja malignosti dosadašnjim terapijskim protokolima zahtijeva razvoj novih terapijskih pristupa u rješavanju ove bolesti. Pretkliničke i kliničke studije su pokazale znanstvenu i kliničku utemeljenost primjene onkolitičke viroterapije u svrhu poboljšanja ishoda kod osoba oboljelih od osteosarkoma visokog stupnja malignosti, te da bi se ona mogla koristiti u kombinaciji s drugim terapijskim modalitetima. Opravdano je stoga nastaviti istraživanja s ciljem poboljšanja učinkovitosti i sigurnosti primjene onkolitičke viroterapije kod osoba oboljelih od osteosarkoma visokog stupnja malignosti.

SUMMARY

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Department of Biochemistry and Molecular Biology

Oncolytic virotherapy for high-grade osteosarcoma

OBJECTIVES:

The aim of the research is to present an overview of the current knowledge about the possibilities and challenges of a primary high grade osteosarcoma treatment using gene therapy through recombinant viruses.

Hypotheses are:

1. Gene therapy with recombinant viruses represents potential for the treatment of a primary high grade osteosarcoma.

2. The mechanism of virus induced oncolysis differs from the mechanism of antitumor drugs effect on tumor cells, and the effect of antitumor drugs can be increased in combination with virotherapy.

3. The development of virotherapy could improve the outcome of patients with osteosarcoma.

MATERIALS AND METHODS:

The research gives an overview of the possibilities of oncolytic virotherapy application in achieving a better outcome of treatment and the quality of life for patients with primary high osteosarcoma. Problems with the current treatment of this tumour and the reasons for seeking new ways of treating this type of tumour are presented. Oncolytic mechanisms of different types of viruses on tumour cells and problems that need to be solved in order to make this kind of therapy clinically applicable and successful are described, as well as possible strategies for solving these challenges.

RESULTS:

The proposed research provides insights into the mechanism of action of recombinant viruses on tumour cells, strategies for overcoming problems in their use *in vivo*, and potential sites of recombinant virus activity on osteosarcoma tumor cells, which could serve as a source of information to explore new ways of treating osteosarcoma, as well as treating others type of malignant tumours in humans.

CONCLUSION:

The inability to cure all persons with osteosarcoma with a high degree of malignancy in the past therapeutic protocols, requires the development of new therapeutic approaches in addressing this disease. Preclinical and clinical studies have demonstrated the scientific and clinical validity of the use of oncolytic virotherapy in order to improve outcomes in persons suffering from osteosarcoma with a high degree of malignancy, and that it could be used in combination with other therapeutic modalities. It is therefore justifiable to continue research in order to improve the efficacy and safety of oncolytic virotherapy in persons suffering from osteosarcoma with a high degree of malignancy.

SADRŽAJ SPECIJALISTIČKOG RADA

SAŽETAK.....IV

SUMMARY.....VI

SADRŽAJ.....VIII

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....1

1.1 OPĆE SPOZNAJE O MALIGNIM TUMORIMA KOSTIJU.....2

1.1.1 Terminologija.....2

1.1.2 Epidemiologija.....3

1.1.3 Etiologija.....4

1.1.4 Klinička slika.....5

1.1.5 Dijagnostika.....6

1.2 VRSTE OSTEOSARKOMA VISOKOG STUPNJA MALIGNOSTI…….....9

1.2.1 Konvencionalni osteosarkom.....10

1.2.2 Sekundarni osteosarkomi.....17

1.2.3 Teleangiektatski osteosarkom.....20

1.2.4 Osteosarkom malih stanica.....22

1.2.5 Površinski osteosarkom visokog stupnja malignosti.....24

1.2.6 Ekstraosealni osteosarkom.....25

2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....28

3. MATERIJALI I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI.....30

3.1 LIJEČENJE OSTEOSARKOMA VISOKOG STUPNJA MALIGNOSTI – DOSADAŠNJE SPOZNAJE, PROTOKOLI I PROBLEMI.....31

3.1.1 Osnovna načela primjene i djelovanja protutumorskih lijekova kod bolesnika s osteosarkomom.....32

3.1.2 Protutumorski lijekovi koji se primjenjuju za liječenje osteosarkoma.....36

3.1.3 Operativno liječenje osteosarkoma.....38

3.1.4 EURAMOS.....40

3.2 VIROTERAPIJA OSTEOSARKOMA.....43

3.2.1 Gensko liječenje (*engl.* gene therapy).....43

3.2.2 Prijenosni sustavi (vektori).....45

3.2.3 Opći koncept genskog liječenja zloćudnih tumora.....46

3.2.4 Onkolitička viroterapija.....47

3.2.5 Onkolitička viroterapija osteosarkoma.....48

3.2.6 Virusi u onkolitičkoj viroterapiji osteosarkoma.....50

3.2.7 Rizici primjene onkolitičke viroterapije.....65

4. RASPRAVA.....66

5. ZAKLJUČAK.....75

6. LITERATURA.....77

POPIS SKRAĆENICA.....83

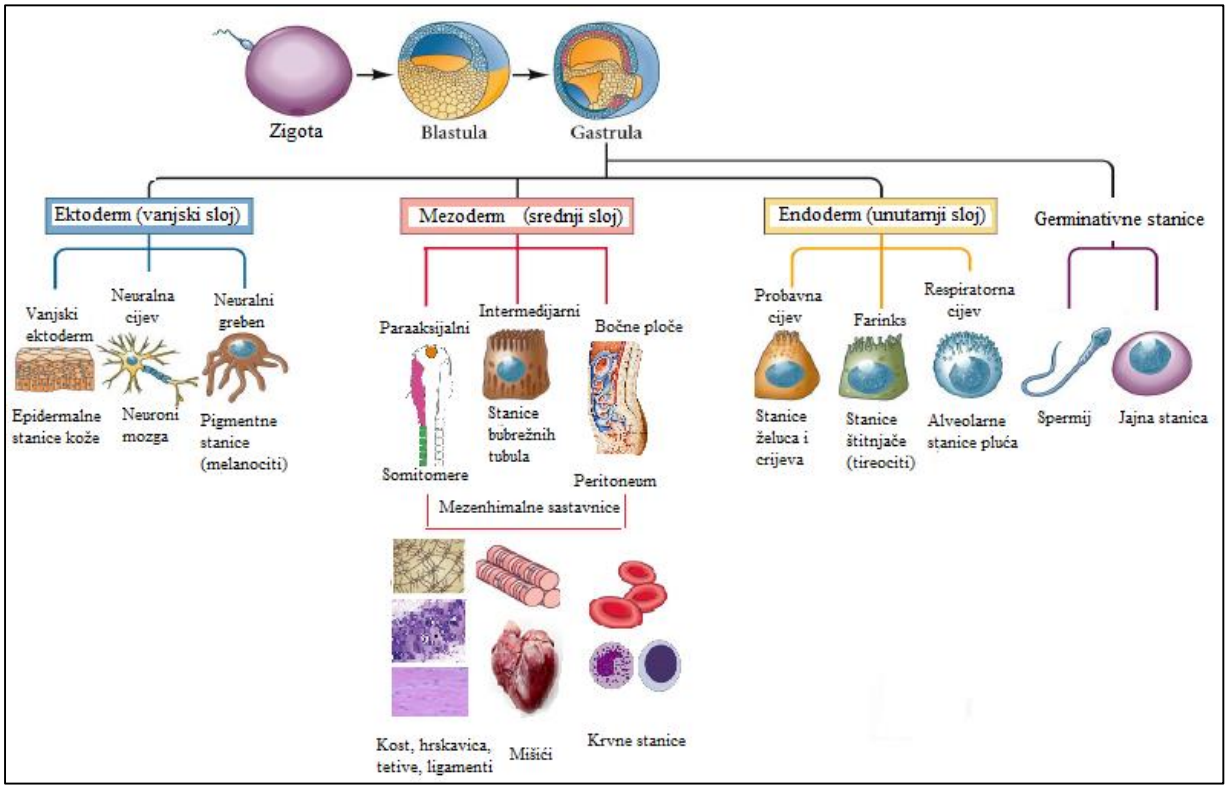
ŽIVOTOPIS.....89

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1 OPĆE SPOZNAJE O MALIGNIM TUMORIMA KOSTIJU

1.1.1 Terminologija

Pojam sarkom označava maligni tumor mezenhimalnog porijekla. Mezenhim je vrsta embrionalnog tkiva iz kojeg nastaje mišićno-koštano-zglobni sustav, vezivno i hematopoetsko tkivo, pa se pojam sarkom odnosi na maligne tumore koji su porijekla iz navedenih tkiva, uz važnu napomenu da su maligni tumori hematopoetskog tkiva uglavnom svrstani pod nazivima limfoma i leukemija (1). Mezenhim pak nastaje iz mezoderma (2), jednog od triju zametnih listića (ektoderm, mezoderm, endoderm) koji se nalaze u ranoj embrionalnoj fazi. Naime, gastrulacijom se jednoslojna struktura blastula reorganizira u troslojnu gastrulu, koja se sastoji od tri zametna listića, iz kojih će se diferencirati specifična tkiva i organi, kao što je prikazano na slici 1.



Slika 1. Tri zametna listića, rane faze razvoja derivata zametnih listića i primjeri tkiva koja iz njih nastaju *(preuzeto i prilagođeno iz 2,3).*

U nomenklaturi svih tumora pa tako i mezenhimalnih, nastoje se koristiti nazivi koji upućuju na vrstu tkiva iz kojeg tumor potječe i na njegovo biološko ponašanje (primjerice rabdomiosarkom označava maligni tumor porijekla iz poprečno-prugastih mišića, osteosarkom koštanog porijekla, hondrosarkom hrskavičnog porijekla, fibrosarkom porijekla iz fibroblasta koji čine vezivno tkivo itd). Nerijetko, zbog nedostatka dubljih spoznaja o tumoru, nazivi su opisni prema histološkoj slici ili sadrže ime autora (primjerice gigantocelularni tumor i Ewingov sarkom), a svi maligni tumori mezenhimalnog porijekla ne moraju sadržavati u svom nazivu imenicu sarkom (primjerice adamantinom) (1,4).

Napredak molekularno-genetičkih analitičkih metoda proširuje saznanja o ovim tumorima, što se odražava na njihovo reklasificiranje. U skladu s tim, Svjetska Zdravstvena Organizacija (*engl.* World Health Organisation, WHO) svakih nekoliko godina izdaje nove klasifikacije svih tumora i tumorima sličnih tvorbi kod ljudi (*engl.* WHO Classification of Tumors), pa je za potrebe ovog rada korištena klasifikacija tumora mekih tkiva i kostiju (*engl.* WHO Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone), u nastavku teksta WHO klasifikacija (4).

1.1.2 Epidemiologija

Maligni tumori kostiju čine oko 0,2% svih tumora kod ljudi. U ovaj postotak ulaze samo primarni sarkomi kostiju, što ne uključuje metastatske procese u kostima niti tumore hematopoetskog tkiva, koji su za razliku od primarnih malignih tumora kostiju, daleko učestaliji kada je riječ o koštanoj lokalizaciji. Obzirom na relativno malu zastupljenost ovih tumora u ukupnoj onkološkoj problematici, saznanja o njima su još uvijek daleko od dovoljnih. Ipak, to ne znači da je problem zanemariv ako uzmemo u obzir da se ovi tumori često javljaju kod mladih osoba i da prirodni tijek bolesti završava smrću oboljele osobe.

Osteosarkom je najčešći primarni maligni tumor kosti na kojega otpada oko 35% svih primarnih malignih tumora kostiju. Ima bimodalnu dobnu raspodjelu. Njegova pojavnost

prevladava u dobnoj skupini ispod dvadeset godina života gdje čini čak 80% svih malignih tumora kostiju, uglavnom ekstremiteta (apendikularni skelet), te predstavlja najčešći primarni maligni tumor kostiju djece i adolescenata. Sljedeća najučestalija pojava osteosarkoma jest nakon pedesete godine života, gdje on čini oko 50% svih primarnih malignih tumora kostiju, s tim da se ovdje nerijetko radi o sekundarnom osteosarkomu koji se češće javlja u aksijalnom skeletu (lubanja, kralježnica, zdjelica). U ovoj dobnoj skupini, osteosarkom je na drugom mjestu primarnih malignih tumora kostiju, iza hondrosarkoma koji se kod djece i adolescenata javlja vrlo rijetko (5).

1.1.3 Etiologija

Mezenhimalni tumori uglavnom nastaju *de novo,* ali za dio tumora se zna da nastaju na osnovi tzv. prekursorskih lezija, benignih promjena kosti koje pogoduju nastanku malignih tumora. Kad je riječ o osteosarkomu, takva pogodujuća stanja su Pagetova bolest, zatim oštećenja kosti uzrokovana zračenjem, fibrozna displazija, kronični osteomijelitis i prisutnost koštanih implantata. Osteosarkomi se ipak najčešće javljaju bez nekog jasnog uzroka, te kod osoba sa sindromima koje obilježava predispozicija za razvoj tumora, pa tako i osteosarkoma, u mlađoj životnoj dobi (primjerice obiteljska pojava retinoblastoma, Rothmund-Thomsonov sindrom i Li-Fraumenijev sindrom) (5,6,7,8).

Za neke od sarkoma pronađene su genske aberacije svojevrsne određenom sarkomu, no to nije slučaj za sve sarkome. Kod većine njih, pa tako i kod osteosarkoma, uglavnom se nailazi na čitav niz različitih genskih aberacija, stoga kod takvih tumora nije moguće na temelju genske analize tumorskog tkiva odrediti njihovu vrstu. Ipak, na temelju nekih genskih aberacija može se predvidjeti ponašanje bolesti, pa se tako neke aberacije povezuju s agresivnijim kliničkim tijekom i lošijom prognozom. Pojava osteosarkoma kod bolesnika oboljelih od određenih sindroma za koje se zna genetička podloga i koji su skloni obolijevanju od sarkoma u ranoj životnoj dobi, bar donekle rasvjetljava etiologiju osteosarkoma (8). Stanični geni koji potiču malignu transformaciju poznati su kao onkogeni i kodiraju specifične čimbenike rasta i

njihove receptore. Onkogeni mogu povećati broj kopija ili mutirati, zbog čega može nastati njihova prekomjerna ekspresija u malignim stanicama. Primjer za to je onkogen Bcl-2 koji sprječava apoptozu kao glavni mehanizam programirane stanične smrti i time potiče preživljenje stanica (9). Druga skupina su tumor supresorski geni koji mogu biti mutirani i time nefunkcionalni, a predstavnik takvog gena je p53 (10). Genske aberacije koje rezultiraju poremećajima mehanizama popravaka DNA imaju i kod sarkoma proonkogeni učinak.

1.1.4 Klinička slika

Klinička slika tumora kostiju nije specifična, posebno u ranoj fazi bolesti. Da bi se posumnjalo na maligni tumor kosti, polazi se od najčešće kombinacije simptoma, a to su bol, oteklina, smanjena funkcija ili deformacija zahvaćenog dijela tijela, ograničena pokretljivost zgloba u blizini tumorske mase i opći simptomi (povišena tjelesna temperatura, opća slabost, gubitak tjelesne težine i slično).

Bol je znak koji se javlja najčešće i najprije. Ispočetka ona nije stalna, nego povremena u mirovanju i/ili aktivnosti te je slična reumatskim bolovima. U slučaju tumora, radi se uglavnom o boli čija se pojava ne povezuje s opterećenjem i aktivnošću. Ipak, ako je zahvaćen zglob ili je nastala upalna reakcija zgloba na tumorsku masu koja je u blizini zgloba, opterećenje kao i pokreti mogu izazivati bol. Bol traje tjednima ili mjesecima i pojačava se u intenzitetu i trajanju, te je okarakterizirana kao duboka i probadajuća. Često se zamijeni za reumatsku bol i odvuče pažnju kliničara u pogrešnom smjeru. Znak koji najviše pobuđuje sumnju jest noćna bol uvijek prisutna na istom mjestu, koja ometa san, posebno kod djece, a doživljava se vjerojatno jer nema dnevnih aktivnosti koje bi odvlačile djetetovu pažnju. Jedan od mogućih razloga pojave noćne boli kod djece s osteosarkomom jest i pojačano lučenje hormona rasta noću koji utječe na rast tumorskih stanica. Noćna bol je važan klinički znak kod djece, ali nije specifičan za osteosarkom. I različite druge bolesti se mogu manifestirati noćnim bolima, primjerice bakterijske upale kosti. Kod odraslih osoba tumorska masa smještena u kostima kralježnice može pritiskati korijen živca i oponašati radikulopatije uzrokovane degenerativnim

promjenama. Stoga svaka bol koja traje dulje od 6 tjedana svakako zahtijeva detaljniju obradu. Naglo pojačanje boli i nemogućnost opterećenja zahvaćene kosti može značiti patološki prijelom, koji se događa kada tumor toliko oslabi kost da ona nije sposobna podnijeti fiziološko opterećenje.

Drugi važan znak je oteklina koja se kod malignih tumora brzo povećava, a primjećuje se ako je tumorska masa u mekim tkivima, dakle izvan kosti. Zbog otekline, vidljivi venski crtež kože postaje izraženiji zbog opstrukcije drenaže venske krvi koju uzrokuje tumorska masa. U rijetkim i zapuštenim slučajevima, tumorska masa može probiti kožu (egzulcerirati) tj.manifestirati se kao ulkus koji ne cijeli.

Opći simptomi kao što su umor, smanjenje tjelesne težine u relativno kratkom roku bez poznatih promjena u prehrambenim navikama, kao i povremeno povišena tjelesna temperatura kasniji su znakovi već uznapredovale tumorske bolesti (1,5,11).

1.1.5 Dijagnostika

Još uvijek ne postoje klinički primjenjivi laboratorijski pokazatelji koji bi ukazivali na postojanje ove vrste tumora u organizmu, no povišena serumska alkalna fosfataza i laktat dehidrogenaza upućuju da je kost mogući izvor tih povišenih vrijednosti. Navedene laboratorijske promjene ne koriste se u probiru koštanih tumora jer su nespecifične, ali ponekad mogu biti korisne u praćenju već otkrivenog tumora. Ovdje se jasno uočava još jedna razlika mezenhimalnih malignih tumora prema epitelnima, za koje je poznato da se relativno pouzdano mogu pratiti koristeći adekvatnu paletu tzv. tumorskih biljega. Tumorski biljezi za sada nisu u kliničkoj uporabi kad je riječ o primarnim malignim koštanim tumorima, pa tako i osteosarkomu.

Radiološka dijagnostika nastavak je kliničkog pregleda. Patološki nalaz slikovne obrade odraz je biološkog ponašanja tumora. Ona uključuje pregled zahvaćene kosti, ali i čitavog organizma radi uočavanja metastaza. Obavlja se prije započinjanja liječenja u diferencijalno-dijagnostičke svrhe te za planiranje biopsije i liječenja, a zatim se, prema

kliničkoj potrebi i onkološkim protokolima, nastavlja tijekom liječenja radi praćenja bolesti. Kompjutorizirana tomografija (CT) pokazuje trodimenzionalnu sliku tumora, a magnetska rezonancija (MR) odnos prema okolnim mekim strukturama, krvnim žilama i živcima te građu tumorske mase, što je sve važno odrediti prilikom planiranja operativnog zahvata kao i praćenja ponašanja tumorske mase za vrijeme primjene protutumorskih lijekova.

Kod osteosarkoma moguća je multicentričnost (pojava više primarnih tumora u različitim kostima u isto vrijeme), zatim postojanje primarne i metastatske lezije u istoj kosti (*engl.* skip metastasis) te metastaza u drugim kostima i udaljenim organima, najčešće u plućima. Za detektiranje tih promjena koristi se scintigrafija tehnecijem 99 (Tc99 metilendifosfonat). Pozitron emisijska tomografija (PET) se obično koristi kod procjene raširenosti bolesti kao i razlučivanja radi li se o povratu bolesti nakon provedenog liječenja, ako se navedeno ne može detektirati drugim radiološkim slikovnim metodama. Na temelju radiološke dijagnostike procjenjuje se i raširenost bolesti radi klasificiranja, najčešće su to Ennekingov sustav za klasificiranje proširenosti zloćudnih bolesti lokomotornog sustava (uzima u obzir gradus tumora, proboj tumora izvan kosti i postojanje metastaza), AJCC (American Joint Committee on Cancer) klasifikacija, te TNM-sustav za procjenu proširenosti tumora koji uključuje procjenu primarnog tumora (oznaka T), zahvaćanje limfnih čvorova (oznaka N) i prisutnost udaljenih metastaza (oznaka M) (5,11).

Ključnu ulogu u postavljanju ispravne dijagnoze malignog tumora kosti ima biopsija tumorske promjene, koja se obvezno mora učiniti prije započinjanja liječenja. Biopsija se izvodi prema određenim pravilima koja imaju za svrhu dobivanje reprezentativnog uzorka tkiva uz što manju kontaminaciju okolnih tkiva tumorskim stanicama. Kontaminacija (*engl.* seeding) i ulazak tumorskih stanica u cirkulaciju, na žalost se ne mogu izbjeći prilikom biopsije, ali ovaj neizostavan postupak ima svoje opravdanje u činjenici da bez patohistološke analize nema ni dijagnoze, a time niti pravilnog liječenja, te da se maligni tumor kosti smatra sistemskom bolešću već u trenutku otkrivanja. Bioptat (uzorak uzetog tkiva) se u slučaju koštanih tumora uglavnom najprije podvrgava procesu dekalcinacije da bi se mogao pripremiti za analizu

mikroskopom. Tanki rezovi tkiva se na kraju uklapaju na predmetna stakalca, ali se prije moraju obojati da bi se omogućila vizualizacija tkiva. Bojanje se rutinski provodi hematoksilinom i eozinom (H&E), odnosno prema potrebi imunohistokemijski pomoću određenih protutijela. Imunohistokemijska bojanja u slučaju osteosarkoma su od eliminacijskog značenja, što znači da ne postoji paleta protutijela koja bi s velikom vjerojatnošću upućivala na dijagnozu. Stoga patohistološka dijagnoza osteosarkoma uvelike ovisi o iskustvu liječnika patologa, te je zbog posebitosti koštanih tumora, dijagnostika temeljena na histološkoj slici (patohistološka analiza uzorka tkiva koju obavlja liječnik patolog) i na radiološko-patohistološko-kliničkoj korelaciji. Patohistološka analiza tumora kosti nema samo ulogu u postavljanju dijagnoze. Naime, nakon što je postavljena dijagnoza osteosarkoma visokog stupnja malignosti iz bioptata, započinje se onkološko liječenje protutumorskim lijekovima prema EURAMOS (European and American Osteosarcoma Studies) protokolu za liječenje osteosarkoma visokog stupnja malignosti. Primjena protutumorskih lijekova u liječenju malignih tumora naziva se i neoadjuvantna kemoterapija i ima za cilj smanjenje lokalne tumorske mase i metastaza. Kad se tumor smanji, pogodan je za operativno uklanjanje. Uklonjeni tumor se ponovno patohistološki analizira da bi se odredilo koliko tumorske stanice dopiru do ruba preparata te kakav je odgovor tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju. Odgovor se opisuje prema Salzer Kuntschik i Huvos klasifikacijama, koje se temelje na određivanju postotka živih (vijabilnih) tumorskih stanica nakon provedene neoadjuvantne kemoterapije. Ovo je ključna informacija za nastavak liječenja kao i prognozu. Ako je odgovor slab, to je najvjerojatnije zbog toga što tumorske stanice ne reagiraju na primijenjenu kombinaciju protutumorskih lijekova, pa nema smisla nastaviti s njima ili bar ne u istoj dozi i kombinaciji. S druge strane, kako je spektar protutumorskih lijekova koji se primijenjuju za liječenje osteosarkoma relativno uzak, loš odgovor na neoadjuvantnu kemoterapiju ujedno je i loš prognostički pokazatelj.

Obzirom na navedeno, citološka dijagnostika osteosarkoma nema veće značenje jer se uzorak sastoji od raspršenih staničnih elemenata, te nema odnosa među sastavnicama tkiva što uvelike otežava ionako složenu dijagnostiku ovih tumora. Citološka analiza se još uvijek

nije pokazala osjetljivijom niti specifičnijom u odnosu na patohistološku te se kao takva ne preporučuje u postavljanju dijagnoze. Ipak, obično analiza otiska uzorka tumora (*engl*. imprint) uzetog za vrijeme operativnog zahvata bude brže gotova i može preliminarno uputiti kliničara na moguće biološko ponašanje tumora i prije nego točna patohistološka dijagnoza bude postavljena (12).

Zaključno, pristup bolesniku s malignim tumorom kosti se temelji na multidisciplinarnosti (onkolog, ortoped, radiolog, patolog), u kojoj će sve važniju ulogu imati genska analiza tumorskog tkiva radi određivanja individualne terapije. Kod osteosarkoma, genska analiza i genska terapija još su uvijek u eksperimentalnoj fazi, te nemaju širu kliničku primjenu.

1.2 VRSTE OSTEOSARKOMA VISOKOG STUPNJA MALIGNOSTI

Osteosarkom je maligni tumor čije stanice proizvode osteoid. Osteoid je nemineralizirani koštani matriks. Pod nazivom osteosarkom najčešće se podrazumijeva konvencionalni osteosarkom, ali postoji više vrsta osteosarkoma različitog stupnja malignosti (tablica 1).

Maligni koštani tumori najčešće potječu iz same kosti (osteogeni), no mogu nastati i u mekim tkivima kao što je to slučaj s ekstraosealnim osteosarkomom koji, prema WHO klasifikaciji, spada u skupinu tumora mekih tkiva. Prema najnovijoj WHO klasifikaciji, sekundarni osteosarkomi okarakterizirani su kao konvencionalni osteosarkomi, dok su u prethodnoj klasifikaciji iz 2002. godine bili svrstani u zasebnu kategoriju (13).

Tablica 1. Klasifikacija benignih i malignih koštanih tumora *(preuzeto i prerađeno iz 4).*

NAZIV TUMORA	Klasifikacija tumora prema WHO	Biološko ponašanje
OSTEOM	Tumor kosti	Benigni
OSTEOID OSTEOM	Tumor kosti	Benigni
OSTEOBLASTOM	Tumor kosti	Benigni
KONVENCIONALNI OSTEOSARKOM	Tumor kosti	Maligni, visokog stupnja malignosti
TELEANGIEKTATSKI OSTEOSARKOM	Tumor kosti	Maligni, visokog stupnja malignosti
OSTEOSARKOM MALIH STANICA	Tumor kosti	Maligni, visokog stupnja malignosti
CENTRALNI OSTEOSARKOM NISKOG GRADUSA	Tumor kosti	Maligni, niskog stupnja malignosti
PAROSTEALNI OSTEOSARKOM	Tumor kosti	Maligni, niskog stupnja malignosti
PERIOSATELNI OSTEOSARKOM	Tumor kosti	Maligni, srednjeg stupnja malignosti
POVRŠINSKI OSTEOSARKOM VISOKOG STUPNJA MALIGNOSTI	Tumor kosti	Maligni, visokog stupnja malignosti
EKSTRAOSEALNI OSTEOSARKOM	Tumor mekih tkiva	Maligni, visokog stupnja malignosti

1.2.1 Konvencionalni osteosarkom

Brojni su sinonimi za ovaj tumor: klasični osteosarkom, osteogeni sarkom, osteosarkom koji nije drugačije specificiran, osteohondrosarkom, osteoblastični sarkom, hondroblastični osteosarkom, fibroblastični osteosarkom, osteofibrosarkom, centralni osteosarkom, centralni osteogeni sarkom, konvencionalni centralni osteosarkom, medularni osteosarkom, sklerozirajući osteosarkom.

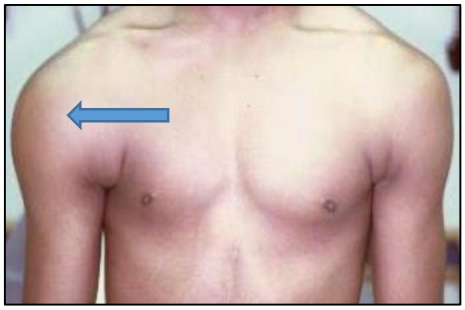
Epidemiologija: Konvencionalni osteosarkom je najčešći primarni nehematopoetski tumor kostiju koji se javlja s incidencijom 4-5 na 1 000 000. Pojavnost nije povezana s etničkom pripadnošću ili rasom, ali pokazuje bimodalnu dobnu raspodjelu. Najčešći je tumor kosti mladih osoba, naime 60% bolesnika je u dobi ispod 25 godina, a pojavnost ponovno raste nakon

40-te godine života. Tumor je češći kod muških osoba, u omjeru 3:2, što je posebno naglašeno kod mladih, dok se taj omjer poravnava s porastom životne dobi.

Etiologija: Nije poznata. Postoje stanja koja mu predisponiraju, no nisu specifično vezana za ovu vrstu tumora nego se u podlozi istih stanja mogu javiti i neki drugi tumori. Predisponirajući čimbenici za razvoj konvencionalnog osteosarkoma mogu biti Pagetova bolest, izloženost zračenju, kronični osteomijelitis, fibrozna displazija i prisustvo metalnih implantata u kostima.

Predilekcijska mjesta: Tumor započinje rast iz medule kosti zbog čega ga se svrstava u centralne, 91% ih raste iz metafize, a nešto manje od 9% iz dijafize. Epifiza je rijetko kad primarno mjesto tumorskog rasta. Najčešće su zahvaćene duge kosti i to distalni okrajak bedrene kosti (femura) i proksimalni okrajak goljenične kosti (tibije). Vrlo rijetko primarno sijelo su male kosti šake i stopala. Lubanja, kralježnica i zdjelica su primarno zahvaćene najčešće u kasnijoj životnoj dobi. Jedna kost može imati u isto vrijeme više primarnih lezija koje nisu međusobno povezane što je odraz ili multicentričnosti (tumor u isto vrijeme nastaje na različitim mjestima u kosti) ili se radi o tzv. „skip“ metastazi.

Klinička slika: Simptomi traju nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci. Rani simptomi su nespecifični, odnosno ne ukazuju na dijagnozu, te postupno postaju izraženiji. Bol je vodeći simptom uz eventualno opipljivu bolnu oteklinu (slika 2).



Slika 2. Oteklina (*lat*. tumor) desnog ramena kod bolesnika s osteosarkomom *(preuzeto i prilagođeno iz 14).*

Bol se opisuje kao duboka i jaka, izraženija noću kada nema dnevnih aktivnosti koje bi odvačile pažnju. Noćna bol je važan klinički znak kod djece, ali nije specifičan za osteosarkom. Ostali znakovi kojim se tumor može prezentirati su smanjena pokretljivost susjednog zgloba,

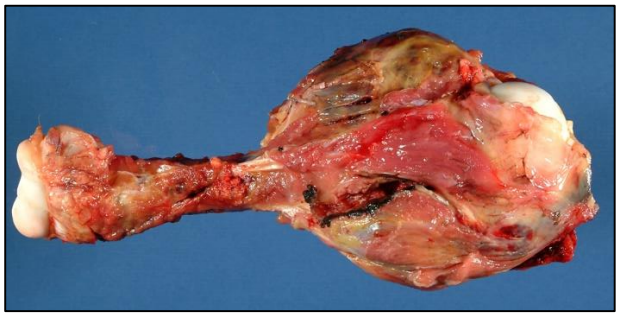
pojačana toplina kože i izražen venski crtež iznad tumora. Obzirom da je kod djece metafiza česta lokalizacija tumora, a tumor ima mogućnost prelaska ploče rasta, mogući su i poremećaji u rastu kosti, najčešće u smislu iskrivljenja. Iznenadan rast tumorske mase i pojačanje boli mogu upućivati na krvarenje u tumoru. Patološki prijelom nije najvažniji znak konvencionalnog osteosarkoma i može ga se naći kod oko 5-10% bolesnika.

Radiološka obrada: Rendgenske snimke tumora odraz su njegovog biološkog ponašanja, reakcije okolne kosti i mekih tkiva na tumor. Najčešće se radi o osteolitično-osteoblastičnoj leziji koja se iz medule kosti širi prema kortikalisu, stanjuje ga i mjestimično probija te se dalje prati kao mekotkivna tumorska masa koja potiskuje periost i okolna meka tkiva, ali uglavnom ostaje dugo unutar periosta (slika 3). Veća tumorska masa može probiti periost. Unutar kosti, tumor prelazi ploču rasta, ulazi u epifizu i rijetko, ali moguće, probija zglobnu hrskavicu i ulazi u zglobni prostor.

Slika 3. Rendgenska snimka osteosarkoma proksimalnog okrajka nadlaktične kosti *(preuzeto i prilagođeno iz 15).*

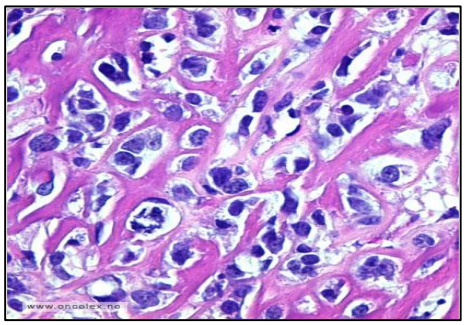
Makroskopski izgled: Tumorska masa u vrijeme otkrivanja i uklanjanja je u najvećem broju slučajeva veća od 5 cm, različite konzistencije. Mjestimično masa je mekša, prožeta krvarenjem, nekrozom, degenerativnim cistama ispunjenima bistrim ili hemoragičnim sadržajem, a mjestimično tvrđe konzistencije zbog skleroze, hrskavičnog ili koštanog matriksa, odnosno kalcifikacija (slika 4). Važno je napomenuti da se kalcifikacije i osifikacije uglavnom javljaju u sredini tumora zbog čega su granice tumora neoštre prema periferiji, a što može biti

od koristi pri diferencijalno-dijagnostičkim nedoumicama koje se ponekad nameću tijekom interpretacije radioloških snimki bolesnika.



Slika 4. Makroskopski preparat konvencionalnog osteosarkoma nadlaktične kosti *(preuzeto i prilagođeno iz 16).*

Mikroskopski izgled: Obzirom da je konvencionalni osteosarkom tumor visokog stupnja malignosti, histološki je građen od anaplastičnih pleomorfnih stanica. Tumorske stanice stoga mogu različito izgledati, a ako dominira neki stanični izgled, tumor se tako pri opisu može i okarakterizirati. Tako primjerice stanice mogu izgledati epiteloidno, vretenasto, male okrugle, svijetle ili multinuklearne orijaške, a moguće je da u istom tumoru dominiraju dva ili više tipova staničnog izgleda. Ipak, ono što određuje osteosarkom jest proizvodnja osteoida od strane tumorskih stanica (slika 5).



Slika 5. Primjer histološkog izgleda osteosarkoma *(preuzeto i prilagođeno iz 17)*.

Na histološkim H&E preparatima osteoid je gusti ružičasti materijal kojega treba razlikovati od drugih materijala kao što su primjerice fibrin, kolagen ili amiloid, a koji mogu imati sličan histološki izgled. Osteoid izgleda poput razgranatih krivulja različite debljine koje formiraju

lakune, a može se i apozicijski odlagati na normalne koštane trabekule. Maligne stanice koje proizvode osteoid su uklopljene u njega, stoga pored gore opisanog izgleda, mogu u obilnom osteoidu izgledati piknotično i pokazivati vrlo malo atipije. Osim područja osteoida, tumor može imati i područja hrskavičnog i vezivnog tkiva, te se na osnovi prevladavajuće sastavnice tumor najčešće opisuje kao osteoblastični, hondroblastični ili fibroblastični. U oko 50% slučajeva prevladava osteoblastična sastavnica, oko 25% ih je hondroblastičnih, a oko 25% je fibroblastičnih. Hrskavična područja izgledom su kao kod tumora hrskavičnog porijekla visokog stupnja malignosti, izmiješana s miksoidnim elementima i obično slabo makroskopski prepoznatljiva. Fibroblastični tumori imaju vrlo malo osteoida te malo ili ni malo hrskavičnog matriksa. Metastaze uglavnom izgledaju kao primarni tumor, no nije rijetkost da su metastatske promjene različite od primarnih, najčešće u smislu fibroblastičnih. Grupiranje konvencionalnog osteosarkoma prema prevladavajućoj histološkoj slici do sada je bilo od akademskog značenja, jer nije bilo dokaza da se ono može iskoristiti kao prognostički čimbenik, no to će se vjerojatno u budućnosti promijeniti, jer prema zadnjim istraživanjima čini se da ipak postoje razlike u očekivanom preživljenju bolesnika obzirom na histološki podtip. To pak može značiti da će i terapijski pristup biti prilagođen histološkom podtipu tumora. Tumorske stanice koje su uništene preoperativnom kemoterapijom zamjenjuju se upalnim stanicama, granulacijskim i vezivnim tkivom, ili ostavljaju prazna mjesta u matriksu (*engl*. „cell drop out“).

Imunofenotip: Ne postoje imunohistokemijski pokazatelji koji bi govorili u prilog osteosarkoma, stoga se imunohistokemijske metode primjenjuju uglavnom radi isključenja drugih tumora koji mogu imati sličan mikroskopski izgled i određeni imunofenotip. Ipak, osteosarkom može biti pozitivan na citokeratin ili SMA (od *engl.* smooth muscle actin) kao i na CD99. Osteokalcin i osteonektin se mogu koristiti da se dokaže postojanje osteoida.

Genetika: Svi osteosarkomi pokazuju kromosomske aberacije koje su vrlo složene, ali nema strukturne anomalije kromosoma tumorskih stanica koja bi bila dijagnostički značajna. Kromosomska područja 1p11-13, 1q11-12, 1q21-22, 11p14-15, 14p11-13, 15p11-13, 17p i 19q13 su najčešće zahvaćena strukturnim promjenama, a najčešće nebalansiranosti su +1, -6q, -9, -10, -13 i -17 (pojava dodatnog odnosno gubitak dijela ili čitavog kromosoma).

Usporedna genomska hibridizacijska analiza pokazuje da su kromosomska područja koja najčešće pokazuju promjene broja DNA kopija: 3q26, 4q12-13, 5p13-14, 7q31-32, 8q21-24, 12q12-13, 12q14-15 i 17p11-12. U 50% slučajeva vidi se promjena 8q23 područja i povezuje se s lošijom prognozom. Povećani broj kopija gena MYC (porodica regulatornih i proto-onkogena koji kodiraju transkripcijske čimbenike) koji se nalazi na 8q24 području, dokazan je FISH metodom (Fluorescentna *in situ* hibridizacija) u 44% slučajeva. Promjena u broju DNA kopija područja 17p se rijetko nađe u ostalim tumima. Što se tiče gubitaka genetičkog materijala, uglavnom su pogođeni 2q, 6q, 8p i 10p. Pored navedenih promjena u količini, primijetan je i gubitak heterozigotnosti 3q, 13q, 17p, i 18q, posebno područja 3q26.6-26.3 što može ukazivati na supresorsku ulogu navedenog gena. U konvencionalnom osteosarkomu, najčešće amplifikacije su na 1q21-23 i na 17p. Može biti koamplificirana i regija 12q13-15. Amplifikacija gena PRIM1 (DNA primaza 1) je uočena kod 41% slučajeva osteosarkoma. U agresivnim osteosarkomima najčešće je amplificiran gen za CDK4 (*engl*. Cyclin Dependent Kinase 4), sa ili bez amplifikacije gena za MDM2 (*engl.* Mouse Double Minute 2 Homolog). Naime, MDM2 protein se veže za tumor supresorski protein p53 i inaktivira ga, stoga on ima ulogu u promociji maligne alteracije stanice, a pojačana ekspresija gena za ovaj protein se može naći u više vrsta malignih tumora. Amplifikacija i pojačana ekspresija CDK4 i MDM2 ovaj tumor razlikuju od parostealnog osteosarkoma. FISH pokazuje da su sekvence CCND2 (gen važan za sintezu ciklin 2 proteina), ETV6 (gen koji kodira istoimeni transkripcijski čimbenik, tzv. translokacijsku varijanatu 6) i KRS2 (gen za serin-treonin protein kinazu) na 12p te već spomenuti MDM2 na 12q različito amplificirani u osteosarkomu niskog i visokog stupnja malignosti. Naime, amplifikacije na 12p se uočavaju u oko petine osteosarkoma niskog stupnja malignosti, u odnosu na 9 od 19 osteosarkoma visokog stupnja malignosti. Pojačana ekspresija MET (mezenhimsko-epitalni tranzicijski čimbenik) i FOS (porodica protoonkogena) uočena je u oko 50% osteosarkoma, a MYC u 15%. Nadalje, MYC, FOS i katepsin L pokazuju pojačanu ekspresiju kod recidiva i metastaza. BMP 6 (koštano-morfogenetički protein 6) i receptor za BMP 2 su povišeni u više od 50% osteosarkoma, a porodica gena MAGE (*engl.* melanoma associated antigen) u nekoliko njih. Profiliranjem genske ekspresije nađena

je pojačana ekspresija HSP90b (*engl.* heat shock protein 90b) i PABPL1 (*engl.* poly(A)binding protein-like 1), dok FN1 (fibronektin 1) i THBS1 (trombospondin 1) uopće nisu eksprimirani. Što se tiče nasljednih poremećaja gena, bolesnici s nasljednim retinoblastomom imaju povišeni rizik i za razvoj osteosarkoma. Takvi tumori pokazuju gubitak heterozigotnosti za 13q Rb1 (retinoblastom 1) supresorski gen. Promjene u genu Rb1 u sporadičnim osteosarkomima su prisutne u 30-40% slučajeva i prognoza kod takvih bolesnika je lošija u odnosu na bolesnike koji nemaju promjene gena Rb1. Bolesnici s Li-Fraumeni sindromom imaju mutaciju p53 i povećan rizik za razvojem različitih tumora, uključujući i osteosarkom. Kod sporadičnih slučajeva gubitak heterozigotnosti za 17q se uočava u oko 35% tumora te je preživljenje lošije u odnosu na bolesnike koji nemaju mutaciju p53.

Prognoza: Prirodni tijek bolesti osteosarkoma visokog stupnja malignosti završava smrtnim ishodom unutar oko godinu dana. Tumor pokazuje lokalno agresivno i destruktivno ponašanje te ranu diseminaciju hematogenim putem, najčešće u pluća i druge kosti. Najvažniji čimbenik koji utječe na prognozu jest odgovor tumora na kemoterapiju, ali taj se čimbenik u procjeni prognoze preživljenja mora kombinirati s ostalim čimbenicima kao što su ostatni tumor nakon resekcije ili primarno sijelo (čeljust i zdjelica predstavljaju nepovoljne lokalizacije primarne bolesti). Tumor rano metastazira iako sve metastaze ne moraju biti vidljive radiološkom obradom pa se osteosarkom smatra sistemskom bolešću već u trenutku postavljanja dijagnoze. Mutidisciplinarni pristup povećao je petogodišnje preživljenje na 60-80% te omogućio da se učini resekcija tumora uz očuvanje funkcionalnog ekstremiteta kod više od 80% bolesnika. Ako je nekroza tumora prisutna u više od 90% tumorske mase, očekivano petogodišnje preživljenje je 80-90%, a ako je nekroza prisutna u manje od 90% tumorskog tkiva tada je petogodišnje preživljenje 15% uz nepromijenjenjeni kemoterapijski protokol. Taj postotak je veći ako se primijeni novi kemoterapijski protokol (18).

1.2.2 Sekundarni osteosarkomi

Pod nazivom sekundarni osteosarkomi, podrazumijevaju se maligni tumori kosti koji proizvode osteoid, a koji nastaju u već promijenjenoj kosti. Ovi tumori su također visokog stupnja malignosti i najčešće se javljaju u sklopu Pagetove bolesti ili nakon radioterapije.

Osteosarkom u Pagetovoj bolesti: Pagetova bolest je resorptivna bolest kostiju nepoznatog uzroka karakterizirana lokalno pojačanom pregradnjom kosti zbog čega nastaju područja resorpcije i reaktivne skleroze. Nešto češće se javlja kod muškaraca, obično nakon 45. godine života, bilo da zahvaća jednu kost ili više njih. Najčešće su zahvaćene kosti lubanje i kralježnice te duge cjevaste kosti. Nastaje postupna deformacija kosti, a u fazama pojačanog metabolizma i koža iznad zahvaćene kosti može biti toplija. Takva kost je biomehanički slabija, stoga mogu nastati patološki prijelomi, ali i zloćudna preobrazba u 0,7-0,95% slučajeva.
U 50-60% slučajeva zloćudne preobrazbe u Pagetovoj bolesti radi se o osteosarkomu visokog stupnja malignosti.

Epidemiologija: Osteosarkom u Pagetovoj bolesti češće pogađa muškarce s navedenom bolesti, u omjeru 2:1 i to obično nakon 65. godine života. Zloćudna preobrazba se javlja češće ako je bolešću zahvaćeno više kostiju. Ako analiziramo skupinu bolesnika koja boluje od osteosarkoma visokog stupnja malignosti, životne dobi iznad 40 godina, tada 20% njih ima Pagetovu bolest.

Predilekcijska mjesta: Bilo koja kost koja je pogođena Pagetovom bolesti može biti mjesto razvoja osteosarkoma. U slučaju Pagetove bolesti 2/3 osteosarkoma se javlja u dugim cjevastim kostima. Lubanja je zahvaćena u oko 10-17% slučajeva. Multicentričnost je česta u Pagetovoj bolesti, čak kod 17% bolesnika.

Klinička slika: Nema specifičnih znakova koji bi upućivali da se radi o zloćudnoj preobrazbi unutar kosti koja je zahvaćena Pagetovom bolesti, no svaka promjena u dotadašnjim manifestacijama bolesti zahtijeva oprez. Osim toga, vrijednosti alkalne fosfataze također mogu biti neuobičajeno visoke.

Radiološka obrada: Radiološke snimke se ni po čemu ne razikuju od snimki konvencionalnog osteosarkoma, osim po promjeni okolne, tumorom nezahvaćene kosti, koja ukazuje na Pagetovu bolest.

Slika 6. Osteosarkom u Pagetovoj bolesti. Plavi krug pokazuje područje malignog tumora. Okolna kost je promijenjena u smislu Pagetove bolesti *(preuzeto i prerađeno iz 19).*

Makroskopski izgled: Nema razlike u odnosu na makroskopski izgled konvencionalnog osteosarkoma, osim u izgledu okolne, Pagetovom bolešću zahvaćene kosti.

Mikroskopski izgled: Najčešće se radi o osteoblastičnom ili fibroblastičnom podtipu osteosarkoma, a nađeno je i nekoliko slučajeva teleangiektatskog osteosarkoma i osteosarkoma malih stanica.

Genetika: Nađeno je da je predispozicija za razvoj Pagetove bolesti povezana s genima na 18q, a upravo se gubitak heterozigotnosti često može naći na 18q.

Prognoza: Zahvaćenost lubanje i zdjelice je povezana s lošijom prognozom, iako je gledajući u cjelini, prognoza loša kad se radi o zloćudnoj preobrazbi u osteosarkom u sklopu Pagetove bolesti. Naime, očekivano petogodišnje preživljenje iznosi samo 11%, a još lošije kod multicentričnih oblika (18).

Postradijacijski osteosarkom: Označava osteosarkom visokog stupnja malignosti koji nastaje u kosti koja je prethodno bila uredna ili je imala neku promjenu benigne naravi, a koja je bila izložena radioterapiji zbog nekog drugog malignog tumora u tijelu.

Epidemiologija: Ova vrsta osteosarkoma čini oko 3,4-5,5% svih osteosarkoma, a ako se neka vrsta sarkoma razvije u ozračivanoj kosti, onda je to u 50-60% slučajeva osteosarkom visokog stupnja malignosti. Ovakva vrsta osteosarkoma je u porastu čak i u mlađoj populaciji, posebno ako se radi o bolesnicima koji su primali kombinaciju kemoterapije i radioterapije. Obzirom da se poboljšanjem protokola liječenja malignih tumora produžava i preživljenje bolesnika, za očekivati je porast pojavnosti različitih sekundarnih tumora, pa tako i osteosarkoma.

Predilekcijska mjesta: Bilo koja kost koja se nalazila u ozračivanom području može biti zahvaćena. Obzirom na lokalizaciju najčešćih malignih tumora u populaciji koji se liječe radioterapijom, nađeno je da se postradijacijski osteosarkom najčešće javlja u području ramena i zdjelice.

Klinička slika: Vrijeme proteklo do nastanka novog tumora, u ovom slučaju osteosarkoma je između 2 i 40 godina, medijan je oko 11 godina, s tim da je kod bolesnika koji su primali kemoterapiju i radioterapiju ovaj period kraći. Pojavnost ovisi o primljenoj dozi zračenja, a koja kod osteosarkoma prosječno iznosi oko 50Gy. Simptomi se ne razlikuju od simptoma konvencionalnog osteosarkoma.

Radiološka obrada: Radiološke snimke ne razlikuju postradijacijski osteosarkom od konvencionalnog, s tim da je moguće u zahvaćenoj kosti uočiti promjene koje odgovaraju postradijacijskom osteitisu te ih valja razlikovati od malignog procesa. Multicentričnost je opisana i u ovoj vrsti osteosarkoma, ali se javlja vrlo rijetko.

Makroskopski izgled: Odgovara konvencionalnom osteosarkomu.

Mikroskopski izgled: Najčešće odgovara osteosarkomu visokog stupnja malignosti. Vrlo rijetko se radi o osteosarkomima nižeg stupnja malignosti.

Genetika: Promjene u broju kopija DNA slične su kao u konvencionalnom osteosarkomu. Čest nalaz je gubitak 1p i 3p. Općenito, čest je gubitak genetičkog materijala u postradijacijskom osteosarkomu. Mutacija p53 nađena je u oko 58% uzoraka postradijacijskog osteosarkoma.

Prognoza: Kumulativno petogodišnje preživljenje bolesnika kod kojih je tumor nađen na ekstremitetima je oko 68%, a lošije, tek oko 27%, što je sijelo bliže središtu tijela primjerice kod zahvaćanja ramenog ili zdjeličnog obruča i kralježnice (18).

Osteosarkomi povezani s drugim bolestima ili stanjima: Rijetko, osteosarkom visokog stupnja malignosti se može javiti uz koštani infarkt, fibroznu displaziju i metalne implantate u kosti te do sada nije nađena nikakva specifičnost koja bi ih razlikovala od ostalih osteosarkoma.

1.2.3 Teleangiektatski osteosarkom

Osteogeni je tumor visokog stupnja malignosti izgrađen od različito velikih prostora ispunjenih krvlju, između kojih su pregrade (*lat.* septa) sastavljena od malignih tumorskih stanica koje proizvode osteoid pa se naziva i hemoragičnim osterosarkomom.

Epidemiologija: Teleangiektatski osteosarkom čini 4% svih osteosarkoma, najčešće se javlja u drugom desetljeću života i nešto češće kod muških osoba u omjeru 1,5:1.

Etiologija: Nije poznata, nekoliko slučajeva je opisano uz Pagetovu bolest i retinoblastom.

Predilekcijska mjesta: Kao i konvencionalni osteosarkom, ovaj tumor polazi iz medule, najčešće dugih kostiju i to distalnog okrajka bedrene kosti i proksimalnog okrajka goljenične kosti. Ostale primarne lokalizacije su rijetke, a opisana je i multicentričnost.

Klinička slika: Slična je kao kod konvencionalnog osteosarkoma, no obzirom da je tumor uglavnom građen od prostora ispunjenih krvavim sadržajem i vrlo malo mineralne komponente, patološki prijelom kosti jedan je od vodećih, iako nespecifičnih znakova.

Radiološka obrada: Rendgenska snimka pokazuje destruktivnu litičku leziju bez okolne skleroze kosti sa širenjem mase najčešće iz metafize prema epifizi i mekim tkivima (slika 7a). Tumor stanjuje i probija kortikalis te izaziva reakciju periosta koja upućuje na agresivan, brzorastući proces. MR obrada prikazuje prostore ispunjene tekućim sadržajem (slika 7b).

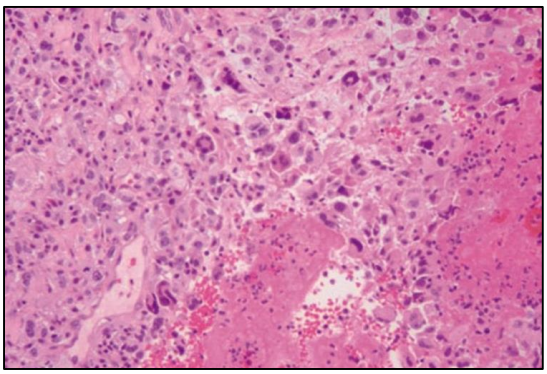
Slika 7a. Rendgenska snimka teleangiektatskog osteosarkoma prikazuje litičku leziju distalnog okrajka bedrene kosti *(preuzeto i prerađeno iz 20).*

Slika 7b. Magnetska rezonancija teleangiektatskog osteosarkoma prikazuje prostore ispunjene tekućim sadržajem *(preuzeto i prerađeno iz 20).*

Makroskopski izgled: Tumor je građen od cističnih prostora različite veličine koji su nepotpuno ispunjeni krvavim sadržajem ili krvnim ugruščima s malo solidnog dijela, a koji se iz medule širi u meka tkiva (slika 8). Ovakva građa tumora se može zamijeniti s aneurizmatskom koštanom cistom koja spada u skupinu tvorbi sličnih tumorima, a koja je po naravi beninga iako lokalno agresivna (11). Tumor se opisuje kao „vreća ispunjena krvlju“ te uzrokuje vrlo neugodna krvarenja za vrijeme operativnog uklanjanja.

Slika 8. Makroskopski preparat distalnog okrajka bedrene kosti zahvaćenog teleangiektatskim osteosarkomom *(preuzeto i prerađeno iz 21).*

Mikroskopski izgled: Cistični prostori su okruženi septama koje sadržavaju maligne stanice koje proizvode različite količine osteoida, ali koji je ukupno gledajući oskudan. Uz to su prisutne benigne multinuklearne orijaške (*engl.* giant) stanice, ali nema epitela koji bi okruživao cistične prostore, dakle ne radi se o pravim cistama (slika 9).



Slika 9. Histološka slika teleangiektatskog osteosarkoma *(preuzeto i prerađeno iz 21).*

Genetika: Vrlo je malo teleangiektatskih sarkoma na kojima su izvršene genetičke analize. Za sad je na malom broju uzoraka nađen gubitak heterozigotnosti za gen p53. Mutacije CDKN2A (*engl.* cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) i Rb1 lokusa te amplifikacije MDM2 i MYC su rijetke u teleangiektatskom osteosarkomu.

Prognoza: Teleangiektatski osteosarkom osjetljiv je na kemoterapiju i prognoza mu je slična kao kod konvencionalnog osteosarkoma (18).

1.2.4 Osteosarkom malih stanica

Spada u skupinu osteosarkoma visokog stupnja malignosti koji rastu iz medule, a naziv je dobio po svom histološkom izgledu.

Epidemiologija: Ovaj tumor čini oko 1,5% svih osteosarkoma te se najčešće javlja u drugom desetljeću života. Nešto češće se javlja kod ženskih osoba s omjerom 1,1:1.

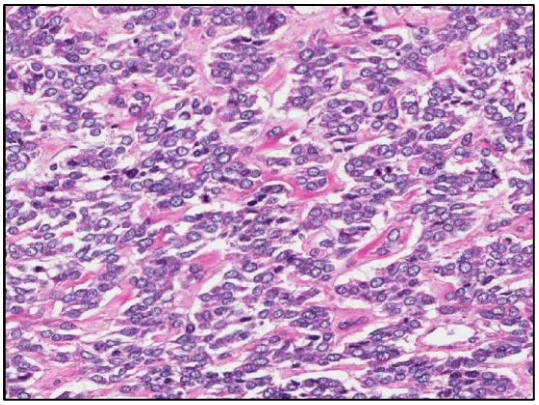
Predilekcijska mjesta: Polovica tumora se može naći u dugim kostima, najčešće u metafizama.

Klinička slika: Osteosarkom malih stanica se po kliničkoj slici ne razlikuje od konvencionalnog osteosarkoma.

Radiološka obrada: Na rendgenskim snimkama uočava se lokalno agresivna, destruktivna osteolitična lezija koja je mjestimično mineralizirana i koja se stanjuje i probija korteks, i dalje kao mekotkivna masa raste prema okolnim mekim tkivima. Nije ga moguće na temelju radioloških snimki sa sigurnošću razlikovati od konvencionalnog osteosarkoma.

Makroskopski izgled: Tumor se makroskopski ne razlikuje od konvencionalnog osteosarkoma.

Mikroskopski izgled: Tumor je histološki građen od malih okruglih ili vretenastih malignih stanica različite veličine, koje tumoru daju relativno uniformnu sliku i između kojih se uočava osteoidni matriks (slika 10). Obzirom na histološki izgled, tumor može nalikovati Ewingovom sarkomu ili nekom od limfoma.



Slika 10. Histološka slika osteosarkoma malih stanica *(preuzeto i prerađeno iz 21).*

Imunofenotip: Tumorske stanice mogu biti pozitivne na CD99, osteokalcin, vimentin, osteonektin, SMA i KP1.

Genetika: Obzirom na histološki izgled, tumor je važno prije svega razlučiti od Ewingovog sakoma, prema 11:22 translokaciji koja se često nalazi u Ewingovom sarkomu, ali ne i u osteosarkomu malih stanica.

Prognoza: Ovaj tumor ima nešto lošiju prognozu od konvencionalnog osteosarkoma (18).

1.2.5 Površinski osteosarkom visokog stupnja malignosti

Jedina je vrsta osteosarkoma visokog stupnja malignosti koji spada u skupinu osteosarkoma koji polaze s površine kosti i biološki se ponaša kao konvencionalni osteosarkom. Ostale dvije vrste osteosarkoma koje polaze s površine kosti - parostealni i periostealni osteosarkom koji su nižeg stupnja malignosti, mogu se dediferencirati i postati visokomaligni te se ponašati kao konvencionalni osteosarkom.

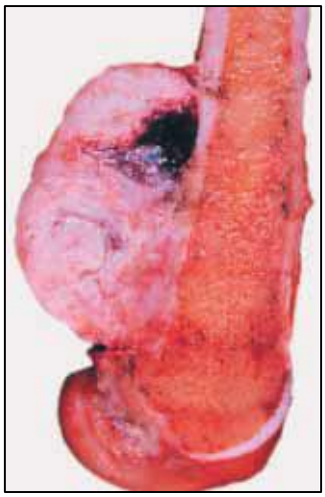
Epidemiologija: Ova vrsta tumora se najčešće javlja u drugom desetljeću života, nešto češće kod muških osoba. Predilekcijska mjesta su bedrena, nadlaktična i goljenična kost.

Klinička slika: Tumor se očituje kao masa koja vrši pritisak na okolna meka tkiva i kao takva uzrokuje bol.

Radiološka obrada: Na klasičnoj rendgenskoj slici tumor se vidi kao dijelom mineralizirana masa koja raste iz površine kosti prema mekim tkivima i prema unutrašnjosti kosti te stanjuje kortikalis (slika 11). Rubno se može uočiti periostalna reakcija.

Slika 11. Rendgen distalnog okrajka bedrene kosti s površinskim osteosarkomom visokog stupnja malignosti *(preuzeto i prerađeno iz 22).*

Makroskopski izgled: Radi se lobuliranoj masi koja uglavnom zauzima veći dio cirkumferencije zahvaćene kosti (slika 12). Izgled mu ovisi o prevladavajućoj komponenti (osteoblastičnoj, hondroblastičnoj, fibroblastičnoj), no konzistencija mu je mekša u odnosu na ostale površinske tumore kostiju.



Slika 12. Makroskopski preparat distalnog okrajka bedrene kosti s površinskim osteosarkomom visokog stupnja malignosti *(preuzeto i prerađeno iz 23).*

Mikroskopski izgled: Histološki tumor je identične građe kao konvencionalni osteosarkom stoga je u postavljanju dijagnoze važna kliničko-radiološko-patološka korelacija.

Imunofenotip: Kao kod konvencionalnog osteosarkoma.

Prognoza: Kao kod konvencionalnog osteosarkoma (18).

1.2.6 Ekstraosealni osteosarkom

Osteosarkom visokog stupnja malignosti primarno može nastati izvan kosti, u mekim tkivima. Pokazuje sve značajke osteosarkoma uključujući i hondroblastičnu i fibroblastičnu diferencijaciju.

Epidemiologija: Radi se o rijetkom tumoru na kojega otpada oko 1% svih mekotkivnih sarkoma te oko 2-4% svih osteosarkoma. Najčešće se javlja kod osoba između 50 i 70 godina života, nešto češće kod muškaraca, s omjerom 1,9:1.

Etiologija: Većina ekstraosealnih osteosarkoma nastaje *de novo,* a za oko 10% njih se može naći poveznica sa zračenjem ili traumom.

Predilekcijska mjesta: Ekstraosealni osteosarkom u 90% slučajeva raste iz dubokih mekih tkiva i vrlo rijetko iz potkožja ili kože. Najčešće se radi o dubokom mekom tkivu natkoljenice (50% slučajeva) zatim glutealne, ramene i retroperitonealne regije.

Klinička slika: Nije specifična i povezana je s primarnim sijelom tumora. U svakom slučaju radi se o masi koja se povećava, a koja sekundarno može zahvatiti kost.

Radiološka obrada: Pokazuje tumorsku masu nejasnih rubova, sa središtem uočljive varijabilne mineralizacije (slika 13).

Slika 13. Rendgen ekstraosealnog osteosarkoma. Vidljiva je mineralizirana masa neoštrih granica u području unutrašnjeg dijela natkoljenice *(preuzeto i prerađeno iz 24).*

Makroskopski izgled: Tumorska masa je okruglasta, nehomogena, s mjestimičnim područjima osifikacije ili nezrele hrskavice koja su uglavnom u središnjem dijelu tumora, te varijabilnom količinom i rasporedom cističnih, nekrotičnih i hemoragičnih područja (slika 14).

Slika 14. Makroskopski preparat osteosarkoma unutar mekog tkiva *(preuzeto i prerađeno iz 25).*

Mikroskopski izgled: Sastavnice su slične kao u konvenvionalnom osteosarkomu. Celularnost je izraženija prema periferiji tumora što ga razlikuje od tzv. miozitis osifikansa, slične, ali benigne promjene koja najčešće nastaje uslijed traume.

Imunofenotip: Sličan je osteosarkomu. Stanice su pozitivne na vimentin i CD 99, a mogu biti pozitivne na SMA, dezmin, S100, EMA (*engl.* epithelial membrane antigen). Osteokalcin je izražen u matriksu.

Genetika: Do sada nema dokaza da bi se ekstraosealni osteosarkom po genskom profilu razlikovao od osteosarkoma koštanog porijekla.

Prognoza: Mortalitet je oko 75% unutar pet godina (26).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je prikazati pregled dosadašnjih spoznaja o mogućnostima i izazovima liječenja primarnog osteosarkoma visokog stupnja malignosti korištenjem genske terapije putem rekombinantnih virusa.

Hipoteze istraživanja su:

1. Genska terapija rekombinantnim virusima predstavlja potencijal za liječenje primarnog osteosarkoma visokog stupnja malignosti.
2. Mehanizam djelovanja virusa razlikuje se od mehanizma djelovanja protutumorskih lijekova na tumorske stanice pa se učinak protutumorskih lijekova može povećati u kombinaciji s viroterapijom.
3. Razvojem viroterapije mogao bi se poboljšati ishod liječenja osteosarkoma.

3. MATERIJALI I METODE

- SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

3.1 LIJEČENJE OSTEOSARKOMA VISOKOG STUPNJA MALIGNOSTI - DOSADAŠNJE SPOZNAJE, PROTOKOLI I PROBLEMI

Tumorske stanice osteosarkoma rano metastaziraju što je jedna od odrednica koja ovaj tumor svrstava u visoki gradus i razlog zbog čega se osteosarkom pri otkrivanju smatra sistemskom bolešću, bez obzira na postojanje radiološki detektabilnih metastaza. Metastaziranje malignih stanica označava njihov ulazak u limfnu ili krvnu cirkulaciju i naseljavanje na bliže ili udaljenije mjesto od početnog sijela gdje nastavljaju rasti. Dakle ulazak (invazija) u cirkulaciju je početna faza koja ne znači da će se maligne stanice doista i proširiti na druge organske sustave. One, naime, u cirkulaciji mogu biti uništene od strane imunosnog sustava ili, ako dospiju do udaljenog organa, ne znači da će preživjeti u novom okolišu, i to je upravo ono što se u najvećem broju slučajeva i događa. Jedan manji dio malignih stanica preživljava širenje cirkulacijom i nastavlja rasti na novoj lokaciji za što moraju biti ispunjeni brojni preduvjeti koji se sastoje od složenih međuodnosa tumorskih i zdravih stanica posredovanih molekularnim procesima. Molekularni putevi koji podržavaju metastaziranje i rast osteosarkoma predmet su istraživanja, s ciljem da bi se na njih farmakološki djelovalo. Okvirno, jedna od milijun tumorskih stanica ima metastatski potencijal, a tisuće ih se otpušta u cirkulaciju svaki dan. Za ilustraciju, metastaze su radiološki vidljive tek kad tumorska masa sadrži oko 10^7 tumorskih stanica, tumor se može napipati ako sadrži oko 10^9 tumorskih stanica (što ovisi i o lokalizaciji tumora), a ukupna tumorska masa u organizmu koja se povezuje sa smrtnim ishodom je oko 10^{12} stanica, što naravno nije jedina i nužna odrednica.

Osteosarkom najčešće metastazira u pluća i druge kosti. Budući da su tumorske stanice osteosarkoma sklone metastaziranju, ali su i osjetljive na protutumorske lijekove, nije neobično da su rezultati preživljenja bolesnika s osteosarkomom bili loši prije uvođenja protutumorskih lijekova krajem 70-tih godina prošlog stoljeća. Tada je postotak preživljenja od 20% bolesnika koji su bili samo operativno liječeni u smislu uklanjanja tumorske mase porastao na 60%. Rezultati su se u narednom desetljeću poboljšali uvođenjem kombinacija boljih protutumorskih lijekova uz operativni zahvat, no od tada stagniraju, te se može reći da je

prosječno petogodišnje preživljenje bolesnika s osteosarkomom oko 70%, ali ono ovisi o dobi bolesnika, lokalizaciji tumora, veličini tumorske mase, odgovoru na kemoterapiju, histološkim komponentama tumora i ekspresiji gena koji se povezuju s lošijim ishodom. Ovo potonje je još uvijek predmet istraživanja. Osim toga, poznato je da tumorske stanice mogu u bilo kojem periodu promijeniti svoj morfološki, molekularni i genski profil, stoga se tumor može sastojati od različitih komponenti, ili se od bolje diferenciranog može dediferencirati (27).

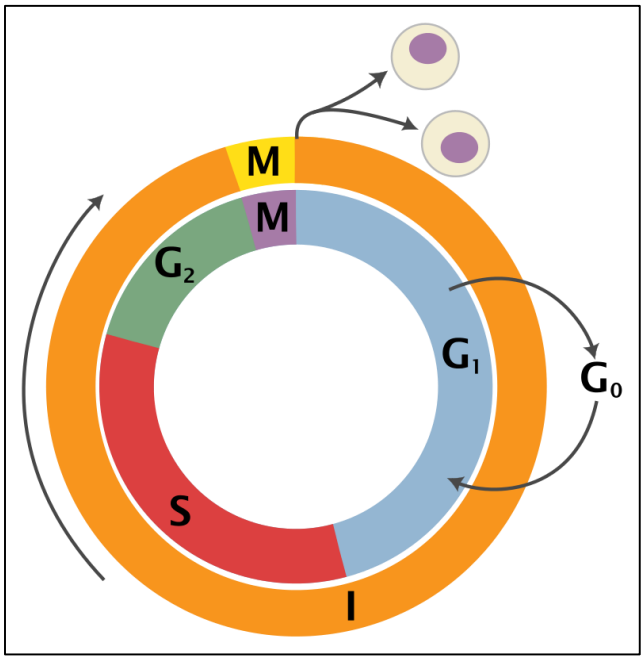
Razmatranje novih modaliteta liječenja osteosarkoma polazi od razumijevanja same bolesti i sadašnjih modaliteta liječenja koje ne treba odbaciti, nego nadopuniti i poboljšati.

3.1.1 Osnovna načela primjene i djelovanja protutumorskih lijekova kod bolesnika s osteosarkomom

Obzirom na visok metastatski potencijal osteosarkoma, a time i velike šanse za ranu pojavnost mikrometastaza, učinkovitost liječenja se povećava primjenom protutumorskih lijekova. Protutumorski lijekovi spadaju u skupinu kemoterapeutika te se takav način liječenja naziva kemoterapijom. Općenito, kemoterapija se provodi kroz tri načina. Prvi je tzv. primarno indukcijsko liječenje kada nema drugog učinkovitog terapijskog načina osim primjene protutumorskih lijekova. Drugi je neoadjuvantna kemoterapija koja se primijenjuje kada je samo lokalno liječenje poput operativnog zahvata ili zračenja neučinkovito (primjerice kod tumora s visokim metastatskim potencijalom). Treće je adjuvantna ili pomoćna kemoterapija koja se primjenjuje nakon obavljenog lokalnog liječenja operativnim zahvatom ili zračenjem. Primarna indukcijska kemoterapija kod bolesnika s osteosarkomom se primjenjuje samo u slučaju uznapredovale bolesti za koju nema drugog načina liječenja, što je obično slučaj kod tzv. inoperabilnih tumora koji bilo svojom masom, lokalizacijom ili opće lošim statusom bolesnika priječe operativni zahvat, jer bi u suprotnom postojao veliki rizik ranog nepovoljnog ishoda. Ovaj oblik kemoterapije ima za cilj ublažiti simptome tumorske bolesti i usporiti njezino napredovanje, te omogućava bolje preživljenje u odnosu na suportivnu njegu. Za razliku od nekih drugih tumora (primjerice akutne limfoblastične leukemije ili limfoma) kod kojih je ovaj

oblik liječenja ujedno i kurativan, u slučaju osteosarkoma vrlo je mala mogućnost da sama kemoterapija dovede do izlječenja bolesnika.

Kod većine bolesnika s osteosarkomom najprije se započinje s neoadjuvantnom kemoterapijom jer se bolest *a priori* smatra sistemskom, a nakon operativnog uklanjanja tumora nastavlja se s adjuvantnom kemoterapijom da bi se djelovalo na eventualno zaostale i radiološki „nevidljive“ tumorske stanice. Time se smanjuje mogućnost ponovnog lokalnog i sistemskog pojavljivanja bolesti, te se poboljšava ukupno preživljenje bolesnika što se izražava kroz tzv. preživljenje bez bolesti (engl. *disease-free survival*) i ukupno preživljenje (engl. *overall survival*). Protokol može omogućiti izlječenje ako se uz kirurško uklanjanje tumora primijene protutumorski lijekovi u odgovarajućim kombinacijama dozama i dosljednim intervalima, uzimajući u obzir odgovor tumora na neoadjuvantnu kemoterapiju. Naime, pojedinačni lijekovi u liječenju osteosarkoma su neučinkoviti i uspjeh u liječenju protutumorskim lijekovima zabilježen je tek kada su se oni počeli primjenjivati u kombinacijama, jer se tako djeluje na maligne stanice u različitim fazama staničnog ciklusa i različitim mehanizmima (slika 15 i tablica 2).



Slika 15. Stanični ciklus *(preuzeto i prerađeno iz 28).*

Tablica 2. Pojašnjenje faza staničnog ciklusa *(preuzeto i obrađeno iz 28).*

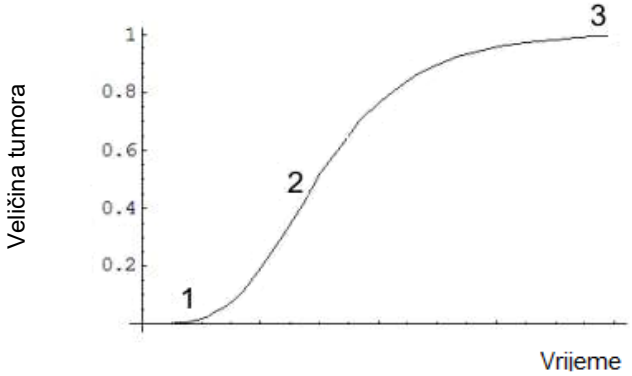
STANJE	FAZA	SKRAĆENICA	OPIS
Mirovanje	Gap 0	**G_0**	Faza u kojoj je stanica napustila stanični ciklus i prestala se dijeliti.
Interfaza	Gap 1	**G_1**	Povećavanje stanica. Kontrolni mehanizam u G1 fazi osigurava da je sve spremno za sintezu DNA
	Sinteza	**S**	Replikacija DNA
	Gap 2	**G_2**	Stanica nastavlja rasti. Kontrolni mehanizam u G2 fazi osigurava da je sve spremno za ulazak u fazu M i dijeljenje.
Dioba stanice	Mitoza	**M**	Rast stanice se zaustavlja u ovoj fazi i stanična energija je usmjerena na podjelu na dvije stanice kćeri.

Neki protutumorski lijekovi mogu djelovati u samo određenim fazama staničnog ciklusa zloćudne stanice i kao takvi se ubrajaju u skupinu lijekova specifičnih za fazu staničnog ciklusa. Drugi pak djeluju na tumorske stanice u bilo kojoj fazi staničnog ciklusa, pa se govori o lijekovima bez specifičnosti za faze staničnog ciklusa.

Kombiniranje protutumorskih lijekova omogućuje maksimalno uništenje zloćudnih stanica uz podnošljivu toksičnost svakog pojedinačnog lijeka u odgovarajućoj dozi. Ono omogućuje više raznih međudjelovanja lijeka i tumorskih stanica te sprječava ili bar usporava razvoj otpornosti tumorskih stanica na protutumorske lijekove.

Također se naglašava važnost ispravnog doziranja lijekova i davanja u dosljednim intervalima, obzirom da je pokazano da smanjenje doze i produžavanje intervala između ciklusa negativno utječu na uspjeh liječenja.

Vrijeme kada se započne s primjenom protutumorskih lijekova također utječe na uspjeh liječenja. Poznato je da ranije otkrivanje tumora povećava mogućnost izlječenja. Naime, eksperimentalni podaci za solidne tumore u koje spada i osteosarkom podupiru tzv. Gompertzov model tumorskog rasta i regresije (slika 16). Prema tom modelu, rastuća frakcija tumora nije stalna nego eksponencijalno pada tijekom vremena. Dakle, uočava se usporavanje rasta, a ne eksponencijalni rast tumora, vjerojatno zbog ograničenja resursa koje tumor eksploatira da bi rastao, primjerice krvne opskrbe. Obično liječenje bolesnika započne kada je tumorska masa veća, ali tada je i frakcija rasta manja, stoga protutumorski lijek djeluje na manju frakciju stanica. Dolazi se do zaključka da je terapijski odgovor tumora osjetljivog na protutumorske lijekove ovisan o njegovom položaju na krivulji rasta u trenutku otkrivanja bolesti i započinjanja liječenja. Time se može objasniti i bolji učinak protutumorskih lijekova ako se operativnim uklanjanjem smanji ukupna tumorska masa.



Slika 16. Gompertzov model tumorskog rasta i regresije. U početku tumor raste eksponencijalno (1) dok ne prijeđe točku infleksije na (2) nakon čega njegov rast usporava. Kako tumor raste, nedostaje mu kisika i hranjivih tvari te postaje nekrotičan. Kad je brzina rasta jednaka stopi nekroze, veličina tumora ostaje konstantna (3) *(preuzeto i prerađeno iz 29).*

Kad je riječ o uspjehu liječenja osteosarkoma protutumorskim lijekovima važno je istaknuti mogućnost razvoja otpornosti tumorskih stanica na protutumorske lijekove. Osteosarkom obično nije primarno otporan na protutumorske lijekove tj. pri prvom izlaganju tumora lijekovima opaža se njihov učinak. Ali osteosarkom može pokazati stečenu otpornost kao odgovor na izlaganje lijekovima. Može se raditi o otpornosti na jedan lijek kao posljedici

specifičinih promjena u tumorskim stanicama, ili na više lijekova zbog pojačane ekspresije gena koji kodiraju transportne proteine na površini stanice zbog čega se lijek pojačano izbacuje iz stanice i smanjuje se njegova unutarstanična koncentracija.

Osim što djeluju na tumorske stanice, protutumorski lijekovi djeluju i na zdrave stanice, posebno na one koje se intenzivno dijele (npr. stanice probavnog i reproduktivnog sustava, koštane srži, kože) što dovodi do nuspojava. Najčešće nuspojave kod primjene protutumorskih lijekova su: neuropatija, ototoksičnost, kardiotoksičnost, nefrotoksičnost, hepatotoksičnost, alopecija, imunosupresija, febrilna neutropenija sa ili bez infekcije, supresija koštane srži, stomatitis, mučnina i proljev.

3.1.2 Protutumorski lijekovi koji se primjenjuju za liječenje osteosarkoma

Ifosfamid spada u skupinu alkilirajućih lijekova te toksični učinak na stanicu ostvaruje prijenosom alkilne skupine na različite stanične dijelove, pri čemu je alkiliranje DNA vjerojatno najvažniji uzrok stanične smrti. Alkiliranje se ostvaruje kroz proces unutarmolekularne ciklizacije i stvaranja etilamonijevih iona. Alkilacija pogađa jedan ili oba lanca DNA te dolazi do ukriženog povezivanja, što je i najvažniji učinak svih lijekova koji spadaju u skupinu alkilirajućih lijekova, pri čemu su najosjetljivije stanice koje se dijele. Alkiliranje gvanina može rezultirati pogrješnim sparivanjem s timinom ili depurinacijom zbog izrezivanja gvaninskih ostataka, a to uzrokuje lom DNA lanca cijepanjem veze između šećera i baze. Osim toga, ifosfamid može reagirati sa sulfidrilnim, amino, hidroksilnim, karboksilnim i fosfatnim skupinama dugih struktura u staničnoj jezgri. Iako nije specifičan za stanični ciklus, ifosfamid najjače djeluje na kasnu G1 i S fazu staničnog ciklusa. Tumorske stanice mogu biti otporne na ovaj lijek kao i na ostale lijekove iz skupine alkilirajućih lijekova tako što razviju pojačanu sposobnost popravka DNA, smanje transport lijeka u stanicu i povećaju razinu glutationa i ostalih proteina potrebnih za konjugaciju alkilirajućih tvari, odnosno povećaju aktivnost glutation-S-transferaze koja katalizira konjugaciju.

Cisplatina spada u skupinu analoga platine (cis-diaminodiklorplatina (II)). Radi se o anorganskom metalnom kompleksu čiji mehanizam djelovanja nije sasvim razjašnjen, no smatra se da je sličan alkilirajućim lijekovima. Djeluje na tumorske stanice u svim stadijima staničnog ciklusa i stvara ukrižene veze unutar i između lanaca DNA i tako inhibira njezinu sintezu i funkciju. Osim toga, veže se za citoplazmatske i jezgrine proteine što dodatno pridonosi citotoksičnom učinku. Može pokazivati sinergiju s drugim lijekovima pa tako i alkilirajućim.

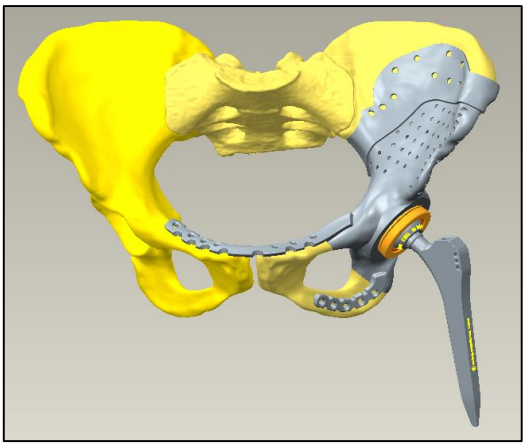
Metotreksat je analog folne kiseline koji se veže na aktivno katalitičko mjesto dihidrofolat reduktaze i tako ometa sintezu tetrahidrofolata. Tetrahidrofolat je inače nosač ugljika za *de novo* sintezu timidilata, purinskih nukleotida, serina i metionina. Dakle, metotreksat ometa različite metaboličke procese ključne za sintezu DNA, RNA i proteina. Unutarstanično stvaranje glutamatnih ostataka najvažnije je za terapijski učinak metotreksata, a taj proces katalizira folilpoliglutamat-sintaza. Takvi metotreksat poliglutamati se zadržavaju unutar tumorske stanice i inhibiraju enzime za *de novo* sintezu purina i timidilata. Moguća je otpornost i na ovaj lijek uslijed smanjenog transporta lijeka zbog smanjenog broja nosača folata ili folatnih receptora, zatim smanjenog stvaranja citotoksičnih poliglutamata, povećanja razine ciljnog enzima dihidrofolat reduktaze zbog amplifikacije njegovog gena, te zbog promjene dihidrofolat reduktaze koja rezultira smanjenim afinitetom za metotreksat.

Etopozid je pulusintetski derivat podofilotoksina koji spada u skupinu epipodofilotoksina i koji se dobiva iz korijena bunovine (*Podophyllum peltatum*). Inhibira topoizomerazu II što uzrokuje prekid lanca DNA i stvaranje kompleksa lijek-DNA-enzim.

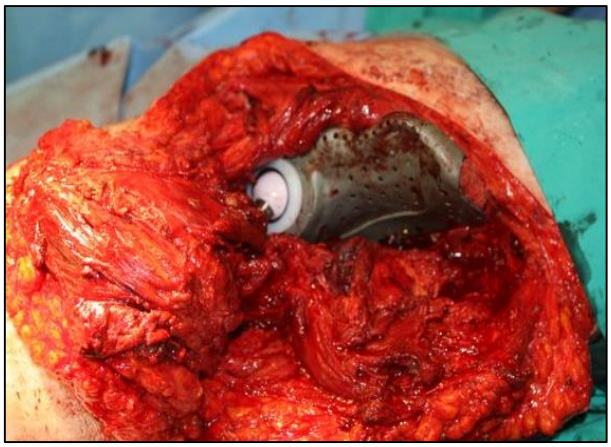
Doksorubicin spada u skupinu protutumorskih antibiotika i to antraciklina, koji su izolirani iz *Streptomyces peucetius var caesius*. Citotoksični učinak ostvaruje inhibicijom topoizomeraze II, specifičnim umetanjem između parova baza što dovodi do blokiranja sinteze DNA i RNA, zatim stvaranjem slobodnih radikala i vezanjem na staničnu membranu s posljedičnim poremećajem transporta iona i tekućine. Izaziva crveno obojenje urina (30).

3.1.3 Operativno liječenje osteosarkoma

Operativno uklanjanje tumora sastavni je dio protokola za liječenje osteosarkoma i poduzima se u svim slučajevima kada lokalizacija i opće stanje bolesnika dozvoljavaju da se zahvat učini u okvirima prihvatljivih rizika. Uklanjanje tumora u specijaliziranim centrima obavlja visokoeducirani ortopedski tim obzirom da su navedeni zahvati iznimno složeni, a pored uklanjanja tumora često uključuju i rekonstrukcijski zahvat. Glavno načelo u pristupu liječenja osteosarkoma jest spašavanje života, a ako je moguće onda i ekstremiteta. Napretkom rekonstrukcijskih mogućnosti, sve više se polaže važnost na očuvanje funkcionalnog ekstremiteta kad god je to moguće. Osnovni princip uklanjanja tumora (resekcije) jest uklanjanje tumorske mase „do u zdravo tkivo“ što znači da se tumor uklanja zajedno s dijelom okolnog zdravog tkiva i kao takav, tumor se ne izlaže da bi se umanjio rasap zloćudnih stanica za vrijeme manipulacije. Stoga, kad je riječ o osteosarkomu moguće opcije su uklanjanje tumora zajedno s čitavom anatomskom ložom u kojoj se on nalazi (resekcija u bloku) ili uklanjanje čitavog ili dijela zahvaćenog ekstremiteta (radikalno uklanjanje tumora, bilo amputacijom - kroz kost ili egzartikulacijom - kroz zglob). Neke lokalizacije su zahtjevnije i povezane s povećanim operativnim rizikom, ali i skučenim mogućnostima resekcije u bloku kao što je primjerice kralježak. Međutim većina osteosarkoma se javlja u kostima ekstremiteta i zdjelice što ipak najčešće ostavlja dovoljno prostora za kvalitetno operativno uklanjanje i rekonstrukciju. Sama rekonstrukcija ima za cilj očuvati funkcionalan ekstremitet, što je pak važno i s psihološkog gledišta, posebno mlađih bolesnika. Stoga se svaki napor ulaže u očuvanje ekstremiteta. Napredak medicinske tehnologije odražava se na rekonstrukcijske mogućnosti u kirurgiji tumora sustava za kretanje i iskorak prema tzv. personaliziranoj medicini, kada se u konkretnim slučajevima nastoji izraditi implantat za svakog bolesnika ponaosob, oslanjajući se na planiranje i 3D printanje implantata (slika 16a i 16b).



Slika 16a. Primjer 3D rekonstrukcijskog implantata zdjelice. (Ljubaznošću prof.dr.sc.Roberta Kolundžića, Klinika za traumatologiju KBC Sestre milosrdnice).



Slika 16b. Fotografija 3D implantata zdjelice ugrađenog nakon resekcije tumora. (Ljubaznošću prof.dr.sc.Roberta Kolundžića, Klinika za traumatologiju KBC Sestre milosrdnice).

Slike 16a i 16b su zaštićene autorskim pravima te se ne smiju koristiti bez dopuštenja autora.

Unatoč napretku rekonstrukcijskih mogućnosti, poznato je da su takvi zahvati podložni povećanom riziku od neuspjeha i komplikacija u smislu infekcije i mehaničkih problema s implantatima. Poseban izazov su rekonstrukcijski zahvati kod djece koja rastu te kroz neko vrijeme postane uočljiva razlika u dužini ekstremiteta što je s biomehaničkog stajališta nepovoljno kad je riječ o donjim ekstremitetima. Nije stoga neuobičajeno da se bolesnici, posebno mlađi, kojima je učinjen rekonstrukcijski zahvat i koji su izliječeni od primarne bolesti, često u budućnosti moraju podvrgavati ponovnim operativnim zahvatima. Obzirom na napredak protetičke opskrbe i kvalitetno učinjena amputacija odnosno egzartikulacija ima vrlo važan doprinos u liječenju bolesnika s osteosarkomom, a izvodi se kada nije moguće očuvati funkcionalan ekstremitet. To može biti učinjeno već u primarnom operativnom liječenju, ili zbog komplikacija koje se razviju nakon rekonstrukcijskog zahvata, a koje značajno narušavaju zdravlje i kvalitetu života bolesnika (11).

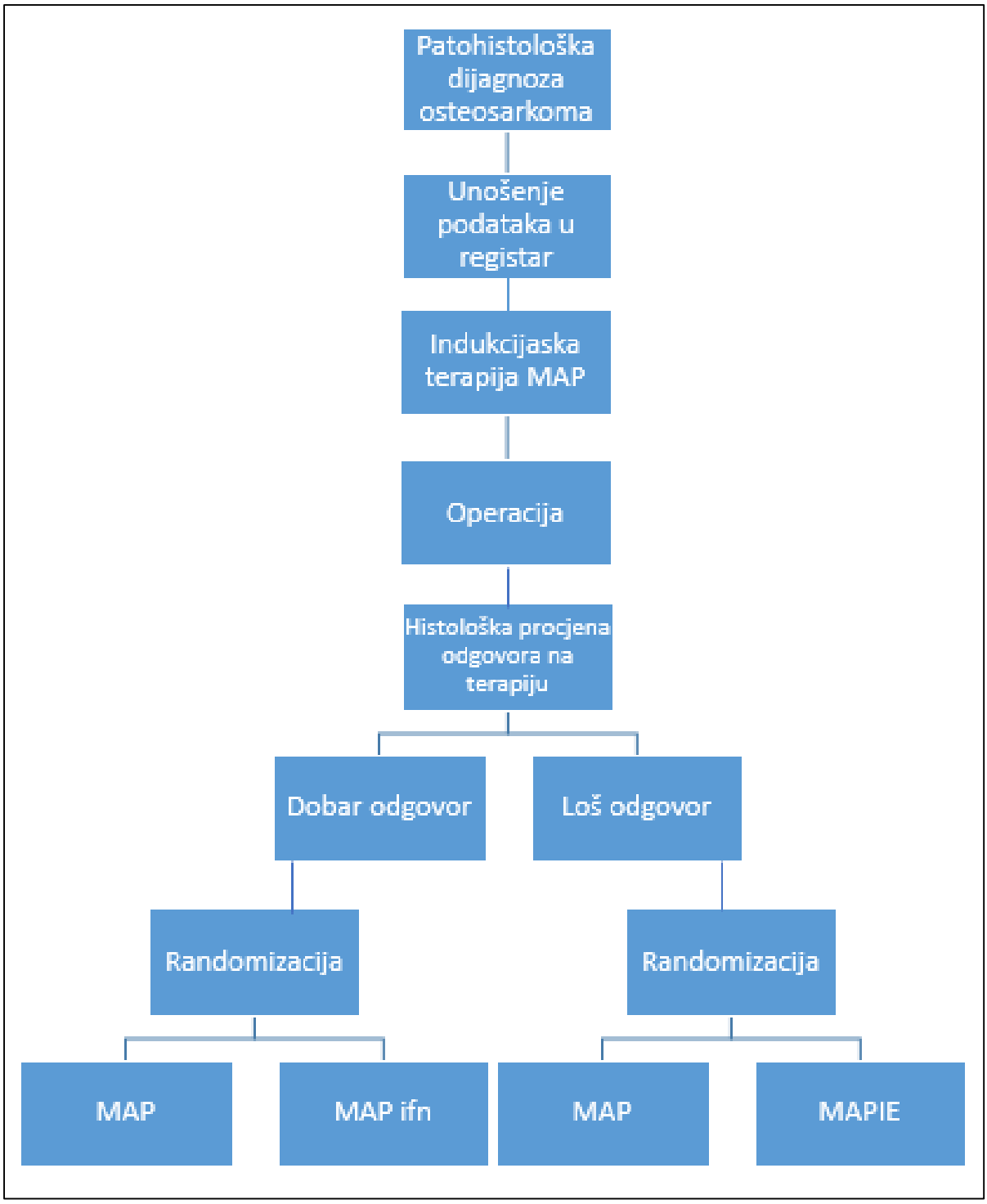
Metastaze se mogu razlikovati od primarnog tumora i pokazivati otpornost na kemo i radioterapiju. Tada teoretski preostaje samo operativno liječenje, što može predstavljati veliki problem posebno ako postoji više metastaza i ako one svojim položajem i veličinom uzrokuju

poremećaj funkcioniranja zahvaćenog organa i čitavog organizma. Plućne metastaze najčešći su razlog nepovoljnog ishoda kod osoba oboljelih od osteosarkoma.

Slika 17. Makroskopski preparat pluća s metastazama osteosarkoma *(preuzeto i prerađeno iz 31).*

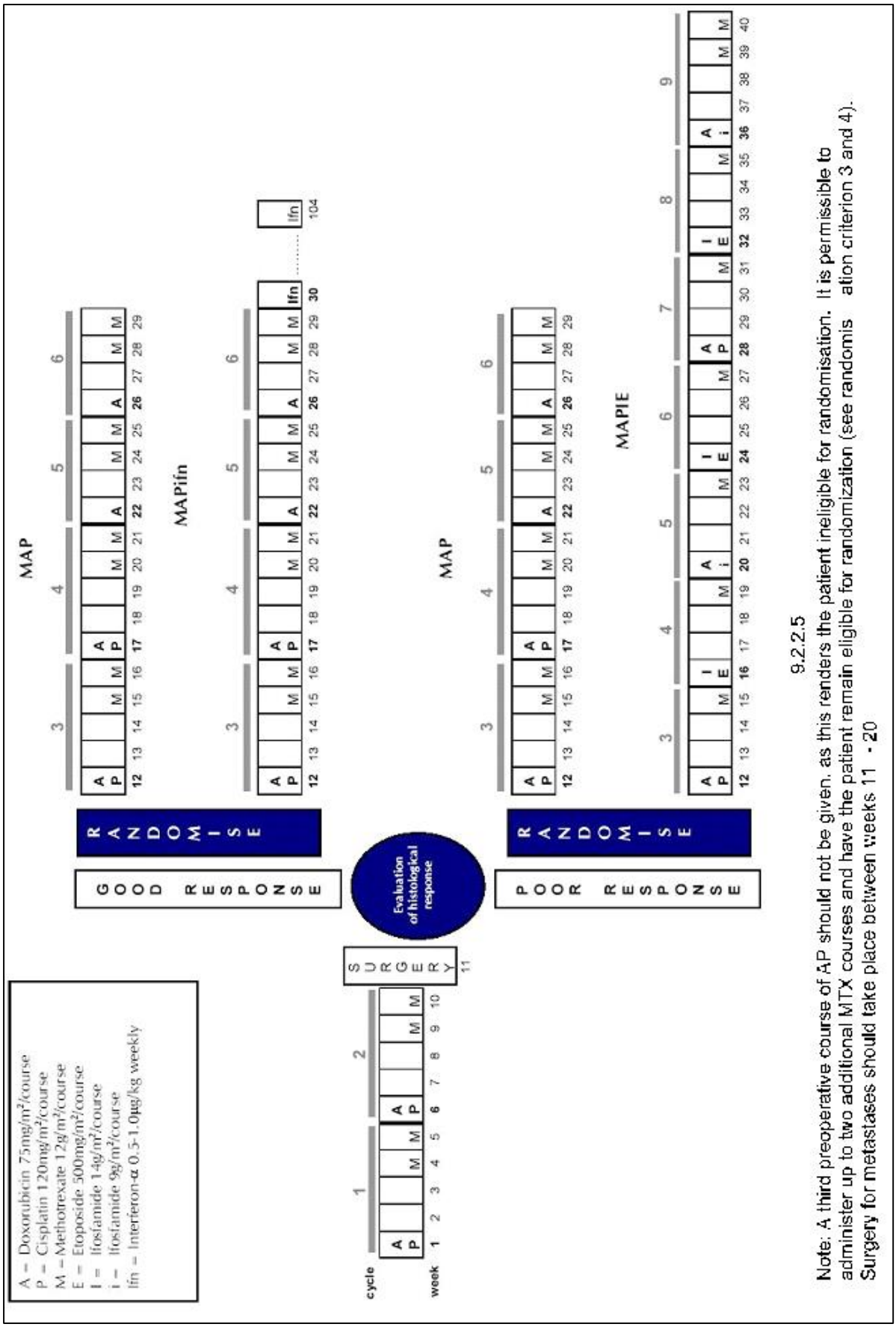
3.1.4 EURAMOS

Godine 2001. četiri istraživačke skupine ujedinile su se da bi istraživanja na osteosarkomima provodila brže i učinkovitije, obzirom da se radi o relativno rijetkom i genetički varijabilnom tumoru, te su osnovale skupinu EURAMOS (European and American Osteosarcoma Studies). Krajnji cilj skupine EURAMOS je poboljšanje ishoda liječenja osteosarkoma kroz provođenje velikih međunarodnih kolaborativnih randomiziranih kontroliranih studija, proučavanje biološkog ponašanja osteosarkoma i pronalaska novih terapijskih pristupa osteosarkomu. Prva takva studija na 2260 bolesnika koja je trajala od 2005. do 2011. godine rezultirala je terapijskim protokolom EURAMOS-1 (32,33), (slika 18a i 18b).



Slika 18a. Shema dijagnostike i liječenja osteosarkoma prema protokolu EURAMOS-1

(preuzeto i prerađeno iz 33).



Slika 18b. Terapijska shema protokola EURAMOS-1 *(preuzeto i prerađeno iz 33).*

3.2 VIROTERAPIJA OSTEOSARKOMA

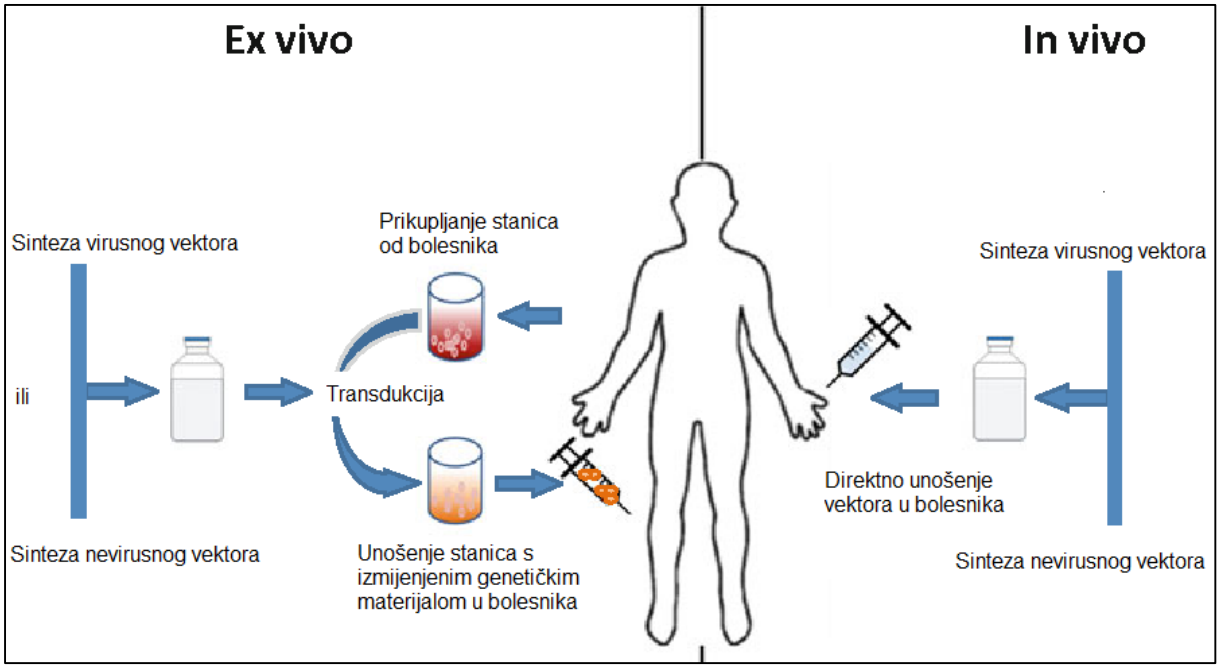
Ograničeni rezultati liječenja osteosarkoma upućuju na potrebu pronalaženja novih metoda liječenja ove bolesti, tražeći rješenja kroz sve veće spoznaje o biološkim procesima organizma i tumora na molekularnoj razini. Gensko liječenje jedno je od mogućih rješenja za postizanje boljih ishoda kod bolesnika oboljelih od osteosarkoma, bilo kroz djelovanje na mutacije tumorskih stanica, bilo na poboljšanje djelovanja protutumorskih lijekova ili obrambenog sustava organizma. Zbog nuspojava protutumorskih lijekova i njihovog djelovanja na zdrave stanice, napose stanice imunosnog sustava, nameće se potreba da gensko liječenje bude selektivno. Gensko liječenje osteosarkoma pretpostavlja razumijevanje genske osnove ovog tumora, koja je na žalost vrlo varijabilna, što znači da bi za njezinu učinkovitu primjenu trebalo najprije odrediti individualne genske aberacije svih populacija tumorskih stanica i razumjeti njihov učinak na funkciju zloćudnih stanica. Iako u svom teorijskom konceptu gensko liječenje otvara velike mogućnosti, valja napomenuti da ono nije isključivi pravac kojim bi se u budućnosti trebalo pristupati ovoj bolesti. Usavršavanjem i ostalih modaliteta liječenja, multidisciplinarnim, individualnim i holističkim pristupom bolesniku, opravdano je očekivati postizanje pozitivnih pomaka u liječenju ove bolesti.

3.2.1 Gensko liječenje (*engl.* gene therapy)

Općenito, gensko liječenje obuhvaća unos rekombinantnih nukleinskih kiselina u tjelesne ili spolne stanice s ciljem nadomještanja aktivnosti učinaka mutiranog gena ili unošenja u stanicu nekog novog gena s ciljem usporavanja ili liječenja bolesti. U svrhu ovog rada razmatrat će se gensko liječenje koje se primjenjuje na tjelesne stanice i na stanice tumora čime je djelovanje liječenja ograničeno na jedinku na kojoj se ono provodi te promjena genetičkog materijala nema učinka na buduće generacije.

Najprije je potrebno sintetizirati gen, odnosno sekvencu nukleinske kiseline koja se planira unijeti u stanicu, a zatim razviti mehanizam kojim će se željeni terapeutski gen unijeti u

ciljne stanice tako da u njima ostvari planirani učinak. Geni se mogu unositi *ex vivo* što znači da se stanice genski mijenjaju izvan tijela, a zatim se izmijenjenog genetičkog sastava vrate u tijelo, ili *in vivo* kada se u ciljne stanice unose geni dok su u tijelu (slika 19).



Slika 19. *Ex vivo* i *in vivo* unošenje terapijskog gena *(preuzeto i prerađeno iz 34).*

Gen se u stanicu može unijeti direktno ili indirektno putem prijenosnog sustava (vektora). Da bi gen koji je unešen u stanicu ostvario svoju funkciju, on bi se trebao ugraditi u točno određeni dio genoma domaćina (nasumična ugradnja značila bi poremećenu kontrolu njegove ekspresije) ili djelovati u jezgri kao episom.

Primjena vektora ima svoje izazove. Da bi vektori bili učinkoviti moraju biti imunosno inertni. Imunosni sustav domaćina može djelovati na vektore, što s jedne strane može ugroziti sigurnost bolesnika zbog mogućih neželjenih učinaka, ili s druge strane dovesti do neučinkovitosti liječenja zbog slabe isporuke terapeutskog gena u ciljnu stanicu, odnosno snižene razine ekspresije gena. To pak može zahtijevati opetovano unošenje gena. Upravo su učinkovita isporuka genskog materijala u ciljnu stanicu i održavanje terapijske razine

ekspresije gena najveći izazovi genskog liječenja na kliničkoj razini, pri čemu svaka bolest i organizam oboljele osobe imaju svoje posebitosti (35).

3.2.2 Prijenosni sustavi (vektori)

Vektori se mogu podijeliti na virusne i nevirusne.

Virusni vektori:

Virusi su evolucijski oblikovani da ulaze u stanicu domaćina i u njoj eksprimiraju svoje gene iskorištavajući resurse i regulatorne mehanizme stanice domaćina, stoga su i prikladan vektor za unos terapijskih gena. Životni ciklus virusa sastoji se od infekcije stanice domaćina, replikacije virusa i oslobađanja virusa iz stanice. Ovisno o vrsti, neki virusi mogu ugraditi svoj genetički materijal u genom stanice domaćina dok drugi ne ugrađuju svoj genetički materijal u DNA domaćina nego ostaju u obliku episoma u jezgri. U oba slučaja genom virusa se eksprimira, stvaraju se virusni regulacijski i strukturni proteini, što za posljedicu ima stvaranje novih virusa, koji zatim mogu izaći iz stanice domaćina i inficirati druge stanice.

Virusni vektori koji se koriste za gensko liječenje imaju izmijenjen genom i sadrže terapijske gene umjesto onih potrebnih za replikaciju samoga virusa. Tako izmijenjeni virusi uz pomoć svojih regulacijskih sekvenci ili egzogeno dodanih promotora potaknu terapijske gene na ekspresiju, dok se virus kao takav ne replicira. Svaki virusni vektor ima svoje posebitosti ovisno o tome kojoj vrsti virus pripada i te se posebitosti mogu koristiti za različite viroterapijske svrhe.

Neki virusni vektori se ugrađuju u genom tumorske stanice, a neki se ne ugrađuju, te je za gensku terapiju tumora logičnije koristiti one koji se ne ugrađuju. Naime, oni koji se ugrađuju to rade nasumično zbog čega mogu dovesti do insercione karcinogeneze.

Obzirom da su virusi u organizmu prepoznati kao štetni, evolucijski je razvijen obrambeni odgovor imunosnog sustava s većom ili manjom učinkovitošću u njihovoj eliminaciji. U kontekstu viroterapije, ovaj odgovor organizma na prisutnost virusa ima svoje ozbiljne

implikacije. S jedne strane može dovesti do uništavanja virusnih vektora i time poništavanja liječenja, a s druge strane pokretanje složenog imunosnog odgovora može imati sustavne učinke na organizam čije je posljedice zbog složenosti samog procesa teško predvidjeti (36,37,38).

Nevirusni vektori:

Sintetski su proizvodi koje je jednostavnije proizvesti od virusnih te nisu podložni imunosnom odgovoru domaćina. Napretkom tehnologije proizvodnje ovih vektora, povećava se njihova efikasnost. Oni mogu biti u različitim oblicima:

1. Gola DNA (plazmid) se primjerice može nanijeti na čestice zlata ili teških metala i pod visokim pritiskom ubaciti u ciljnu stanicu (genski pištolj, *engl.* gene gun);
2. Lipopleksi koji se sastoje od liposoma i dostavljaju terapijsku DNA sekvencu. Tako „upakirani“, terapijski geni su zaštićeni od degradacije i imunosnog sustava. Kationski liposomi su se pokazali boljima u odnosu na anionske i neutralne jer stvaraju stabilnije komplekse obzirom na negativni naboj DNA, bolje prolaze kroz staničnu membranu i otporniji su na degradaciju;
3. Terapijski geni se mogu uklopiti i u različite polimere pa se dobiju polipleksi, napredni oblici vektora koji obzirom na polimere koje sadrže imaju specifičan način interakcije i oslobađanja terapijskih gena u ciljnu stanicu (39).

3.2.3 Opći koncept genskog liječenja zloćudnih tumora

Jedan od razloga pokušaja uvođenja genskog liječenja zloćudnih bolesti jest činjenica da dosadašnji modaliteti liječenja ne mogu uništiti svaku tumorsku stanicu, pa one stanice koje su izbjegle djelovanje primijenjenih terapijskih postupaka nastavljaju s rastom i obnovom tumorske mase, što u konačnici dovodi do nepovoljnog učinka na funkcioniranje organizma i smrtnog ishoda. Da bi gensko liječenje doista bilo uspješno, ono mora dovesti do uništenja svih zloćudnih stanica. To bi se moglo postići kroz:

1. Povećanje ekspresije tumor supresorskih gena ili kočenje ekspresije onkogena;
2. Uvođenjem gena koji blokiraju diobu tumorskih stanica i pokreću mehanizme samouništenja;
3. Molekularnu kemoterapiju uvođenjem gena čiji produkt pretvara netoksičan spoj u toksičan koji uništi ciljnu stanicu;
4. Imunoterapiju koja se temelji na činjenici da tumorske stanice eksprimiraju tumor specifične antigene koji potiču imunosni sustav na djelovanje. U tom slučaju trebalo bi pojačati imunogenost tih antigena, odnosno potaknuti jače djelovanje T-limfocita koje te antigene prepoznaju. To se postiže unošenjem gena za određene citokine u tumorske stanice ili stanice imunosnog sustava, a koji su inače ključni u pokretanju imunosnih reakcija (40).

3.2.4 Onkolitička viroterapija

Početkom prošlog stoljeća u literaturi su se pojavili sporadični izvještaji o remisiji tumora uslijed istovremene virusne infekcije organizma što je dovelo do ideje da se virusi iskoriste u liječenju zloćudnih bolesti i uvođenja viroterapije kao novog terapijskog pravca. Uslijedili su laboratorijski pokusi na životinjskim modelima i izvještaji o regresiji tumora kod miševa nakon provedene viroterapije, ali i opisi toksičnosti navedenog postupka. Nepromijenjeni virusi počeli su se koristiti i u kliničkoj praksi 1960-tih godina njihovim unošenjem u organizam na različite načine, no opaženo je da imunosni sustav imunokompetentnog organizma uspješno svlada virusnu infekciju, ali ne i tumor. S druge strane unošenje virusa u imunodeficijentan organizam povezano je s povećanim morbiditetom i mortalitetom jer je virusna infekcija svladala obrambene mogućnosti organizma. Iz svega navedenog nakon početnog entuzijazma jasno je bilo da ovakav modalitet terapije ima svojih negativnih i potencijalno opasnih strana, što opet nije značilo njezin kraj, nego se napretkom znanja i tehnologije genskog inženjerstva viroterapija poboljšala. Ljudi su uključeni u brojne kliničke studije koje koristeći rekombinantne viruse otvaraju nove mogućnosti u liječenju različitih zloćudnih bolesti. Ono što se može

istaknuti kao problem primjene virusa u organizam, bez obzira o kojem tumoru je riječ, jest da virusi mogu inficirati ne samo ciljne tumorske stanice nego i druge tipove stanica u organizmu što nije jednostavno kontrolirati. Tako inficirane zdrave stanice mogu podleći promjeni svog genetičkog materijala s različitim posljedicama koje nije uvijek moguće jednoznačno predvidjeti (41).

Virus je potrebno dostaviti u ciljnu stanicu, što znači da na putu do njih virus mora proći različite prirodne obrambene mehanizme, od imunosnog sustava do fizikalno-kemijskih svojstava okoliša u kojem se nalaze ciljne stanice. Onkoliza mora biti kontrolirana i ograničena samo na tumorske stanice, i to u dovoljnoj mjeri da sve budu uništene, stoga je sigurnost primjene prva pretpostavka viroterapije. Činjenica jest da su pretkliničke studije za sada pokazale bolje rezultate od kliničkih, no to i dalje nije omelo istraživače da se suoče sa izazovima rješavanja zapreka kako bi viroterapiju doveli u red uspješnih terapijskih opcija u kliničkoj primjeni. Glavna strategija viroterapije se sastoji u poboljšanju onkolitičkog potencijala prirodnih (*engl*. wild-type) ili rekombinantnih (genetički izmijenjenih) virusa koji ciljaju na određene molekule ili signalne puteve eksprimirane u tumorskim stanicama. Potrebno je detaljno razumjeti mehanizme kojim virus uništi stanicu u koju je unešen, kao i koje su prepreke uspješne dostave virusa u ciljnu stanicu. Uz to je svakako važno razumjeti ulogu imunosnog sustava u virusnoj onkolizi. Viroterapija očito nudi dobar strateški pristup jer koristi više mehanizama čime se postiže učinkovitije uništenje tumorskih stanica, a što je nužno kad je riječ o agresivnim tumorima koje treba „napadati“ na više polja istovremeno i ne dozvoliti povratak i napredak bolesti. Uz to, viroterapija dozvoljava kombiniranje s dosadašnjim terapijskim modalitetima, povećavajući izglede za kontrolom bolesti i izlječenjem.

3.2.5 Onkolitička viroterapija osteosarkoma

Osteosarkom je u kontekstu primjene onkolitičke terapije vrlo izazovan tumor zbog svog složenog i varijabilnog genetičkog profila te histološkog izgleda, posebno kad je riječ o metastatskom tumoru. Jasno je da viroterapija nije jedini modalitet liječenja koji se istražuje za

poboljšanje ishoda ove bolesti, što je zapravo ispravno obzirom na složenost i prirodu bolesti. Većina općih principa i izazova onkolitičke viroterapije može se primijeniti i na osteosarkom s tim da on ima i svoje posebitosti. U pretkliničkim studijama kao životinjski model uglavnom se koriste psi, obzirom na sličnosti u imunosnom odgovoru te prirodnom ponašanju osteosarkoma. Naime, da bi se postigao očekivani uspjeh u kliničkom dijelu istraživanja, potrebno je imati u vidu što više ključnih čimbenika u pretkliničkom dijelu istraživanja.

Osteosarkom je poseban zbog svog histološkog izgleda i lokalizacije što predstavlja izazov dostave virusa u ciljne stanice. On sadrži različite količine osteoida, gustog matriksa koji proizvode tumorske stanice i koje se njime okruže. Osteosarkom uglavnom raste unutar određenog odjeljka čije čvrste granice dugo održavaju tumor unutar tog jednog odjeljka. To stvara veliki pritisak u samoj tumorskoj masi koja raste brzo i nastoji se proširiti, a otvaranje odjeljka u sklopu medicinske intervencije nije poželjno radi lokalne kontrole bolesti. Tumorska masa nije uniformna. Središnji dio je u različitom postotku nekrotičan i u njemu vlada hipoksija, kiseli medij te pomanjkanje krvne opskrbe. Nekroza, među ostalim, nastaje zbog neproporcionalnosti brzine rasta tumorske mase i stvaranja krvnih žila koje dostavljaju tumorskim stanicama elemente potrebne za njihov rast. Područja nekroze se organiziraju u degenerativne ciste koje mogu biti ispunjene tekućinom, a mogu se i sekundarno inficirati obzirom da nema uvjeta za adekvatnu reakciju imunosnog sustava na mikroorganizme. Tumorska masa je prožeta i cistama ispunjenim zgrušanim krvavim sadržajem kao odraz krvarenja iz brojnih krhkih, nezrelih, slabo formiranih krvnih žila koje su takve zbog ubrzane angiogeneze kao odgovora na povećane sintetske i metaboličke potrebe tumorskih stanica. U taj dio tumora dakle nije jednostavno dopremiti terapijske viruse. Vijabilne tumorske stanice su uglavnom na periferiji tumora gdje se nalazi većina krvnih spletova koji se odvajaju od većih krvnih žila da bi iz cirkulacije dovele krv u tumor. Nije stoga neobično da se većina tumorske mase nalazi uz velike krvne žile, što teoretski znači da virusi primijenjeni u cirkulaciju uglavnom mogu doprijeti u vijabilni dio tumora.

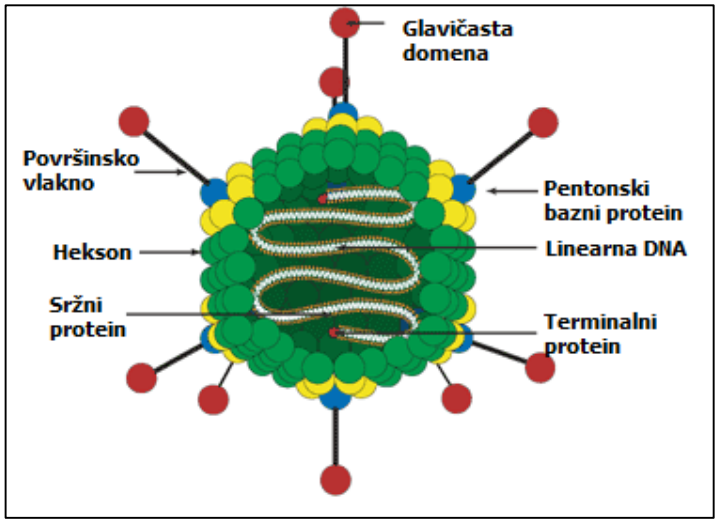
Nadalje, osteosarkom sadrži i tumorske matične stanice koje zahtijevaju posebnu pozornost da bi se moglo uspješno djelovati na tumor u cjelini, jer predstavljaju posebnu

populaciju stanica i ponašaju se drugačije od ostalih tumorskih stanica. Predstavljaju izvor iz kojeg se tumorska masa obnavlja, mogu razvoj tumora dijelom ili u cijelosti usmjeriti prema potpuno novoj vrsti iz skupine mezenhimalnih tumora tj. mogu dovesti do dediferencijacije tumora. Njihova posebitost je i ta što su relativno otporne na kemoterapiju i radioterapiju, samoobnavljaju se i uspješno metastaziraju zbog čega se bolest može opetovano javljati bez mogućnosti da se na njih značajno djeluje dosadašnjim modalitetima liječenja.

Kad je riječ o genetičkoj strukturi tumora, naglašeno je više puta da je ona varijabilna kao i signalni putevi unutar tumorskih stanica. Da bi se uspješno djelovalo virusima, očito je potrebno analizirati molekularnu strukturu tumora individualno za svakog bolesnika te testirati i odabrati mete za najbolji učinak, pri čemu valja uzeti u obzir prisutnost različitih subpopulacija stanica u tumoru i signalne puteve kojima ostvaruju međudjelovanje (42).

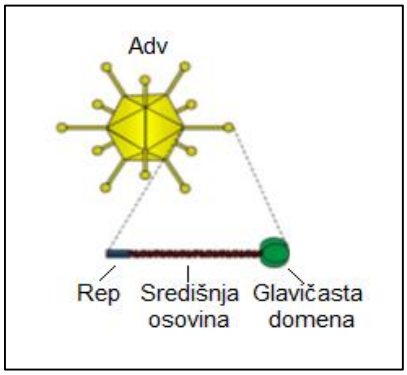
3.2.6 Virusi u onkolitičkoj viroterapiji osteosarkoma

Adenovirusi (AdV) su uglavnom uzročnici infekcija dišnih puteva i probavnog sustava, a mogu uzrokovati i keratokonjunktivitis. Prvi put su izolirani iz tonzila (adenoida) čovjeka pa su po tome dobili ime. Postoji više rodova i serotipova virusa koji se svrstavaju u porodicu *Adenoviridae*, a svima je zajednička ista građa (slika 20).



Slika 20. Građa adenovirusa *(Preuzeto i prerađeno iz 43).*

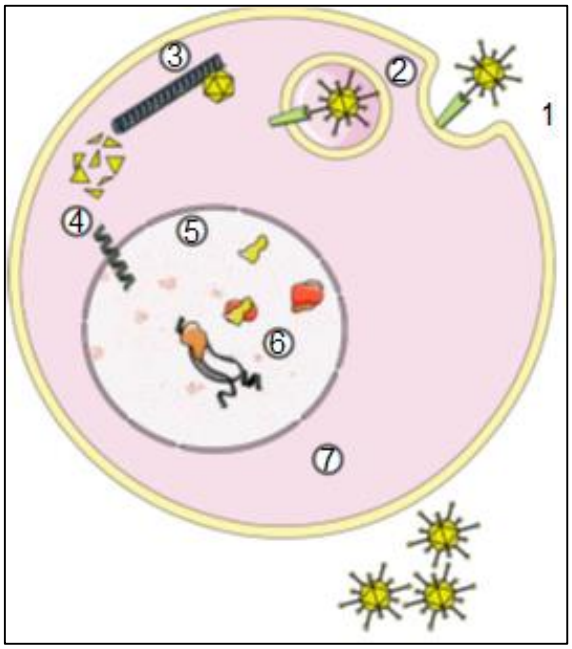
Adv nemaju ovojnicu, kapsida je građena od različitih proteina od kojih u kontekstu viroterapije najvažniju ulogu imaju površinska vlakna koja strše iz kapside poput antena (*engl.* adenovirus fiber protein). Najčešće korišteni serotip je adenovirus tip 5 (Ad5). Navedena vlakna na Ad5 posreduju prilikom njegovog vezanja na coxsackie-adenovirus receptor (CAR) i sadrže tri domene: N-terminalni rep (*engl*. tail) koji vezuje protein za virusnu kapsidu, zatim područje središnje osovine (*engl.* shaft) promjenjive duljine i fleksibilnosti, i C-terminalnu glavičastu domenu (*engl.* knob) koja se veže na CAR (slika 21).



Slika 21. Površinsko vlakno vezano na virusnu kapsidu (*preuzeto i prerađeno iz 44).*

Prvi komercijalno razvijeni onkolitički virusi su adenovirusi divljeg tipa (*engl*. wild type) te imaju brojne osobitosti zbog čega bi mogli poslužiti kao virusni vektori, posebno serotip 5 koji inficira stanice gornjeg dišnog sustava (Ad5). Ad5 mogu inficirati različite vrste stanica, i one koje se dijele i koje se ne dijele (mogu proizvesti takav učinak da stanica bude u fazi koja je slična S fazi staničnog ciklusa). Nadalje, virusni titar brzo raste, virusna DNA se ne ugrađuje u stanicu domaćina što smanjuje rizik mutagenog učinka na zdrave stanice. Virusna DNA je dvolančana, sadrži oko 36 kb i kodira oko 40 gena. Nalazi se u jezgri i tamo se prepisuje. Površinska vlakna na kapsidi služe za povezivanje Ad5 na coxsackie-adenovirus receptor (CAR) stanice domaćina nakon čega slijedi interakcija s koreceptorom integrinom koji je također na staničnoj membrani domaćina, što stimulira internalizaciju virusa u obliku endosoma, tj. proces endocitoze. U endosomu virus pod utjecajem kiselog medija mijenja topologiju i oslobađa se u citoplazmu, virusne čestice migriraju preko mikrotubula i disociraju te slobodna virusna DNA kroz pore ulazi u jezgru. Virusna DNA se veže s histonima.

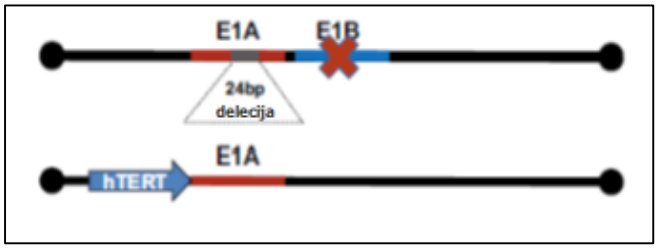
Slijedi prepisivanje virusne E1A i E1B regije (*engl*. early-region) i stvaranje virusnih proteina E1A i E1B. Protein E1A inaktivira retinoblastom (Rb) protein, a protein E1B inaktivira tumor supresorski protein p53 i tako potiču stanični ciklus da bi omogućili proces replikacije virusa. Naime, u normalnoj situaciji Rb protein se veže za transkripcijski čimbenik E2F i takav kompleks sprječava ulazak stanice u S fazu staničnog ciklusa. Vezanje virusnog proteina E1A na Rb protein dovodi do otpuštanja transkripcijskog čimbenika E2F, što potiče replikaciju virusne DNA. Što se tiče p53, on djeluje na zaustavljanje staničnog ciklusa sprečavajući replikaciju oštećene DNA. Osim toga, može zaustaviti rast stanice i aktivirati transkripciju proteina uključenih u popravak DNA. Ako se navedeni mehanizmi ne pokažu djelotvornima, slijedi apoptoza kao zadnji mehanizam da bi se izbjegla proliferacija stanica koje sadrže abnormalnu DNA. Vezanje virusnog proteina E1B na p53 dovodi do njegove inaktivacije čime se također potiče stanični ciklus i replikacija virusne DNA. Zatim se proizvedu strukturni proteini virusa od kojih se izgrade cjelovite virusne čestice, koje se otpuštaju iz stanice uslijed induciranja citolize (slika 22).



Slika 22. Shematski prikaz životnog ciklusa Ad5. 1. Povezivanje virusa sa specifičnim receptorom, 2. endocitoza, 3. disocijacija virusa i migracija virusnih čestica preko mikrotubula do jezgre, 4. ulazak virusnog genoma u jezgru, 5. ekspresija virusnog gena E1A, 6. vezanje proteina E1A na Rb protein, otpuštanje čimbenika E2F i replikacija virusne DNA, 7. formiranje virusnih čestica *(preuzeto i prerađeno iz 44).*

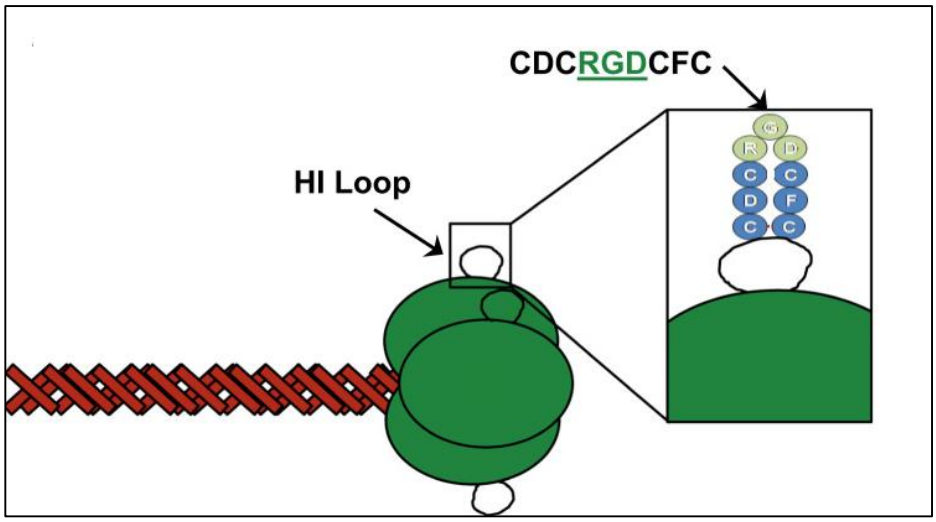
Viroterapija adenovirusima međuostalim se može provesti koristeći uvjetno replicirajuće adenovirusne vektore (*engl.* conditionally replicating AdV vectors, CRAds), a ima i onih s delecijom na E1A ili E1B regiji. Da bi se dokinuo štetan učinak na zdrave stanice, promjena virusne DNA u smislu delecije na E1A regiji rezultira ukidanjem vezivanja E1A na Rb protein, čime se može ograničiti proizvodnja virusa u normalnim stanicama. Takav učinak ispitan je na virusu VCN-01. Inaktivacija gena Rb i p53 nerijetko se može naći u osteosarkomu. Uvođenjem virusa s delecijom na E1A i E1B regiji, značilo bi da će se virus amplificirati *in situ* i inficirati druge tumorske stanice, a u isto vrijeme neće dodatno poticati diobu tumorske stanice s defektnim Rb i p53 mehanizmom, niti će oštećivati zdrave stanice.

Ekspresija gena E1A isključivo u tumorskim stanicama se može potaknuti preko tumor specifičnih promotora kao što je hTERT (*engl.* human telomerase promoter) (slika 23).



Slika 23. Primjer strategije postizanja selektivnosti AdV za tumorske stanice *(preuzeto i prerađeno iz 44).*

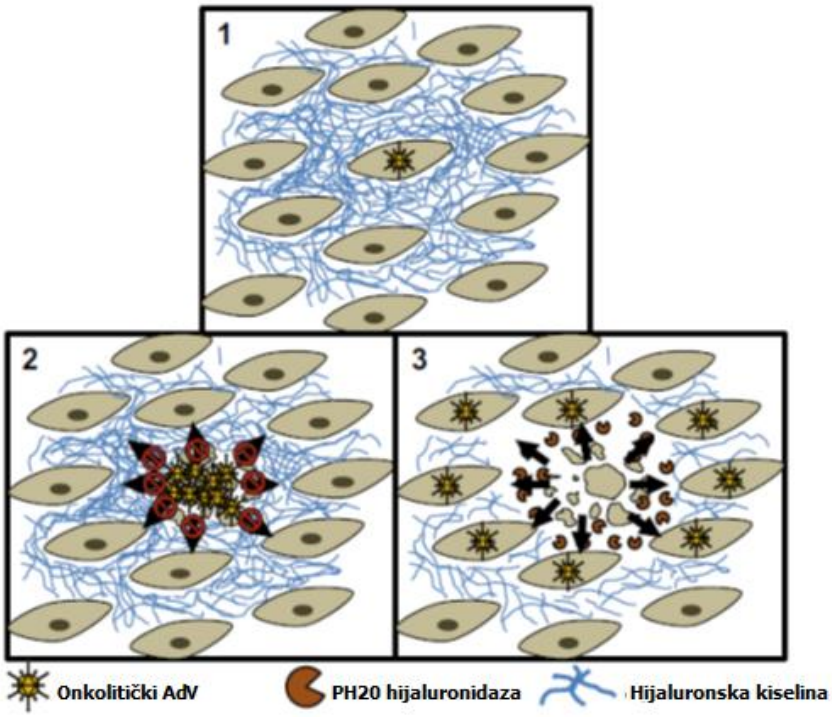
Virus bi se trebao uvesti preko CAR receptora no ekspresija CAR je relativno slabo izražen na stanicama osteosarkoma, zbog čega je ograničen ulazak virusa u tumorske stanice, stoga su rezultati istraživanja pokazali relativno nisku protutumorsku aktivnost virusa. Djelomični način prevladavanja ovog problema postignut je kroz sintezu Ad5 virusa Delta24 (Delta24-RGD) koji na svom površinskom vlaknu sadrži inserciju RGD4C koja se veže na RGD vezujuće integrine tumorske stanice (slijed od tri aminokiseline Arg-Gly-Asp) što dovodi do direktne internalizacije virusa u stanicu (slika 24). Cisteini C (547) i C (549) iz slijeda C (547) DC (549) RGDC (553) FC (555) umetnuti u HI petlju Ad5 vlakana tvore jednu disulfidnu vezu, pri čemu je ova disulfidna veza presudna za Ad5RGD4C preusmjeravanje na a_v-integrin (45).



Slika 24. Dodatak slijeda aminokiselina na glavičastu domenu površinskog vlakna preko HI-petlje (*engl.* HI-loop) *(preuzeto i prerađeno iz 44).*

Dokazano je da je prisutnost $\alpha_v\beta_{3/5}$ integrina na tumorskim stanicama primarnih kultura i staničnih linija osteosarkoma povezana s većom osjetljivošću tumorskih stanica na infekciju virusom koji ima inserciju RGD u usporedbi s nemodificiranim virusom. Ipak, nađeno je da u ksenograftovima osteosarkoma implantiranih u potkožje miševa virus ne zaražava sve tumorske stanice, moguće upravo zbog otežanog širenja kroz tumorski matriks. Isti autori su utvrdili nešto bolji odgovor metastatskog tumora na intravensko primijenjeni virus Delta24-RGD. Nadalje, obećavajućom se čini i primjena navedenog virusa u kombinaciji s cisplatinom.

Već spomenuti virus VCN-01 uz deleciju na genu E1A za vezanje na Rb, što mu omogućava selektivnu replikaciju u tumorskim stanicama, ima još dvije modifikacije. To su RGD dodatak na površinskom vlaknu virusa čime je pojačan tropizam prema tumorskim stanicama, te PH20 hijaluronidaza zahvaljujući kojoj se virus učinkovitije prenosi kroz izvanstanični matriks da bi došao do drugih tumorskih stanica (Slika 25). Stoga se ovaj virus pokazao dobrim potencijalom u onkolitičkoj viroterapiji osteosarkoma.



Slika 25. Prijenos onkolitičkog AdV kroz izvanstanični matriks. 1. Stanice inficirane onkolitičkim AdV okružene izvanstaničnim matriksom, 2. virus VCN-01 koji proizvodi PH20 hijaluronidazu, 3. degradacija izvanstaničnog matriksa i širenje onkolitičkih virusa na tumorske stanice *(preuzeto i prerađeno iz 44).*

Da bi se postigla selektivnost, kao promotor ekspresije gena E1A za replikaciju virusa korišten je i osteokalcin kojega nerijetko eksprimiraju razni solidni tumori, uključujući i osteosarkom. U pretkliničkim modelima nađena je aktivnost navedenog gena E1A pod utjecajem osteokalcina, pa se istražuju mogućnosti ekspresije raznih gena pod utjecajem osteokalcina kao promotora, primjerice suicidnog gena HSV-TK (herpes simpleks virusna timidin-kinaza).

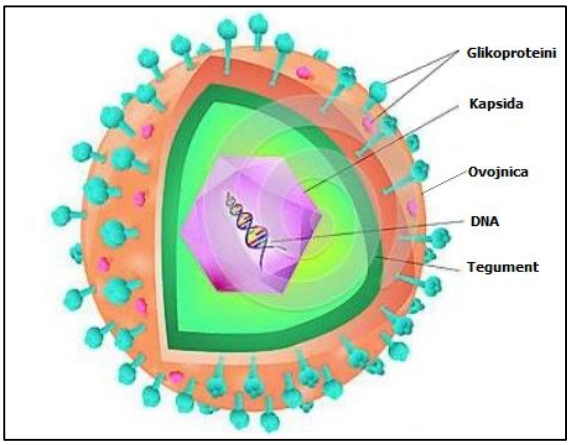
Telomeraze su također često eksprimirane u brojnim tumorima i kao takve su potencijalna meta djelovanja virusa dok ih u normalnim odraslim stanicama nema. Telomelizin je replikacijski defektan CRAd vektor koji djeluje na tumorske stanice koje eksprimiraju telomerazu. Pokazao je citolitički učinak na stanice osteosarkoma *in vitro i in vivo* te dobru sigurnost u prvoj fazi kliničkih studija na bolesnicima s uznapredovalim osteosarkomom, ali i drugim solidnim tumorima.

Valja imati na umu da su ispitani virusi svoj ohrabrujući učinak postizali i zahvaljujući isključenju imunosnog odgovora imunodeficijentnih životinjskih modela, stoga je potrebno ispitati njihovo ponašanje obzirom na kompetentan imunosni odgovor. U tom smislu, onkolitički virusi se mogu iskoristiti tako da potaknu prezentaciju specifičnih antigena na tumorskim stanicama (*engl.* tumor asociated antigens) kako bi ih imunosni sustav prepoznao i uništio, ili da replikacijom virusi dovedu do onkolize, uslijed koje bi se tumorski antigeni oslobađali i aktivirali imunosni odgovor posredstvom T-limfocita. Radi se dakle o sinergističkim mehanizmima koje bi onkolitički adenovirusi pokretali u imunokompetentnom organizmu (42,44,45,46,47,48,49,50).

Početkom 2000-tih završene su I i II faza kliničkih ispitivanja onkolitičkog adenovirusa ONYX- 015 koji je pokazao dobar sigurnosni profil i umjereno, ali obećavajuće protutumorsko djelovanje. Kasnije je kineski Shanghai Sunway Biotech, kojemu su prodana prava, završio III fazu kliničkog ispitivanja koristeći onkolitički adenovirus H101 (modificirani ONYX-015, prodaje se pod trgovačkim imenom Oncorine). Njegova uporaba ima odobrenje od kineskih vlasti za liječenje planocelularnog karcinoma glave i vrata. Međutim, važno je istaknuti da je ovaj tretman odobrila kineska regulatorna agencija bez ikakvih podataka o preživljavanju pacijenta, niti je tvrtka dala podatke o ukupnom preživljenju bolesnika (44). Za sada, u Europi i SAD-u onkolitička viroterapija adenovirusima nije odobrena za kliničku primjenu.

Herpes virusi (HSV): Članovi su porodice *Herpesviridae*, te se svrstavaju u rod *Simplexviridae* i vrste HSV-1 ili HSV-2. Sadrže dvolančanu DNA koja ima oko 80 gena, kapsidu i lipidnu ovojnicu (slika 26). HSV-1 obično uzrokuju ulceracije područja nosnica i usnica, dok HSV-2 uzrokuje genitalne ulceracije. Virus u stanicu sluznice ulazi inokulacijom, a zatim se retrogradno preko živčanih ogranaka naseljava u ganglijske stanice živca gdje ostaje latentan te se povremeno aktivira pri čemu se virusne stanice ponovno umnažaju u stanicama sluznice uzrokujući njihovu lizu. HSV-1 potencijalno može izazvati encefalitis jer naseljava ganglijske stanice središnjeg živčanog sustava. Imunosne stanice neutraliziraju, ali ne uspijevaju

iskorijeniti virus iz organizma. Ovdje valja primijetiti da HSV uglavnom prelazi iz jedne u drugu stanicu te hematogeni prijenos virusa ili njegovo širenje limfnim sustavom nemaju značajniju ulogu.



Slika 26. Građa herpes virusa *(Preuzeto i prerađeno iz 51).*

HSV je prvi genetički modificirani onkolitički virus testiran u laboratoriju. Naime, virusna DNA je velika i dopušta različite manipulacije, među ostalim umetanje željenih gena ili delecije na genima koje reguliraju nepoželjna svojstva virusa.

Virus se veže preko glikoproteina C svoje ovojnice na heparan-sulfat proteoglikanski receptor stanice domaćina. Vezivanje se nastavlja preko više različitih virusnih glikoproteinskih receptora, stvaraju se molekularni kompleksi između virusne ovojnice i stanične membrane domaćina da bi se naposljetku virusna čestica oslobodila u citoplazmu. Čestica se sastoji od proteinskog tegumenta (*lat. tegumentum* – ljuska, ovojnica) koji okružuju virusnu DNA. Virusni protein VHS (*engl.* virion host shutoff) zaustavlja sintezu proteina stanice domaćina, degradira mRNA domaćina i regulira ekspresiju virusnih proteina. Rani α proteini ulaze u jezgu i aktiviraju transkripciju virusnih gena, rani β proteini reguliraju tu transkripciju, a kasni γ proteini sudjeluju u izgradnji virusnih strukturnih proteina. Nakon replikacije DNA i proizvodnje proteina koji tvore kapsidu, stvori se ovojnica oko kapside virusa i to od membrane jezgre domaćina, i nakon toga čestice virusa izlaze u citoplazmu. Virus u stanici ganglija može ostati latentan i tada eksprimira LAT (*engl.* Latency Associated Transcript) RNA koja interferira s mehanizmima stanične smrti. Potonje je predmet istraživanja no za sada nema dokaza da LAT RNA aktivira dsRNA - ovisnu

protein kinazu (*engl*. double-stranded RNA - dependent protein kinase, PKR). Ostavljajući stanicu na životu, ona služi kao virusni rezervoar.

Po ulasku virusa u stanicu, premda se radi o DNA virusu, dolazi do aktivacije PKR, (*engl*.„innate activation“) (42). Navedena protein kinaza osigurava temeljni korak u kontroli i regulaciji inicijacije sinteze proteina kroz fosforilaciju alfa podjedinice eukariotskog inicijacijskog čimbenika 2 (eIF-2α), čime se sprječava inicijacija stvaranja polipeptidnog lanca. Na taj način, aktivirana PKR inhibira stanični rast i inducira apoptozu, dok poremećaj normalnog PKR signaliziranja rezultira nereguliranim staničnim rastom. eIF-2α je prisutan u normalnim stanicama, ali ne i u stanicama s aberantnim putem PKR.

Virusni protein ICP34.5 (*engl.* infected cell protein) kodiran virusnim $\gamma_1$34.5 genom djeluje na defosforilaciju eIF-2α tako da virus može sintetizirati svoje proteine potrebne za replikaciju. Obzirom da HSV može izazvati encefalopatiju, za onkolitičku primjenu potrebno ga je atenuirati kroz promjenu gena $\gamma_1$34.5. Signalni put Ras/MapK (Ras/proteinska kinaza aktivirana mitogenom) je često aktivan u brojnim tumorima pa tako i osteosarkomu te suprimira PKR put, zbog čega se HSV s promijenjenim genom $\gamma_1$34.5 može umnažati u takvim stanicama.

Virusni gen UL39 kodira protein ICP6, podjedinicu ribonukleotid reduktaze, enzima važnog za replikaciju virusne DNA, a koji je jako eksprimiran i u tumorskim stanicama koje se brzo dijele. Ribonukleotid reduktaza je enzim koji katalizira stvaranje deoksiribonukleotida iz ribonukleotida, što je važno za sintezu DNA. Inaktivacijom virusnog ICP6, HSV-1 će se selektivno replicirati u tumorskim stanicama. UL39 i $\gamma_1$34.5 delecije omogućavaju onkolitičku aktivnost u tumorskim stanicama, štedeći normalne stanice.

HSV-TK (Herpes simplex virus – timidin kinaza) je kodirana virusnim genom UL23. Fosforilira timidin, a može fosforilirati i ganciklovir pa nastane toksični derivat koji se ugrađuje u DNA domaćina potičući smrt stanice, zbog čega se naziva i suicidnim genom. Prijenos gena za HSV-TK i korištenje ganciklovira je u eksperimentalnoj fazi s dobrim djelovanjem na stanice

osteosarkoma kod štakora. Prednost ovog pristupa je „bystander effect“ - difuzija toksičnog produkta u okolne stanice.

Eksperimentalne studije djelovanja HSV onkolitičkih virusa na osteosarkom su provedene modificiranim HSV-1 virusima NV1020 i G207. Virus NV1020 sadrži glikoproteinsku inserciju HSV-2 virusa (da mu se atenuira utjecaj na normalne stanice), zatim deleciju jedne kopije ICP34.5 (da mu se pojača učinak na tumorske stanice) i gen HSV-1 TK. Virus G207 ima deleciju na UL39 i na obje kopije ICP34.5. Oba su za sada pokazali umjereni učinak na stanice osteosarkoma. Obećavajućima su se pokazali i rezultati pretkliničkih i kliničkih studija s intratumorski injiciranim HSV1716 koji ima deleciju ICP34.5, a koji je primijenjen i kod djece s ciljem izazivanja imunosnog odgovora na tumorske antigene. Plan je razviti način za sistemsku dostavu virusa u metastatske stanice (42,52,53,54,55).

T-VEC (Imlygic ™) je atenuirani HSV-1, modificiran umetanjem GM-CSF na mjesto oba lokusa gena ICP34.5 te delecijom gena ICP47. Ove izmjene su povećale selektivnost za replikaciju u tumorskim stanicama, pojačavajući imunosni odgovor usmjeren za tumor. Nakon što je u kliničkim studijama dokazao svoju sigurnost i djelotvornost, FDA (Food and Drug Administration) je odobrila 2015. godine T-VEC za liječenje bolesnika s metastatskim melanomom. To je prvi i za sada jedini onkolitički virus odobren od FDA za navedenu indikaciju. Povoljan sigurnosni profil i sposobnost poboljšanja imunosnog odgovora T-VEC čini privlačnim kandidatom za uporabu u kombinaciji s inhibitorima imunosnih kontrolnih točaka: anti-CTLA-4 (ipilimumab) i anti-PD-1 (pembrolixzumab). T-VEC poboljšao je učinkovitost ipilimumaba povećavajući objektivni odgovor gotovo dvostruko u usporedbi s liječenjem ipilimumabom. Objektivni odgovor je postotak bolesnika čiji se rak smanjuje ili nestaje nakon liječenja. Kada se koristi kao krajnja točka za klinička ispitivanja liječenja raka, obično se koristi termin objektivna stopa odgovora (*engl.* objective response rate, ORR). Objektivni odgovor za pembrolixzumab u studiji koja je uključila 22 bolesnika je bio 62%. Ovi rezultati sugeriraju da je kombinacija onkolitičkih virusa i inhibitora imunosnih kontrolnih točaka uspješnija u liječenju

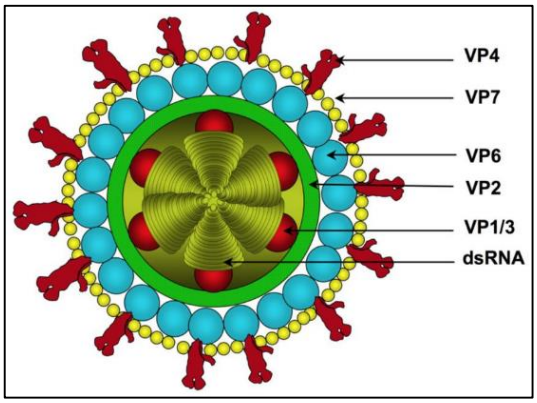
melanoma nego ako bi se onkolitički virusi odnosno inhibitori imunosnih kontrolnih točaka koristili sami (56).

Virus vakcinije (*engl.* vaccinia virus) spada u porodicu *Poxviriadae* (slika 27). Ima dvolančanu DNA veličine oko 190 kb i kodira oko 250 gena. Uzrokuje male boginje te je prvi virus korišten za cijepljenje i iskorijenjivanje navedene bolesti.

Slika 27. Čestice virusa vakcinije *(preuzeto i prerađeno iz 57).*

Virus se replicira bez potrebe za aktivacijom domaćinovih staničnih mehanizama. Ostaje u citoplazmi te se ne integrira u genom domaćina. Stanice podliježu nekrozi uslijed virusne replikacije. Virus posjeduje prirodni tropizam za gotovo sve stanične linije i pokreće snažan imunosni odgovor, koji u imonosuprimiranom organizmu izostaje te virus može izazvati encefalitis. Kad je riječ o ispitivanjima onkolitičke sposobnosti vakcinija virusa na stanice osteosarkoma, korišten je atenuirani virus s delecijom na genu za timidin-kinazu, što sprječava sintezu virusne DNA, nužne za replikaciju virusa. Budući da tumorske stanice s mutacijom gena RAS ili p53 imaju visoke razine timidin-kinaze, virus s navedenom delecijom će se replicirati upravo u takvim stanicama. Virus vakcinije proizvodi VGF (*engl*. vaccinia growth factor) koji se veže za EGFR (*engl.* epidermal growth factor receptor) i aktivira ga, što je vrlo važno za širenje virusa. Virusi s dvostrukom delecijom za timidin-kinazu i VGF, te virusi koji su uz ove delecije eksprimirali i GM-CSF (*engl*. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) pokazali su se još učinkovitijima. Naime, GM-CSF inicira protutumorski imunosni odgovor domaćina (42, 58, 59).

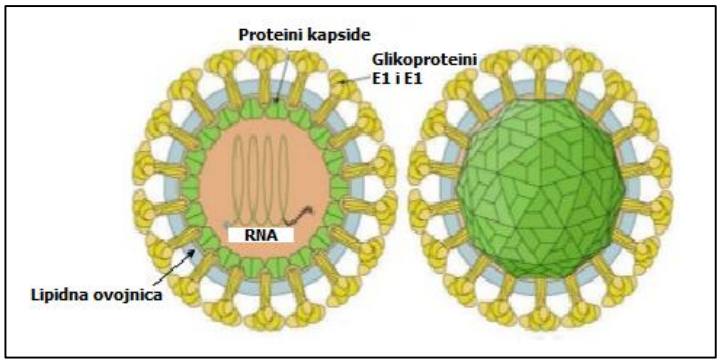
Reovirus spada u porodicu *Reoviridae* te ima dvolančanu RNA kao genom. U ovu porodicu spada i rotavirus (slika 28), pa iako se reoviruse može često izolirati u dišnom i probavnom sustavu ljudi, oni najčešće ne uzrokuju bolest. Osim toga, vrlo su rašireni u prirodi.



Slika 28. Shematski prikaz rotavirusa. VP predstavljaju strukturne proteine *(preuzeto i prerađeno iz 60).*

Virus je ovisan o signalnom putu Ras koji je često aktiviran u stanicama osteosarkoma. Reolysin je rekombinantni reovirus koji se koristi u studijama o onkolitičkom djelovanju na stanice sarkoma te se pokazalo da je statistički značajno bolje preživljenje životinja s osteosarkomom koje su tretirane Reolysinom u usporedbi s kontrolnim skupinama čiji tumori nisu tretirani Reolysinom. Osim toga, Reolysin se u kombinaciji s cisplatinom pokazao uspješnim u kontroli progresije bolesti na mišjem modelu. Djelovanje Reolysina je zatim testirano kod odraslih osoba, i do sada je pokazano da uzrokuje relativno blage nuspojave slične prehladi koje nije potrebno liječiti. U novije studije su uključena i djeca sa solidnim tumorima koji ne odgovaraju na terapiju (42,61,62,63,64).

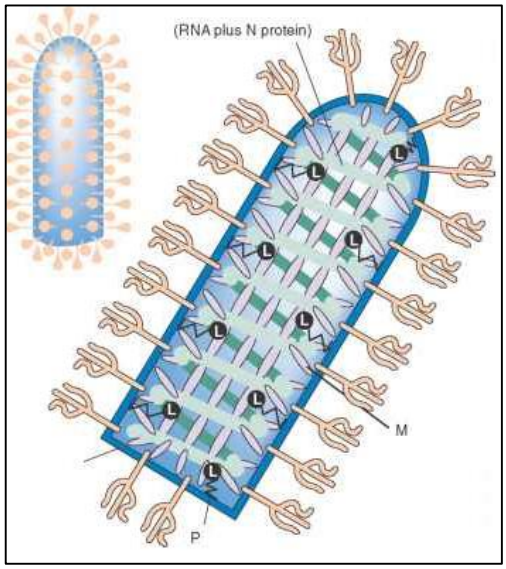
Virus šume Semliki (*engl.* Semliki Forest Virus, SFV) prvi put je izoliran iz komaraca šume Semliki u Ugandi. Spada u porodicu *Togaviridae* te ima RNA kao genom (slika 29). Uzrokuje bolesti kod životinja, posebice glodavaca, kod kojih zbog svoje neurotropnosti izaziva encefalitis. Rijetko je patogen za ljude.



Slika 29. Shematski prikaz virusa šume Semliki *(preuzeto i prerađeno iz 65,66).*

Ispitan je atenuirani virusni vektor SFVA7 koji eksprimira EGFP (*engl.* enhanced green fluorescent protein) koji daje bolju vizualizaciju, te se virus pokazao učinkovitim pri injiciranju u supkutane osteosarkomske ksenografte miševa u smislu značajnog poboljšanja preživljenja životinja (42,67).

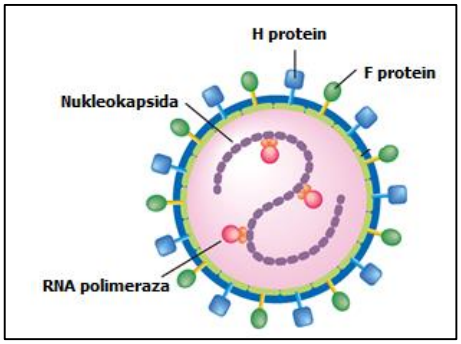
Virus vezikularnog stomatitisa (*engl.* Vesicular Stomatitis Virus, VSV) je RNA virus (slika 30) koji spada u porodicu *Rhabdoviridae* u koju spada i uzročnik bjesnoće te se replicira u citoplazmi. Uglavnom zaražava domaće životinje, a kod ljudi može izazvati simptome slične gripi.



Slika 30. Shematski prikaz virusa vezikularnog stomatitisa. Veliki protein L (*engl.* large protein), fosfoprotein (P), matriks protein (M) i nukleoprotein (N) *(preuzeto i prerađeno iz 68).*

Zanimljivo je što se može replicirati i u hipoksičnim dijelovima tumora. Ispitan je atenuirani virus VSV-G/GFP koji daje zelenu fluorescenciju, te je utvrđena njegova izrazita sklonost ka sarkomskim stanicama u odnosu na normalne mezenhimalne stanice. Virus je u apliciran u femoralnu arteriju štakora s osteosarkomom, tako da minimalno dospije u sistemsku cirkulaciju. Tumori su se u tretiranim životinjama značajno smanjili u odnosu na kontrolnu skupinu, a osim toga, životinje nisu gubile na tjelesnoj težini te nisu pokazivale znakove infekcije, a zahvaćeni ekstremitet je bio vijabilan (42,69,70).

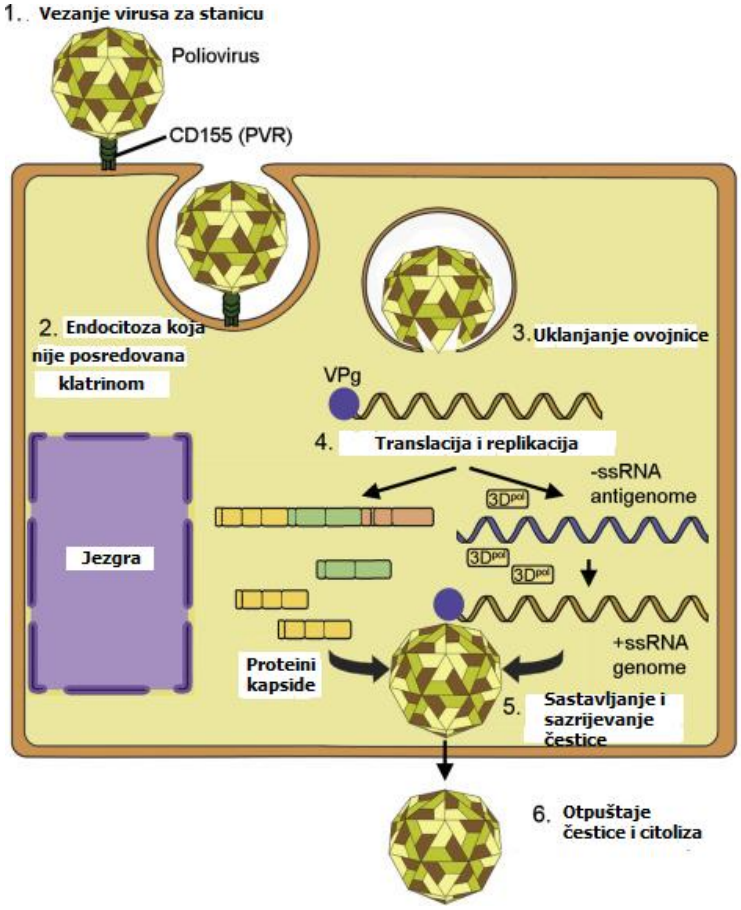
Virus ospica (*engl.* Measles Virus, MeV) je RNA virus iz porodice *Paramyxoviridae.* Prirodni domaćini ovog virusa su ljudi te do sada nisu dokazani životinjski rezervoari. Širi se respiratornim putem i uzrokuje ospice koje su vrlo zarazne. Na površini ima dva glikoproteina, hemaglutinin (H) i membranski fuzijski protein (F). Ti proteini su odgovorni za vezanje i invaziju stanica domaćina (slika 31). Jednolančana RNA (*engl.* single stranded, ssRNA) se koristi za stvaranje pozitivne kopije, a zatim se koristi za stvaranje nove negativne kopije itd. ssRNA se zatim prevodi preko ribosoma domaćina, proizvodeći potrebne virusne proteine. Virusi se tada sastavljaju, a stanica domaćina podliježe citolizi i ciklus replikacije se ponovno pokreće.



Slika 31. Shematski prikaz virusa ospica *(preuzeto i prerađeno iz 71).*

Međutim, stanice ostosarkoma su se pokazale otpornima na citolizu zbog inhibicije replikacije virusa. Smatra se da otpornost djelomično nastaje zbog povišene razine interferona u tumorskim stanicama, no mehanizam otpornosti je složen i tek ga treba objasniti, obzirom da tretiranje tumorskih stanica protutijelima na interferon nije učinilo stanice osjetljivima na MeV (42,72).

Poliovirus je uzročnik poliomijelitisa. Radi se o RNA virusu iz porodice *Picornaviridae.* Stanice inficira vezanjem na transmembranski glikoproteinski receptor CD155 (poliovirusni receptor, PVR) koji se nalazi na staničnoj površini. Interakcija poliovirusa i CD155 olakšava ireverzibilnu konformacijsku promjenu virusne čestice potrebne za ulazak virusa endocitozom. Odmah nakon internalizacije čestice, oslobađa se virusna RNA i dolazi do inhibicije sinteze staničnih proteina u korist proizvodnje virusnih proteina (slika 32).



Slika 32. Infekcija stanice poliovirusom *(preuzeto i prerađeno iz 73).*

Funkcija CD155 je uspostavljanje međustaničnih spojeva između epitelnih stanica. Poliovirus je najprije testiran na tumorima neuroektodermalnog porijekla, no nađeno je da stanice mnogih malignih tumora kostiju i mekih tkiva imaju navedeni receptor. Stoga su i stanice osteosarkoma *in vitro* tretirane živim atenuiranim poliovirusom koji je kroz aktivaciju kaspaznog kaskadnog sustava, proteaza koje igraju ključnu ulogu u procesu apoptoze, doveo do njihove apoptoze (42,74).

Virus bolesti Newcastle je RNA virus koji uzokuje bolesti ptica, ali se može prenijeti i na ljude kod kojih uzrokuje upalu očne spojnice i simptome slične prehladi. Spada u porodicu *Paramyxoviridae.* Interes za protutumorsku primjenu se temelji na opažanjima da virus selektivno inficira tumorske stanice. Atenuirani virus PV701 primijenjen je na kulturama stanica bolesnika s osteosarkomom te je došlo do selektivnog nakupljanja u tumorskim stanicama, ali ne i u normalnim fibroblastima, vjerojatno zbog defekta u interferonskom signalnom putu tumora (42). Prema zadnjim podacima, studija „New Castle Disease Virus (NDV) in Glioblastoma Multiforme (GBM), Sarcoma and Neuroblastoma“ je označena kao povučena (*engl.* withdrawn).

3.2.7 Rizici primjene onkolitičke viroterapije

Virusna se infekcija odvija kroz nekoliko glavnih stadija. Tijekom prvog stadija virusi se ubrzano umnažaju i šire uzrokujući bolest, nakon čega slijedi drugi, klinički latentan period, u kojem imunosni sustav organizma stavlja virusnu infekciju pod kontrolu. Međutim, virus se može i kasnije nastaviti umnažati i dovesti do klinički manifestne bolesti što se svrstava pod treći stadij. Virusi čiji se genom ne ugrađuje u genom domaćima ili koji se umnažaju u citoplazmi ne nose rizik izazivanja trećeg stadija, niti pojave mutacija na genomu domaćina. Razvoj novih virusa nosi rizik stvaranja neželjenih i teško predvidivih mutacija odnosno stvaranja novih bolesti. Do sada testirani onkolitički virusi imaju dobre sigurnosne profile ako ih promatramo u kontekstu pretkliničkih modela koji su najčešće imunodeficijentni organizmi. Kad je riječ o imunokompetentnom organizmu, provode se opsežnije studije o sigurnosti, toksičnosti i učinkovitosti terapijskih virusa u liječenju malignih tumora (44).

4. RASPRAVA

Nakon što su se početkom 1900-tih godina pojavili prvi izvještaji o regresiji tumora nakon virusne infekcije organizma, započeo je razvoj viroterapije koji je intenzivnije nastavljen razvojem molekularne biologije. Učinak divljih tipova i genetički promijenjenih virusa ispituje se na kulturama tkiva, životinjskim modelima i ljudima. Zamijećeno je da je učinak viroterapije kod ljudi skromniji u odnosu na učinke postignute na prva dva spomenuta modela, stoga su sadašnja istraživanja usmjerena ka razumijevanju mehanizama kojima virusi uništavaju tumorske stanice, prevladavanju zapreka uspješne dostave virusa u tumorske stanice te uloge imunosnog sustava u onkolizi. Čitav niz *in vitro* istraživanja se može naći u literaturi, u kojima se koriste modificirani virusi usmjereni na različite genske i proteinske mete stanica osteosarkoma. Tim istraživanjima predstoje dodatna istraživanja da bi se došlo do opravdanosti provođenja pretkliničkih i kliničkih studija.

U tijeku je veliki broj kliničkih studija u kojima se koriste onkolitički virusi (www.clinicaltrials.gov) i koje je vrijedno pratiti kako od strane istraživača, tako i kliničkih onkologa. Manji broj tih studija se odnosi na osteosarkome (75,76), no i one studije koje imaju obećavajuće rezultate u liječenju drugih malignih tumora mogu biti dobro polazište za razmatranje u kontekstu potencijalnog liječenja osteosarkoma. Neke studije koje se odnose na djelovanje rekombinantnih virusa na osteosarkome su završene i spomenute u prethodnom poglavlju ovog rada (HSV1716, Reolysin).

Obzirom da je virus VCN-01 pokazao snažan učinak protiv osteosarkoma *in vitro* i *in vivo* te se pokazao sigurnim u smislu toksičnosti, u tijeku je studija „Phase I Dose Escalation Study of Intravenous VCN-01 With or Without Gemcitabine and Abraxane® in Patients With Advanced Solid Tumors“ (75). Svrha ove studije je određivanje sigurnosti i podnošljivosti VCN-01, bilo da se primjenjuje samostalno ili u kombinaciji s Abraxane® / Gemcitabinom, te određvanje preporučene doze VCN-01.

Druga studija koja se provodi je „iC9-GD2-CAR-VZV-CTLs/Refractory or Metastatic GD2-positive Sarcoma and Neuroblastoma (VEGAS)“ (76), a koja predstavlja primjer korištenja virusa u svrhu stimulacije imunosnog sustava. Istraživači su u T-stanice unijeli novi

gen, zbog kojega će one prepoznati i ubiti stanice sarkoma i neuroblastoma. Novi gen kodira CAR (*engl.* chimeric antigen receptor), radi se o protutijelu 14g2a koje prepoznaje protein GD2, a koji se nalazi na stanicama sarkoma i neuroblastoma (GD2-CAR). Osim njega, unijeli su i dijelove gena CD28 i OX40 koji mogu stimulirati T-stanice kako bi živjele dulje. Istraživači su otkrili da stanice CAR-T mogu ubiti dio tumora, ali se ne zadržavaju dugo u tijelu pa se tumor naposljetku vrati. T-stanice koje prepoznaju varičela zoster virus (VZV), ostaju u krvotoku dugi niz godina, posebno ako su stimulirane ili pojačane VZV cjepivom. Istraživači su stoga unijeli gen GD2-CAR u T-stanice koje prepoznaju VZV. Ove stanice se nazivaju iC9-GD2-CAR-VZV-specifične T stanice, ali se za jednostavnost nazivaju GD2-T stanice. Svrha ove studije je pronaći najveću sigurnu dozu stanica GD2-T (također nazvane iC9-GD2-CAR-VZV-CTL) u kombinaciji s cjepivom protiv VZV (*Herpesviridae*) i kemoterapijom. Osim toga, registrirat će se i nuspojave ovog liječenja i vidjeti može li ova terapija pomoći pacijentima s uznapredovalom osteosarkomom i neuroblastomom.

Osteosarkom je vrlo izazovan tumor za primjenu onkolitičke viroterapije zbog svoje građe i genetičke složenosti. Suočavanje s tim izazovom zahtijeva definiranje problema i osmišljavanje strategije za suočavanje sa svakim pojedinim problemom.

Prvi problem je dostava terapijskih virusa u tumor. Dostava može biti lokalna ili sistemska. Lokalna ili intratumorska dostava bi osigurala da virus uđe u sami tumor čime bi se dobrim dijelom smanjila mogućnost djelovanja neutralizirajućih protutijela organizma na terapijske viruse. Sistemsko unošenje virusa u organizam bilo bi usmjereno prema primarnom tumoru, ali još više prema metastatskim stanicama te tumorskoj masi koja je teško dostupna za lokalno unošenje.

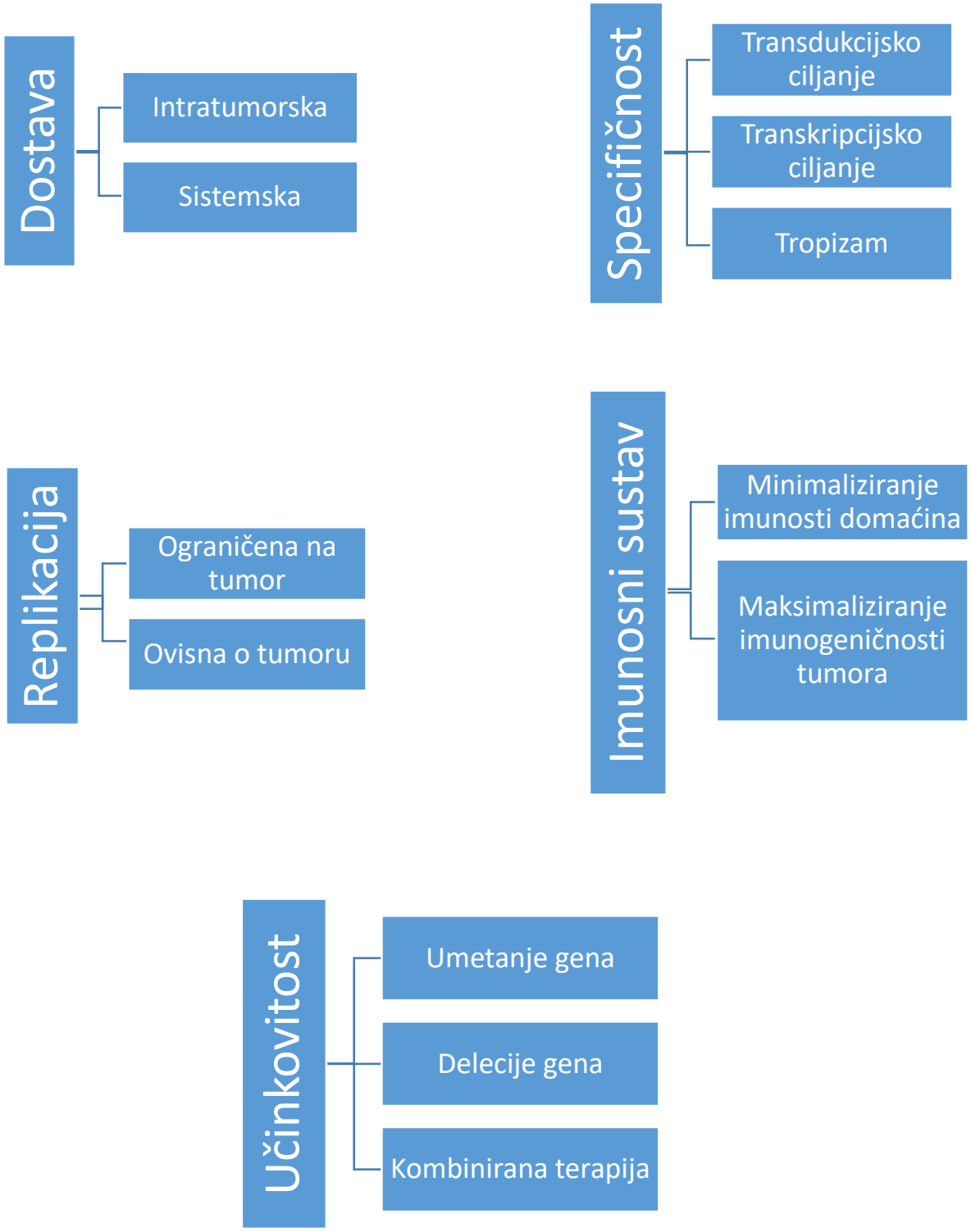
Drugi problem je selektivna dostava terapijskih virusa u tumorske stanice. Ovaj problem bi se mogao rješavati transdukcijskim ciljanjem stanica što podrazumijeva razvoj strategije ulaska virusa u ciljnu stanicu, primjerice preko primjene protutijela ili molekularnim

inženjeringom promijenjenih površinskih proteina, da bi virus inficirao samo one stanice koje eksprimiraju specifične receptore. Rješenje bi moglo biti i u transkripcijskom ciljanju, što znači da bi se ključni virusni geni stavili pod kontrolu tumor specifičnih promotora. I napokon, rješenje bi se moglo potražiti u virusnom tropizmu. Naime, da bi se virus replicirao u stanici potrebne su za virus brojne povoljne interakcije sa stanicom. U kontekstu selektivne dostave virusa, tropizam bi se iskoristio kroz korištenje aberantnih signalnih puteva u tumorskim stanicama. Jasno, iskoristive bi bile i kombinacije navedenih strategija.

Treći problem je replikacija virusa u tumorskom tkivu. Ona bi trebala biti ograničena samo na tumor, pri čemu se može koristiti strategija proizvodnje virusa koji se ne mogu umnažati u normalnim stanicama, kao npr. već spomenuti CRAD ili strategija proizvodnje takvih virusa čije umnažanje ovisi o staničnoj diobi.

Četvrti problem je imunosni odgovor organizma na terapijske viruse. Taj bi odgovor, koji uništava terapijske viruse, trebalo izbjeći, primjerice pakiranjem virusnih čestica u polimere ili u neke nosače koje neutralizirajuća protutijela domaćina ne prepoznaju ili pak suprimiranjem imunosnog odgovora domaćina (primjerice kemoterapijom, kortikosteroidima). Potonje bi u kliničkoj primjeni potencijalno izazvalo niz drugih problema. Imunosni odgovor domaćina bi se također mogao iskoristiti protiv tumora induciranjem imunogenosti tumorskih stanica kroz procesiranje i prezentaciju viralnih protutijela na staničnoj površini posredstvom MHC-I proteina (*engl*. major histocompatibility), čime bi se pojačao virusima-posredovani protutumorski imunosni odgovor domaćina.

Peti problem je postizanje učinkovite onkolize tumorskih stanica. Taj bi se problem mogao rješavati kroz promjenu viralnog genoma čime bi se pojačao učinak kemoterapije te kroz kombinaciju terapija (primjerice protutumorskih lijekova, radioterapije, imunomodulatornih lijekova) čime bi se uništilo što više tumorskih stanica i smanjila mogućnost razvoja njihove rezistencije na protutumorske lijekove (slika 33) (42,77).



Slika 33. Strategije za rješavanje izazova onkolitičke viroterapije *(preuzeto i prerađeno iz 42).*

Specifični izazovi viroterapije osteosarkoma vidljivi su ponajprije kroz izraženu razliku u uspješnosti pretkliničkih studija u odnosu na kliničke. Idealan pretklinički model trebao bi biti prije svega imunokompetentan organizam, dok je većina pretkliničkih studija provedena na imunodeficijentnim miševima. Osim toga, najčešći uzrok smrti uslijed osteosarkoma su plućne metastaze stoga bi tijek bolesti u pretkliničkim modelima morao biti sličan onome kod ljudi. Za sada se pokazalo da psi kao model najbolje zrcale odnos ljudskog organizma spram bolesti, no za sada nema studije o onkolitičkoj viroterapiji na psima (78,79).

Što se tiče prodora virusnih čestica kroz gusti osteoid, na pretkliničkim modelima učinkovitim se pokazala dostava nanočestica koji sadrže porfirin putem mezenhimalnih matičnih stanica, u stanice osteosarkoma čiji se učinak temelji na fotoinduciranoj staničnoj smrti. U slične svrhe su poslužile i kolagenaza i hijaluronidaza premda se postavlja pitanje kako bi se one primijenile u ljudskom organizmu i koliko bi doista imale učinka u smislu omogućavanja ulaska virusa u svaku tumorsku stanicu (80,81).

Većina solidnih tumora, pa tako i osteosarkom vjerojatno se sastoji od periferne, dobro vaskularizirane zone u kojoj se umnažaju tumorske stanice i središnje, pretežno nekrotične zone sa slabom krvožilnom mrežom. Razvijene su molekule (Th-3012, PR-104) koje za cilj imaju upravo stanice u hipoksičnim dijelovima, *engl.* hypoxia-activated prodrugs (HAPs) koje bi u kombinaciji s drugim terapijskim modalitetima mogle pomoći u značajnijem smanjenju tumorske mase (82).

Uklanjanje tumorskih matičnih stanica odgovornih za obnavljanje tumorske mase, metastaziranje i dediferencijaciju tumora te rezistenciju na protutumorske lijekove predstavlja dodatni izazov. Navedene stanice pokazuju površinske biljege CD133, CD117 i Stro-1 te ALDH (aldehid dehidrogenaza), a u staničnim kulturama formiraju sfere (83,84). Za sada nema studija o onkolitičkom djelovanju virusa na navedene stanice u osteosarkomima, no na nekim drugim tumorima koji se obično pojavljuju kod djece (rabdomiosarkom, neuroblastom) CD133 pozitivne i CD133 negativne stanice pokazale su se jednako osjetljivima na djelovanje onkolitičkih HSV-1 virusa.

Genska složenost tumora navodi na potrebu određivanja specifičnih tumorskih varijacija kod svakog bolesnika. Farmakogenomika podrazumijeva primjenu genske tehnologije u određivanju bioloških biljega vezanih za učinkovitost djelovanja lijekova i njihove potencijalne toksičnosti s ciljem optimalnog odabira lijekova i terapijskih pristupa za svakog pacijenta ponaosob. Saznanja o genskom profilu osteosarkoma, biološkim biljezima koje izražavaju tumorske stanice, odnosno genskim polimorfizmima koji se povezuju s metaboliziranjem protutumorskih lijekova i popravku tumorske DNA, mogu se upotrijebiti i u svrhu stvaranja individualizirane onkolitičke viroterapije, posebno kod bolesnika kod kojih se drugi modaliteti liječenja pokažu neuspješnima. Tablica 3. za ilustraciju pokazuje gene odnosno njihove produkte i polimorfizme koji su povezani s lošijim ishodima bolesti. To je samo spektar osteosarkomskih genskih varijacija koje se detaljnije mogu istražiti u genskim podatkovnim bazama o osteosarkomu s ciljem eventualnog usmjerenja dubljeg istraživanja onkolitičke viroterapije ka nekom od gena (85,86,87,88).

Tablica 3. Primjer gena odnosno njihovih produkata i polimorfizama koji su povezani s lošijim ishodima bolesti *(preuzeto i prerađeno iz 87).*

Geni/njihovi produkti povezani s lošijim ishodom kod bolesnika s osteosarkomom	**Uloga gena/njihovih produkata u pospješenju tumorskog rasta**
ABCB1 (*engl.* ATP-binding cassette, subfamily B)	Otpornost na doksorubicin
SLC19A1/RFC1 (*engl.* solute carrier family 19 member 1/reduced folate carrier 1)	Otpornost na metotreksat
HER 2 (*engl*. epidermal growth factor receptor)	Pojačana ekspresija se povezuje s pospješenjem rasta tumora i otpornosti na protutumorske lijekove
PI3K/mTOR (*engl*.phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin)	Pojačana ekspresija se povezuje s lošijom prognozom zbog pospješenja rasta tumora
Polimorfizam rs1053129 DHFR (dihidrofolat-reduktaza)	Češći razvoj metastaza
Polimorfizam rs2236225 MTHFD1(metilentetrahidofolat-reduktaza)	Slab odgovor na metotreksat
Polimorfizam rs 1695 GSTP1 (glutation-S-transferaza-Pi 1)	Slab odgovor, leukopenija i kardiotoksičnost pri primjeni doksorubicina i cisplatine
GSTT1 (glutation-S-transferaza-Theta 1)	Veća toksičnost i slabije preživljenje pri primjeni doksorubicina i cisplatine
Polimorfizam rs 1805794+rs709816+1063054 NBN (nibrin) CGA haplotip	Slabije preživljenje pri primjeni doksorubicina, cisplatine i ifosfamida

Potencijalna primjena virusa u kirurškom liječenju osteosarkoma sastojala bi se u obilježavanju tumorskih stanica bojom ili kemijskom tvari koju bi virusi unosili u stanice, s ciljem skretanja pažnje operatera na njihovo postojanje i ciljano uklanjanje nekom od operativnih metoda. Vizualizacija može biti golim okom ili uz pomoć operacijskog mikroskopa, a uz to bi bilo moguće uključiti i zvučnu signalizaciju nakupine stanica, koju obzirom na sadržani kemijski agens unešen virusom detektira prikladan uređaj. Naime, jedan od problema onkološke kirurgije jest nemogućnost vizualiziranja ostatnih nakupina tumorskih stanica, zbog čega one postaju izvor zanavljanja tumorske mase (89).

Nedavni razvoj i poboljšanje neinvazivnog snimanja pomoću gena NIS i njegovog proteinskog produkta osigurava tehnologiju za praćenje farmakokinetike i terapije genima, stanicama i virusima *in vivo*. NIS je tiroidni natrij jodid kotransporter koji koncentrira radiojod i srodne radioaktivne anione (kao što je Tc-99 m pertehnetat i 18F-tetrafluoroborat) u NIS-eksprimirajućim stanicama. NIS se klinički koristi za dijagnosticiranje poremećaja štitnjače putem snimanja gama kamerom. Za snimanje i kvantificiranje preuzimanja radioaktivnog obilježivača posredstvom NIS-a koriste se SPECT (*engl.* single-photon emission computed tomography) i PET koji su superiorniji u odnosu modalitete snimanja temeljene na fluorescenciji ili bioluminiscenciji. NIS je pogodan za *in vivo* praćenje normalnih fizioloških procesa regeneracije te patoloških procesa kao što su fibrozacija, upala, onkogeneza i metastaziranje (90). Navedeno praćenje NIS-om uspješno je korišteno kod testiranja virusa ospica (Edmonston) na stanice osteosarkoma kod miševa (91).

Napokon, osteosarkom je rijedak tumor koji u primarnom obliku uglavnom pogađa mlađu populaciju. To znači ograničen broj bolesnika koji sudjeluju u studijama, a varijabilnost tumora dodatno ograničava mogućnost dizajniranja studija koje se oslanjaju na velike brojeve. Stoga dizajn studija, analiza i tumačenje rezultata moraju biti prilagođeni ovim činjenicama.

Dodatno poglavlje se otvara u etičnosti uključivanja malodobnih osoba u klinička istraživanja. Dobivanje dozvole etičkih povjerenstava općenito je teže kad je riječ o djeci i adolescentima jer su oni ranjiva skupina koju je potrebno maksimalno zaštititi. Obzirom da se zapravo radi o vrsti genske terapije, svako manipuliranje genskim materijalom podvrgava se

još rigoroznijem odabiru ispitanika. Ipak, potrebno je i ovdje pronaći mudru ravnotežu jer organizam mladih osoba koje rastu ima svoje posebitosti te kao takav ne može u svom funkcioniranju uvijek biti usporediv s organizmom odraslih osoba, tj. primjena postulata liječenja odraslih osoba se ne može u cijelosti preslikati na djecu. Stoga se uključivanje malodobnih osoba u istraživanja čak i ovakvog tipa ne može *a priori* odbaciti, bez pomnog razmatranja okolnosti te potencijalne štete i koristi za svakog ispitanika ponaosob.

5. ZAKLJUČAK

Nemogućnost izliječenja svih osoba oboljelih od osteosarkoma visokog stupnja malignosti dosadašnjim terapijskim protokolima zahtijeva razvoj novih terapijskih pristupa u rješavanju ove bolesti.

Mehanizam djelovanja onkolitičkih virusa razlikuje se od djelovanja protutumorskih lijekova čime onkolitička viroterapija pruža nove mogućnosti u liječenju osoba oboljelih od osteosarkoma visokog stupnja malignosti.

Pretkliničke i kliničke studije pokazale su znanstvenu i kliničku utemeljenost primjene onkolitičke viroterapije u svrhu poboljšanja ishoda kod osoba oboljelih od osteosarkoma visokog stupnja malignosti.

Onkolitička viroterapija bi se mogla koristiti u kombinaciji s drugim terapijskim modalitetima u liječenju osteosarkoma visokog stupnja malignosti radi postizanja boljih ishoda liječenja, uzimajući u obzir individualne značajke bolesnika i specifičnih genskih varijacija tumora.

Opravdano je nastaviti istraživanja s ciljem poboljšanja učinkovitosti i sigurnosti primjene onkolitičke viroterapije kod osoba oboljelih od osteosarkoma visokog stupnja malignosti.

6. LITERATURA

1. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robins Basic Pathology. Eslevier; 2017, str.189-243.
2. Mesoderm.
Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/Mesoderm. Accessed June 6, 2019.
3. Introduction to ectoderm.
Available at:
https://jb004.k12.sd.us/MY%20WEBSITE%20INFO/BIOLOGY%202/ANIMAL%20KINGDOM/Intro%20to%20Germ%20Layers.htm. Accessed June 6, 2019.
4. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn P, Mertens F. WHO Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone, IARC press; 2013, str. 243-49.
5. Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone, WHO Classification of Tumours. IARC press; 2002, str. 227-32.
6. Rothmund Thomson syndrome.
Available at: https://ghr.nlm.nih.gov/condition/rothmund-thomson-syndrome. Accessed June 24, 2019.
7. Correa H. Li-Fraumeni Syndrome. J Pediatr Genet. 2016;5(2):84-88.
8. Hameed M, Mandelker D. Tumor Syndromes Predisposing to Osteosarcoma. Adv Anat Pathol. 2018;25(4):217-22.
9. Bcl-2. *Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/Bcl-2. Accessed June 24, 2019.*
10. p53. *Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/P53. Accessed June 24, 2019.*
11. M. Pećina i sur. Ortopedija. Naklada Ljevak; 2003, str.140-59.
12. Bullough PG. Orthopaedic Pathology. Mosby Elseiver; 2010, str. 376-88.
13. Doyle LA. Sarcoma classification: An update based on the 2013 World Health Organization Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. Cancer 2014;120: 1763-74.
14. Medscape. Osteosarcoma Clinical Presentation.
Available at: https://emedicine.medscape.com/article/1256857-clinical. Accessed June 6, 2019.
15. Orthoinfo. Osteosarcoma.
Available at: https://orthoinfo.aaos.org/en/diseases--conditions/osteosarcoma/. Accessed June 6, 2019.
16. Humpath.com. Human pathology. Humeral osteosarcoma.
Available at: http://www.humpath.com/spip.php?article10025. Accessed June 6, 2019.
17. Oncolex. Histology of osteosarcoma.
Available at: http://oncolex.org/Sarcoma/Diagnoses/Bone/Background/Histology. Accessed June 6, 2019.
18. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn P, Mertens F. WHO Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. IARC press; 2013, str.275-95.
19. Paget's disease.
Available at: https://slideplayer.com/slide/6617491/. Accessed June 6, 2019.
20. Radiopaedia. Teleangiectatic osteosarcoma.
Available at: https://radiopaedia.org/cases/telangiectatic-osteosarcoma-3. Accessed June 6, 2019.
21. Orthopaedic and Pediatric Pathology.
Available at: http://www.pedorthpath.com/contact.html#anchor_28. Accessed June 6, 2019.
22. Musculosceletal Key. High-Grade Osteosarcoma of the Surface.
Available at:
https://musculoskeletalkey.com/high-grade-osteosarcoma-of-the-surface/. Accessed June 6, 2019.

23. Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone, WHO Classification of Tumours, IARC press; 2002, str 284.
24. Anticancer research. Extrasceletal osteosarcoma with partial spontaneous regression. *Available at: http://ar.iiarjournals.org/content/29/12/5197/F1.expansion.html. Accessed June 6, 2019.*
25. Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone, WHO Classification of Tumours, IARC press 2002; str 182.
26. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn P, Mertens F. WHO Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone, IARC press 2013; str.161-62.
27. Anninga JK i sur. Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand? Eur.J.Cancer 2011; 47:2431-45.
28. Cell cycle. *Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_cycle. Accessed June 7,2019.*
29. Gompertz model. *Available at: http://www.what-iscancer.com/papers/newmedicine/gompertz.htm. Accessed June 7,2019.*
30. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. Medicinska naklada; 2011, str. 935-62.
31. Humpath.com. Human pathology. Pulmonary osteosarcoma metastasis. *Available at: http://www.humpath.com/spip.php?article11271. Accessed June 7, 2019.*
32. Whelan JS i sur. EURAMOS-1, an international randomised study for osteosarcoma: results from pre-randomisation treatment. Ann Oncol 2015; 26:407-14.
33. EURAMOS-1. *Available at: http://www.euramos.org/media/1258/euramos1_protocol.pdf. Accessed June 7, 2019.*
34. Gene therapy. *Available at: https://www.semanticscholar.org/paper/Gene-Therapy. ThorneTakeya/3da8405233a0828a72b74ba790a6f59add3153fd/figure/0. Accesed June 7, 2019.*
35. Gonçalves GAR, Paiva RMA. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. Einstein. 2017;15(3):369-75.
36. Lukashev AN, Zamyatnin AA Jr. Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives. Biochemistry (Mosc). 2016;81(7):700-8.
37. Stellberger T i sur. Strategies and methods for the detection and identification of viral vectors. Virus Genes. 2017; 53(5):749-57.
38. Zang W I sur. An Engineered Virus Library as a Resource for the Spectrum-wide Exploration of Virus and Vector Diversity. Cell Rep. 2017; 19(8):1698-709.
39. Bertin S, Neves S, Pedroso de Lima M, Pierrefite-Carle V. Naked DNA and lipoplexes applications in cancer gene therapy. Bull Cancer 2007; 94(3):243-52.
40. Pavelić J. Genetsko liječenje u pedijatriji. Paediatr Croat 2004; 48:169-74.
41. Kelly E, Russel SJ. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. Mol Ther 2007; 15:651-59.
42. Hingorani P, Sampson V, Lettieri C, Kolib EA. Oncolytic viruses for potential osteosarcoma therapy. Adv Exp Med Biol 2014; 804:259-83.
43. History of Adenoviridae. *Available at: https://web.stanford.edu/group/virus/adeno/2004takahashi/webpage/second.html. Accessed June 7,2019.*
44. Garcia-Moure M, Martinez-Vélez N, Patiño-García A, Alonso MA. Oncolytic adenoviruses as a therapeutic approach for osteosarcoma: A new hope. J Bone Oncology 2017;9:41–47.

45. Majhen D i sur. The disulfide bond of an RGD4C motif inserted within the Hi loop of the adenovirus type 5 fiber protein is critical for retargeting to αv -integrins. J Gene Med. 2012;14(12):788-97.
46. Zhang M i sur. Construction of a novel oncolytic adenoviral vector and its biological characteristics. Oncology reports 2013; 29:798-804.
47. Opyrhcal M, Aderca I, Galanis E. Phase I clinical trial of locoregional administration of the oncolytic adenovirus ONYX-015 in combination with mitomycin-C, doxorubicin, and cisplatin chemotherapy in patients with advanced sarcomas. Methods Mol Biol 2009; 542:705-17.
48. Yamamoto M, Curiel DT. Current issues and future directions of oncolytic adenoviruses. Mol Ther 2010; 18:243-50.
49. Zheng X i sur. Ultrasound-guided intratumoral administration of collagenase-2 improved liposome drug accumulation in solid tumor xenografts. Cancer Chemother Pharmacol 2011; 67:173-82.
50. Martínez-Vélez N i sur. The Oncolytic Adenovirus VCN-01 as Therapeutic Approach Against Pediatric Osteosarcoma. Clin Cancer Res. 2016;22(9):2217-25.
51. Dentalnotebook. Human Herpesvirus 1.
Available at: https://www.dentalnotebook.com/human-herpesvirus-1/. Accessed June 7, 2019.
52. Megison ML i sur. Preclinical Evaluation of Engineered Oncolytic Herpes Simplex Virus for the Treatment of Pediatric Solid Tumors. PLOS one 2014; 1(9)1-13.
53. Liu BL i sur. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. Gene Ther 2003; 10:292-303.
54. HSV1716 in Patients With Non-Central Nervous System (Non-CNS) Solid Tumors. *Available at: www.clinicaltrials.gov. Accessed June 25, 2019.*
55. Liu TC, Kirn D. Viruses with deletions in antiapoptotic genes as potential oncolytic agents. Oncogene 2005; 6069-79.
56. Eissa i sur. The Current Status and Future Prospects Of Oncolytic Viruses in Clinical Trials against Melanoma, Glioma, Pancreatic and Breast Cancers.
Cancers (Basel). 2018;10(10):356.
57. Vaccinia Virus Particles. *Available at: support@art.com. Accessed June 7,2019.*
58. He S i sur. Efective oncolytic vaccinia therapy for human sarcomas. J Surg Res 2012;175:53-60.
59. Safety Study of Recombinant Vaccinia Virus to Treat Refractory Solid Tumors in Pediatric Patients. *Available at: www.clinicaltrials.gov. Accessed June 25, 2019.*
60. Rotavirus.
Available at:
https://www.researchgate.net/figure/Schematic-depiction-of-the-structure-of-mature-rotavirus-particle-T-LP-The-three_fig1_40732010. Accessed June7,2019.
61. Hingorani P i sur. Systemic administration of reovirus (Reolysin) inhibits growth of human sarcoma xenografts. Cancer 2011; 117:1764-74.
62. Safety and Efficacy Study of REOLYSIN® in the Treatment of Bone and Soft Tissue Sarcomas Metastatic to the Lung. *Available at: www.clinicaltrials.gov. Accessed June 25, 2019.*
63. Illet EJ i sur. Internalization of oncolytic reovirus by human dendritic cell carriers protects the virus from neutralization. Clin Cancer Res 2011; 17:2767-76.
64. Mita AC i sur. A phase II study of intravenois (IV) wild-type reovirus (Reolysisn) in the tretment of patients with bone and soft tissue sarcomas metastatic to the lung. ASCO meeting abstracts. J Clin Oncol 2009; 27:10524.
65. Semliki Forest Virus*. Available at: http://resizeme.club/imageresizer-174_219174.html. Accessed June 7, 2019.*
66. Semliki Forest Virus*. Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/Semliki_Forest_virus. Accessed June 7, 2019.*

67. Ketola A i sur. Oncolytic Semliki forest virus vector as a novel candidate against unresectable osteosarcoma. Cancer Res 2008; 68:8342-50.
68. Replication of vesicular stomatitis virus a model for Mononegavirales. *Available at: https://www.americorpshealth.biz/immune-response/replication-of-vesicular-stomatitis-virus-a-model-for-mononegavirales.html. Accessed June 7,2019.*
69. Kubo T i sur. Oncolytic vesicelar stomatitis virus admninistrated by isolated limb perfusion suppresses osteosarcoma growth. J Orthop Res 2011; 29:795-800.
70. Paglino JC, van den Pol AN. Vesicular stomatitis virus has extensive oncolytic activity against human sarcomas: rare resistance is overcome by blocking interferon pathways. J Virol 2011; 85:9345-58.
71. Morbilivirus. *Available at: https://www.semanticscholar.org/paper/Morbillivirus-Receptors-and-Tropism%3A-Multiple-for-Sato-Yoneda/c28ae565308bfabbd784a23fa065a59a49d8cfc3/figure/0. Accessed June 7,2019.*
72. Berchtold S i sur. Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis. J Virol 2013; 87:3484-501.
73. Sience Direct. Poliovirus. *Available at: https://www.sciencedirect.com/topics/nursing-and-health-professions/protein-vp3. Accessed June 7, 2019.*
74. Atsumi S i sur. Oncolytic virotherapy for human bone and soft tissue sarcomas using live attenuated poliovirus. Int J Oncol 2012;41:893-902.
75. Phase I Dose Escalation Study of Intravenous VCN-01 With or Without Gemcitabine and Abraxane® in Patients With Advanced Solid Tumors. *Available at: www.clinicaltrials.gov. Accessed June 26, 2019.*
76. iC9-GD2-CAR-VZV-CTLs/Refractory or Metastatic GD2-positive Sarcoma and Neuroblastoma (VEGAS). *Available at: www.clinicaltrials.gov. Accessed June 25, 2019.*
77. Adair RA i sur. Cell carriage, delivery, and selective replication of an oncolytic virus in tumor in patents. Sci Transl Med 2012; 4:138-77.
78. Fenger JM, London CA, Kisseberth WC. Canine osteosarcoma: a naturally occurring disease to inform pediatric oncology. ILAR J. 2014; 55(1):69-85.
79. Simpson S i sur. Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics. Acta Vet Scand. 2017; 59(1):71.
80. Qiao B, Shui W, Cai L, Guo S, Jiang D. Human mesenchymal stem cells as delivery of osteoprotegerin gene: homing and therapeutic effect for osteosarcoma. Drug Des Devel Ther. 2015;9:969-76.
81. Duchi S i sur. Mesenchymal stem cells as delivery vehicle of porphyrin loaded nanoparticles: effective photoinduced in vitro killing of osteosarcoma. J Control Release 2013; 168:225-37.
82. Ganjoo KN i sur. A phase I study of the safety and pharmacokinetics of the hypoxia-activated prodrug TH-302 in combination with doxorubicin in patients with advanced soft tissue sarcoma. Oncology 2011; 80:50-56.
83. Tirino V i sur. Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo. FASEB J 2011; 25:2022-30.
84. Adhikari i sur. CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor-initiating cells associated with metastasis and drug resistance. Cancer Res 2010; 70:4602-12.
85. Li H, He Y, Hao P, Liu P. Identification of characteristic gene modules of osteosarcoma using bioinformatics analysis indicates the possible molecular pathogenesis. Mol Med Rep. 2017;15(4):2113-19.
86. Vos HI, Coenen MJH, Guchelaar HJ, te Loo DMWM. The role of pharmacogenetics in the treatment of osteosarcoma. Drug Discovery Today 2016; 21:1775-8

87. Serra M, Hattinger CM. The pharmacogenomics of osteosarcoma. The Pharmacogenomics Journal 2017;17:11-20.
88. Kager L, Diakos C. Can pharmacogenomics help to improve therapy in patients with high-grade osteosarcoma? Expert Opinion on drug Metabolism&Toxicology 2015;11:7,1025-28.
89. Yano S. Eradication of osteosarcoma by fluorescence-guided surgery with tumor labeling by a killer-reporter adenovirus. J Orthop Res. 2016;34(5):836-44.
90. Brunton B i sur. New transgenic NIS reporter rats for longitudinal tracking of fibrogenesis by high-resolution imaging. Sci Rep. 2018;8(1):14209.
91. Musibay ED i sur. Measles Edmonston Vaccine Strain Derivatives have Potent Oncolytic Activity against Osteosarcoma. Cancer Gene Ther. 2015; 21(11):483–90.
92. https://www.intechopen.com/books/targets-in-gene-therapy/suicide-gene-therapy-by-herpes-simplex-virus-1-thymidine-kinase-hsv-tk-

POPIS SKRAĆENICA

ABCB1 - *engl.* ATP-binding cassette, subfamily B, skupina staničnih transportnih proteina.

Ad5 - Adenovirus tip 5.

AdV - Adenovirus.

AJCC - *engl.* American Joint Committee on Cancer, američko udruženje za klasificiranje i promociju liječenja malignih bolesti temeljeno na dokazima, koje djeluje u suradnji s multidisciplinarnim organizacijama posvećenim proučavanju malignih bolesti i poboljšanju skrbi za onkološke bolesnike.

ALDH - aldehid dehidrogenaza, enzim koji sudjeluje u brojnim metaboličkim putevima.

Bcl-2 - *engl.* B-cell lymphoma je protein kodiran genom BCL2, spada u skupinu regulatornih proteina koji reguliraju apoptozu djelujući bilo inhibirajući bilo potičući apoptozu. BCL2 gen može biti mutiran i djelovati kao onkogen.

BMP - *engl*. bone morfogenic protein, koštano-morfogenetički proteini, skupina proteina koji predstavljaju čimbenike rasta i diferencijacije s osteoinduktivnim svojstvom.

CAR - *engl.* coxsackie-adenovirus receptor, transmembranski receptor za coxackie i adenovirus koji se može naći na više vrsta somatskih stanica.

CAR - *engl.* chimeric antigen receptor, kimerični antigenski receptor.

CCND2 - gen važan za sintezu proteina ciklin D2. Protein ciklin D2 je važan u regulaciji G1-S prijelaza staničnog ciklusa i ključan za upravljanje brzine rasta i diobe stanica. Reguliran je signalizacijskim putem PI3K-AKT-mTOR. Ova signalizacija utječe na brojne kritične stanične funkcije, uključujući stvaranje novih proteina, staničnu proliferaciju i opstanak stanica. PI3K-AKT-mTOR put je važan za normalan razvoj mnogih dijelova tijela, uključujući mozak.

CDK4 - *engl*. Cyclin Dependent Kinase 4, kinaza 4 ovisna o ciklinu je katalitička podjedinica kompleksa protein kinaze koja je važna za napredovanje staničnog ciklusa u G1 fazi. Pokazalo se da je ova kinaza odgovorna za fosforilaciju genskog produkta retinoblastoma (Rb). Fosforilacija Rb1 omogućava disocijaciju transkripcijskog čimbenika E2F iz Rb / E2F kompleksa i naknadnu transkripciju E2F ciljnih gena koji su odgovorni za napredovanje kroz G1 fazu.

CDKN2A - *engl.* cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, inhibitor 2A kinaze ovisne o ciklinu gen je koji se kod ljudi nalazi u kromosomu 9, eksprimiran u mnogim stanicama. Gen kodira dva proteina, uključujući člana obitelji INK4 p16 (ili p16INK4a) i p14arf. Oboje djeluju kao supresori tumora regulirajući stanični ciklus. p16 inhibira kinaze 4 i 6 ovisne o ciklinu (CDK4 i CDK6) i na taj način aktivira retinoblastomsku skupinu proteina, koja blokira prijelaz G1-S faze. p14ARF aktivira supresor tumora p53. Somatske mutacije CDKN2A uobičajene su kod većine karcinoma čovjeka, a procjene su da je CDKN2A drugi najčešće inaktivirani gen u karcinomu nakon p53.

CD99 - *engl.* cluster of differentiation 99 je transmembranski protein kodiran genom CD99 i eksprimiran na svim leukocitima, ali najviše na timocitima. Nalazi se na staničnoj površini Ewingovog sarkoma. Izraženiji je u zloćudnim gliomima nego u mozgu, a takva prekomjerna

ekspresija rezultira većom invazivnošću i nižim stopama preživljavanja. Protutijela na CD99 koriste se u dijagnostičkoj imunohistokemiji da bi se razlikovao Ewingov sarkom od ostalih tumora sličnog histološkog izgleda.

CD117 - *engl.* cluster of differentiation 117 je važan biljeg na staničnoj površini koji se koristi za identifikaciju određenih vrsta hematopoetskih progenitornih stanica u koštanoj srži.

CD133 - *engl.* cluster of differentiation 133 je najčešće korišteni biljeg za izolaciju populacije tumorskih matičnih stanica (*engl.* cancer stem cells CSCs).

CRAds - *engl.* conditionally replicating AdV vectors, uvjetno replicirajući adenovirusni vektori dizajnirani promjenom AdV prirodnih gena koji kodiraju regulatorne proteine staničnog ciklusa virusa.

CT - kompjutorizirana tomografija.

DHFR - dihidrofolat-reduktaza, enzim važan u metabolizmu folne kiseline.

DNA - deoksiribonukleinska kiselina.

dsRNA - *engl*. double-stranded RNA, ribonukleinska kiselina s dvostrukom uzvojnicom.

E1A i E1B - proteini važni u blokiranju apoptoze stanica koje su inficirane AdV-om.

E2F - skupina gena koji kodiraju transkripcijske čimbenike važne za regulaciju staničnog ciklusa i sinteze DNA.

EGFP - *engl.* enhanced green fluorescent protein, protein koji fluorescira zeleno kada je izložen UV zrakama.

EGFR - *engl.* epidermal growth factor receptor, receptor za epidermalni čimbenik rasta transmembranski je protein i član porodice receptora ErbB u koju se ubrajaju četiri usko povezane receptorske tirozin kinaze: EGFR (ErbB-1), HER2 / neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) i Her 4 (ErbB-4). Mutacije koje utječu na ekspresiju ili aktivnost EGFR-a mogu rezultirati rakom.

eIF-2 - *engl.* Eukaryotic Initiation Factor 2, eukariotski inicijacijski čimbenik 2 je heterodimer sastavljen od α, β i γ podjedinica, važan za sintezu proteina eukariota.

EMA - *engl.* epithelial membrane antigen, antigen na membrani epitelnih stanica.

ETV6 - *engl.* translocation-Ets-leukemia virus, gen koji kodira istoimeni transkripcijski čimbenik, tzv. translokacijsku varijanatu 6, ETV6. Protein ETV6 regulira razvoj i rast različitih tipova stanica, posebno hematoloških tkiva. ETV6 je klinički značajan protoonkogen jer se može fuzionirati s drugim genima za pokretanje razvoja i/ili napredovanja određenih karcinoma.

EURAMOS - *engl.* European and American Osteosarcoma Studies, multicentrične kolaborativne studije usmjerene k poboljšanju ishoda liječenja osteosarkoma.

FDA - *engl.* Food and Drug Administration, agencija Sjedinjenih Američkih Država odgovorna za zaštitu i promicanje javnog zdravlja kroz kontrolu i nadzor sigurnosti hrane za ljude i životinje, lijekova, kozmetike, dodataka prehrani, medicinskih proizvoda, bioloških proizvoda i proizvodi od krvi. Bez odobrenja agencije, navedeni proizvodi ne mogu biti pušteni u prodaju u Sjedinjenim Američki Državama.

FISH - Fluorescentna *in situ* hibridizacija, molekularna je citogenetska tehnika koja koristi fluorescentne probe koje se vežu samo na one dijelove sekvence nukleinske kiseline s visokim stupnjem komplementarnosti sekvenci.

FN1 - gen koji kodira dvije vrste proteina naziva fibronektin 1: topljivi plazmatski fibronektin 1 i netopljivi stanični fibronektin 1. Stanice jetre proizvode topljivi plazmatski fibronektin 1 te ga oslobađaju u krvotok. Ima ulogu u zgrušavanju krvi i zacjeljivanju rana. Mnoge druge vrste stanica proizvode netopljivi stanični fibronektin 1 koji se oslobađa u izvanstanični prostor i doprinosi stvaranju vlakana i izvanstaničnog matriksa. Obje vrste fibronektina 1 pomažu migraciju stanica, a utječu i na staničnu diferencijaciju.

FOS - porodica protoonkogena.

GM-CSF - *engl*. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, čimbenik za stimulaciju rasta granulocita i makrofaga.

GSTP1 - glutation-S-transferaza-Pi 1, polimorfni je gen koji kodira aktivne, funkcionalno različite proteinske varijante GSTP1 za koje se smatra da djeluju u metabolizmu ksenobiotika i igraju ulogu u osjetljivosti na rak i druge bolesti. Glutation-transferaze (GST) su obitelj enzima koji imaju važnu ulogu u detoksifikaciji, kataliziranjem konjugacije mnogih hidrofobnih i elektrofilnih spojeva sa reduciranim glutationom. Na temelju njihovih biokemijskih, imunoloških i strukturnih svojstava, topljivi GST-ovi su kategorizirani u četiri glavne skupine alfa, mu, pi i theta.

GSTT1 - glutation-S-transferaza-Theta 1.

H&E - hematoksilin i eozin, najčešće korišteno bojanje u histologiji.

HAPs - *engl.* hypoxia-activated prodrugs, molekule koje se aktiviraju u hipoksičnim uvjetima.

HER2 - *engl.* human epidermal growth factor receptor 2, receptor za epidermalni čimbenik rasta koji može imati ulogu u razvoju raka dojke. Vidjeti objašnjenje kratice EGFR.

HSV - Herpes virus.

HSP90b - *engl.* heat shock protein 90b , proteini koje stanice proizvode kada su izložene stresu.

HSV-TK - herpes simpleks virusna timidin-kinaza. Gen za navedeni enzim je najčešće korišteni suicidni gen koji se koristi u liječenju tumora. HSV-TK može fosforilirati neke nukleozidne analoge (npr. Ganciklovir, protuherpetički lijek), pretvarajući ih u toksične. Terapija suicidnim genima poznata je i kao genski usmjerena enzim/predlijek terapija (*engl.* Gene Directed Enzyme/Prodrug therapy, GDEPT) ili kao terapija aktiviranjem gena predlijeka (*engl.* Gene Prodrug Activation Therapy, GPAT). Da bi se gen smatrao suicidnim, njegov proteinski proizvod treba biti bilo odsutan bilo prisutan u niskim koncentracijama (niska ekspresija) u domaćinu. Trebao bi imati visoku katalitičku aktivnost, tako da tumorske stanice mogu pretvoriti predlijek čak i u niskoj koncentraciji supstrata. Da bi se smatralo idealnim terapijskim sredstvom, predlijek bi trebao ispunjavati sljedeće kriterije: 1) treba biti netoksičan ili minimalno toksičan prije aktivacije i vrlo toksičan nakon enzimske aktivacije. 2) trebao bi biti u stanju učinkovito prodrijeti u tumor i distribuirati se u svim stanicama 3) trebao bi imati visoki afinitet za produkt transducirang suicidnog gena i nizak afinitet prema staničnim enzimima (92).

hTERT - *engl.* human telomerase everse transcriptase, katalitička je komponenta enzima ljudske telomeraze koja zajedno s komponentom telomeraze RNA (TERC) čini najvažniju jedinicu kompleksa telomeraze. Telomeraze su polimeraze ovisnih o RNA. Telomeraza produžuje telomere u lancima DNK, omogućavajući tako stanicama koje bi inače postale postmitotične i podvrgnute apoptozi da postanu potencijalno besmrtne, kao što je to često slučaj sa stanicama karcinoma. TERT je odgovoran za kataliziranje dodavanja nukleotida u TTAGGG sekvenci na krajeve kromosoma. Ovaj dodatak ponavljajućih DNK nizova sprječava

degradaciju kromosomskih krajeva nakon višestrukih krugova replikacije. Odsutnost hTERT-a (obično kao rezultat mutacije kromosoma) povezana je s poremećajem Cri du chat.

ICP34.5 - *engl.* infected cell protein, protein zaraženih stanica 34.5 kodiran genom 34.5 u virusima poput herpes simplex virusa. Blokira odgovor staničnog stresa na virusnu infekciju.

ICP6 - podjedinica ribonukleotid reduktaze, enzima važnog za replikaciju virusne DNA, a koji je jako eksprimiran i u tumorskim stanicama koje se brzo dijele

KP1 - poznat kao CD68 i makrosijalin, u patohistologiji se koristi kao biljeg za histiocitne stanice.

KRS2 - gen za serin-treonin protein kinazu, sinonim STK4, ima važnu ulogu u promociji apotoze, posebno u kondenzaciji kromosoma tijekom programirane stanične smrti.

LAT - *engl.* Latency Associated Transcript je glavni virusni transkript otkriven hibridizacijom *in situ* u stanicama senzornih ganglija koje su latentno zaražene herpes simplex virusom.

MAGE - *engl.* melanoma associated antigen, antigeni uglavnom eksprimirani u različitim tumorima.

MDM2 - *engl.* Mouse Double Minute 2 Homolog, također poznat i kao E3 ubikvitin-protein ligaza, protein koji kod ljudi kodira MDM2 gen. MDM2 važan je negativni regulator tumor supresora p53.

MET - mezenhimsko-epitelna tranzicija, proces koji se pojavljuje tijekom embriogeneze i cijeljenja.

MeV - *engl.* Measles Virus, virus ospica

MHC-I - *engl*. major histocompatibility, glavni genski kompleks histokompatibilnosti.

MR - magnetska rezonancija

MTHFD1 - metilentetrahidofolat-reduktaza, enzim važan u metabolizmu folne kiseline.

MYC - porodica regulatornih i protoonkogena koji kodiraju transkripcijske čimbenike.

NBN - nibrin, protein koji se sastoji od 754 aminokiseline i član je NBS1 / hMre11 / RAD50 (N / M / R, češće nazvan MRN) dvolančanog kompleksa za popravak loma DNA.

NDV - *engl.* New Castle Disease Virus, virus bolesti New Castle.

NIS - tiroidni natrij jodid kotransporter.

ORR - *engl.* objective response rate, objektivna stopa odgovora na terapiju.

PABPL1 - *engl.* poly(A)binding protein-like 1, regulira procese metabolizma mRNA, kao što su pre-mRNA spajanje i stabilnost mRNA.

PET - Pozitron emisijska tomografija.

PI3K/mTOR - *engl*.phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin, vidjeti pojašnjenje u skraćenici za CCND2.

PKR - *engl*. protein kinase R, protein kinaza R aktivirana dvolančanom RNA (dsRNA), koja se virusnim infekcijama unosi u stanice.

PRIM1 - *engl.* DNA primase small subunit, DNA primaza 1 je enzim kojega kod ljudi kodira gen PRIM1. Replikacija DNA u eukariotskim stanicama je složen mehanizam u kojem su DNA

polimeraza alfa i primaza dvije ključne enzimske komponente. Primaza sintetizira male RNA primere za Okazaki fragmente tijekom replikacije DNA.

PVR - receptor za poliovirus poznat kao CD155, transmembranski je glikoprotein iz porodice imunoglobulina koji ima više uloga, međuostalim važan je za adheriranje stanica te transendotelnu migraciju leukocita.

p53 - Tumorski protein p53, također poznat kao p53, stanični tumorski antigen p53 (naziv UniProt), fosfoprotein p53, supresor tumora p53, antigen NY-CO-13 ili protein 53 (TRP53) ključan je u višestaničnim organizmima za sprječavanje nastanka raka, pa djeluje kao tumor supresor. Kao takav, p53 je opisan kao "čuvar genoma" zbog njegove uloge u očuvanju stabilnosti sprječavanjem mutacije genoma.

Ras/MapK - Ras/proteinska kinaza aktivirana mitogenom sudjeluje u istoimenom signalnom putu važnom za brojne stanične procese u organizmu.

Rb1 - gen za Retinoblastom 1 tumor supresorski protein.

RNA - ribonukleinska kiselina

SFV - *engl.* Semliki Forest Virus

SLC19A1/RFC1 - *engl.* solute carrier family 19 member 1/reduced folate carrier 1. Membranski protein kodiran ovim genom je prijenosnik folata i uključen je u regulaciju unutarstanične koncentracije folata. Pronađene su tri inačice koje kodiraju različite izoforme za ovaj gen.

SMA - *engl.* smooth muscle actin, aktin glatkih mišića, koristi se kao biljeg miofibroblasta.

SPECT -*engl.* single-photon emission computed tomography, jednofotonska emisijska kompjutorizirana tomografija.

ssRNA - *engl.* single stranded, jednolančana ribonukleinska kiselina.

Stro-1 - proteinski biljeg mezenhimalnih matičnih stanica.

S100 - proteini normalno prisutni u stanicama neuralnog grebena (Schwannove stanice i melanociti), hondrocitima, adipocitima, mioepitelnim stanicama, makrofazima, Langerhansovim stanicama, dendritičkim stanicama i keratinocita. Uključeni su u regulaciju fosforilacije proteina, čimbenika transkripcije, homeostazu Ca^{2+}, dinamiku citoskeleta, aktivnost enzima, rast i diferencijaciju stanica te upalni odgovor. Koristi se za imunohistokemijsku analizu patohistoloških uzoraka.

THBS1 - trombospondin 1 je protein kodiran istoimenim genom važan za odvijanje više bioloških procesa, uključujući angiogenezu, apoptozu, aktivaciju TGF-beta i imunološku regulaciju.

TNM-sustav - klasifikacijski za procjenu proširenosti tumora koji uključuje procjenu primarnog tumora (oznaka T), zahvaćanje limfnih čvorova (oznaka N) i prisutnost udaljenih metastaza (oznaka M).

VGF - *engl*. vaccinia growth factor, čimbenik rasta vaccinia virusa koji stimulira diobu stanica koje se nalaze oko virusom inficiranih stanica što vjerojatno olakšava kasniju replikaciju poksvirusa u njima.

VHS - *engl.* virion host shutoff, protein herpes simpleks virusa kodiran genom UL41 koji igra presudnu ulogu u virusnom preuzimanju staničnih funkcija domaćina. VHS je RNAza koja ulazi u stanicu kao dio tegumenta.

VPg - *engl.* viral protein genome-linked je protein koji je kovalentno vezan na 5 'kraj virusne RNA i djeluje kao primer tijekom sinteze virusne RNA

VSV - *engl.* Vesicular Stomatitis Virus, virus vezikularnog stomatitisa.

VZV - varičela zoster virus.

WHO - *engl.* World Health Organisation, Svjetska zdravstvena organizacija, ustanovljena 1948. godine u Ženevi, međunarodna je organizacija Ujedinjenih naroda (UN-a) posvećena javnom zdravstvu.

ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Sandro Jovičić

Datum i godina rođenja: 23.02.1977., Zagreb; Hrvatska

Adresa: Tijardovićeva ulica 22, 10 000, Zagreb

Broj mob.: 098/ 95 88 210

e-mail: sandrojovicic@yahoo.com

OBRAZOVANJE:

2017.-2020. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta Zagreb, Poslijediplomski specijalistički studij Razvoj lijekova

1999.-2006. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer : Diplomirani inženjer kemije

1991.-1995. Škola za zdravstvene tehničare, smjer : Farmaceutski tehničar

RADNO ISKUSTVO:

Od 09/2019. zaposlen u Genera d.d., Kalinovica, na mjestu Specijalista za registraciju.

Opis poslova i odgovornosti: Sudjelovanje u pripremi dokumentacije potrebne za izradu dosjea, priprema registracijskog dosjea u skladu s zakonodavstvom ciljnih tržišta, distribucija i pohranjivanje registracijske dokumentacije, poznavanje regulatorne situacije na ciljnim tržištima, pretraživanje literature i dopuna znanstveno-stručnih podataka o VMP.

Poznavanje regulative i zakona na području registracije lijekova na svim tržištima od interesa: Hrvatska, Bosna i Hercegovina, Albanija, Kosovo, Crna Gora, Makedonija, Srbija, Poljska, Češka, Bugarska, Slovenija i ostale; sudjelovanje u DCP postupcima registracije.

Svakodnevni rad na pripremi i održavanju „up-to-date“ stanja registracijske dokumentacije za sva tržišta od interesa, kao i dokumentacije za prijavu varijacija, prvih registracija te obnova prema nacionalnim i EU pravilnicima, pokretanje kontrola izmjene, pisanje Quality Overall Summary-a.

U opisu posla je i svakodnevna komunikacija sa suradnim partnerima (licencnim), kao i s predstavništvima tvrtke u svrhu ishođenja najnovije dokumentacije i razmjene informacija o izmjenama i dopunama u registracijskoj dokumentaciji.

Od 07.2016. do 09.2019. zaposlen u Genera d.d., Kalinovica, na mjestu Suradnika za registraciju.

Opis poslova i odgovornosti: Sudjelovanje u pripremi dokumentacije potrebne za izradu dosjea, priprema registracijskog dosjea u skladu s zakonodavstvom ciljnih tržišta, distribucija i pohranjivanje registracijske dokumentacije, poznavanje regulatorne situacije na ciljnim tržištima, pretraživanje literature i dopuna znanstveno-stručnih podataka o VMP.

Od 03.2015. do 07.2016. zaposlen u Genera d.d., Kalinovica, na mjestu Suradnika za ambalažu.

Opis poslova i odgovornosti: Kreiranje i izrada specifikacija primarne ambalaže sa naslova materijala, geometrije i kvalitete, odobravanje izmjena na postojećoj kontaktnoj ambalaži te odobravanje nove kontaktne ambalaže, praćenje regulative vezano za primarnu, sekundarnu i transportnu ambalažu te u skladu sa time koordiniranje promjena, unapređivanje područja tehnologije opremanja i uvođenje novih pakirnih materijala u području razvoja proizvoda, suradnja sa proizvođačima primarne ambalaže, izrada tehnološke i registracijske dokumentacije iz područja pakiranja peroralnih i parenteralnih dozirnih oblika, sudjelovanje u procesu opremanja stabilitetnih serija.

Od 07.2010. do 03.2015. zaposlen u Genera d.d., Kalinovica, na mjestu Tehnologa u proizvodnji veterinarskih lijekova.

Opis poslova i odgovornosti: Razrađivanje tehničko-tehnološke dokumentacije, pripreme uputa za tehnološke postupke rada, unapređivanje tehnologije proizvodnje, izrada tjednih i mjesečnih planova proizvodnje, osiguranje provođenja tehnoloških postupaka izrade i opreme proizvoda u skladu s važećom Dobrom proizvođačkom praksom, provođenje i nadzor zaposlenika u pridržavanju regulativa Dobre proizvođačke prakse, kontroliranje ekonomičnosti i produktivnosti.

Od 07.2008. do 07.2010. zaposlen u Veterina d.d., Kalinovica, na mjestu Suradnika u Osiguranju kvalitete.

Opis poslova i odgovornosti: Izrada kontrolno-analitičke dokumentacije, suradnja sa odjelom registracije u poslovima izrade sekundarne ambalaže, sudjelovanje u rješavanju reklamacija, sudjelovanje u rješavanju kontrola izmjena, suradnja s dobavljačima, koordiniranje rada operativne kontrole, koordiniranje, planiranje i provođenje validacijskih i kvalifikacijskih aktivnosti, odgovornost za izdavanje validacijske dokumentacije, nadziranje provođenja IRV/STP ispitivanja, provođenje internih GMP audita, sastavljanje izvještaja za godišnje preglede kvalitete proizvoda, sudjelovanje u aktivnostima pripreme i provedbe vanjskih inspekcija.

Od 01.2008. do 07.2008. zaposlen u Veterina d.d., Kalinovica, na mjestu Suradnika u Kontroli kvalitete.

Opis poslova i odgovornosti: Izvođenje analiza prema postupcima kontrole kvalitete, vođenje laboratorijske dokumentacije.