

Zastupljenost autofagije u neurosferama dobivenih iz stanica glioblastoma

Sivonjić, Ivona

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:375390>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ivona Sivonjić

**ZASTUPLJENOST AUTOFAGIJE U
NEUROSFERAMA DOBIVENIH IZ
GLIOBLASTOMA**

Završni rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ivona Sivonjić

**ZASTUPLJENOST AUTOFAGIJE U
NEUROSFERAMA DOBIVENIH IZ
GLIOBLASTOMA**

Završni rad

Osijek, 2021.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za kulturu tkiva i funkcionalnu genomiku pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku.

Mentor: doc. dr. sc. Marijana Jukić

Rad ima: 27 listova i 5 slika.

Zahvala

Zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Marijani Jukić, na prihvaćenom mentorstvu, velikoj pomoći te brojnim korisnim savjetima pri izradi ovoga rada.

Zahvaljujem i svojoj obitelji na omogućenom školovanju i potpori tijekom ovih godina.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Autofagija	1
1.1.1. Oblici autofagije	2
1.1.2. Autofagija kao tumor promotor i tumor supresor	4
1.2. Stanična kultura	5
1.2.1. Prednost 3D nad 2D staničnom kulturom	5
1.2.2. Načini uspostave 3D stanične kulture	7
2. HIPOTEZA	9
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	10
4. MATERIJALI I METODE	11
4.1. Ustroj studije	11
4.2. Materijali	11
4.2.1. Kemikalije	11
4.2.2. Stanična linija	11
4.3. Metode	12
4.3.1. Kultivacija i održavanje stanica u <i>in vitro</i> uvjetima	12
4.3.2. Određivanje broja živih stanica	12
4.3.3. Analiza autofagije u neurosferama	13
4.3.4. Statistička obrada podataka	14
5. REZULTATI	15
5.1. Analiza zastupljenosti autofagije u formiranim neurosferama protočnom citometrijom	15
6. RASPRAVA	18
7. ZAKLJUČAK	21
8. SAŽETAK	22
9. SUMMARY	23
10. LITERATURA	24
11. ŽIVOTOPIS	27

POPIS KRATICA

2D	dvodimenzionalne kulture stanica
3D	trodimenzionalne kulture stanica
ATG	gen povezan s autofagijom (<i>engl. Autophagy related gene</i>)
BECN 1	Beclin 1 gen (<i>engl. Beclin 1 gene</i>)
CMA	autofagija posredovana šaperonima (<i>engl. chaperon mediated autophagy</i>)
D54	stanična linija ljudskog mozga
DMEM	Dulbecco modificirani Eagle medij
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
HIF-1 α	hipoksija inducibilni faktor 1 α (<i>engl. hypoxia-inducible factor 1α</i>)
HSC70	protein toplinskog šoka (<i>engl. heat shock cognate 70</i>)
KRAS	<i>engl. Kirsten rat sarcoma viral oncogene</i>
LAMP2	lizosom-povezani membranski protein 2 (<i>engl. lysosome-associated membrane protein 2</i>)
PBS	fosfatni pufer (<i>engl. phosphate-buffered saline</i>)
ROS	reaktivni metaboliti kisika (<i>engl. reactive oxygen substance</i>)

1. UVOD

Smrt stanica važna je za održavanje homeostaze u organizmu. Nove stanice neprestano nastaju stoga je višak i oštećene stanice potrebno ukloniti. Tri su glavna mehanizma za uklanjanje stanica: apoptoza, nekroza te opisana u ovome radu, smrt stanice ovisna o autofagiji. Većina stanica koristi se apoptozom, ali istraživanja u kojima je put apoptoze blokiran pokazala su važnu ulogu ne-apoptotskih mehanizama za uklanjanje potencijalno opasnih stanica. U apoptozi, dijelove raspadnute stanice prepoznaju fagociti te ih brzo uklanjaju, dok su u autofagiji komponente stanice dovedene do lizosoma radi razgradnje. Prvotno zvana mehanizmom preživljavanja, autofagija ima specifičnu ulogu u posredovanju stanične smrti (1).

1.1. Autofagija

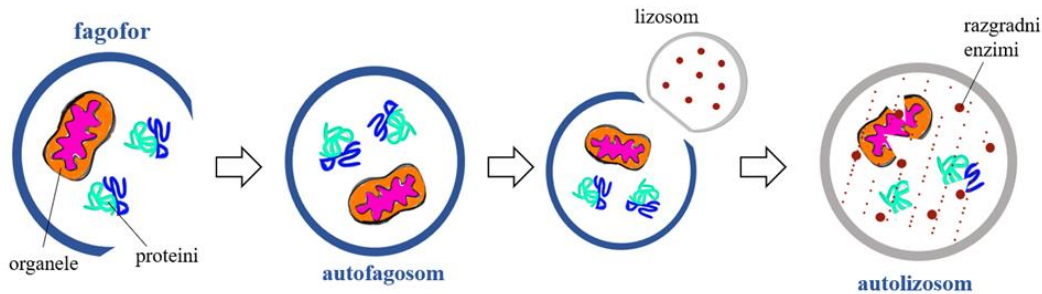
Naziv autofagije, glavnog staničnog puta razgradnje proteina i citopazmatskih organela, dolazi od grčkih riječi „auto” i „phagy” što znači jesti samoga sebe (2). Autofagija upravlja izvorima energije u kritičnim trenucima u razvoju kao i u odgovoru na stres uslijed nedostatka hranjivih tvari (3). Ona u stanju gladovanja osigurava energiju za stanice. Naime, razgradnjom oštećenih i nepotrebnih proteina oslobađaju se aminokiseline koje su upotrijebljene za sintezu esencijalnih proteina (4). Kao i metaboliti, proteini i stanične organele nalaze se u ravnoteži između kontinuirane sinteze i razgradnje. Dug period ljudi su vjerovali kako degradacija ne igra važnu ulogu u homeostazi proteina, ali eksperimenti iz sedamdesetih godina dokazali su suprotno. Životni vijek proteina procijenjen je ubrizgavanjem pročišćenih proteina u stanice kada je ustanovljeno kako svaki protein *in vivo* ima različito poluvrijeme života (5). Primjerice, transkripcijski faktori su proteini koji djeluju kao regulatorne molekule te se oni brzo razgrađuju. Brz protok takvih proteina potreban je zbog mogućnosti brze promjene u odgovoru na signale iz okoline (6). Danas znamo kako se proteini u našem tijelu potpuno izmijene svakih 1-2 mjeseca (5). Uloga autofagije je i uklanjanje pogrešno savijenih ili agregiranih proteina, unutarstaničnih

patogena pa i oštećenih organela kao što su mitohondriji, endoplazmatski retikuli i peroksisomi. Iz navedenih razloga, autofagija se smatra i mehanizmom preživljavanja (3). Činjenica da svi organizmi na Zemlji posjeduju proteazu dokaz je da su stanice već u ranoj fazi evolucije stekle određeni mehanizam unutarstanične razgradnje proteina (5).

Ime lizosomu dao je C. de Duve kada je uočio organelu s optimalnom aktivnošću pri kiselom pH te brojnim razgradnim enzimima, uključujući nekoliko proteaza (5,6). Nekontrolirana razgradnja staničnog sadržaja onemogućena je zadržavanjem proteaza i ostalih razgradnih enzima unutar lizosoma. Naime, stanični proteini moraju biti uneseni u sam lizosom kako bi bili razgrađeni lizosomalnom proteolizom (6). Upravo pojam autofagija označava niz puteva kojima se citoplazmatski materijal doprema u lizosom kao bi se razgradio. Proces autofagije uvijek je aktivan radi održavanja homeostaze, ali u većoj mjeri u stresu. Dolazi u tri oblika: makroautofagija, mikroautofagija te šaperonima-posredovana autofagija (7).

1.1.1. Oblici autofagije

Makroautofagija je najzastupljeniji oblik autofagije (3,7). Započinje stvaranjem izolacijske membrane, fagofora. Pretpostavlja se da je nastao od lipidnog dvosloja endoplazmatskog retikula, Golgijeva aparata ili endosoma. Fagofor se širi kako bi mogao progutati unutarstanični otpad poput proteinskih agregata i organela koji će onda biti uklopljeni unutar autofagosoma – dvomembranske vezikule (3). Vezikule „proždiru” citoplazmatske proteine i organele te ih odvede do lizosoma radi razgradnje. Autofagosomi putuju mikrotubulima kako bi se spojili s lizosomima (autofagolizosomi). Nakon fuzije autofagosoma i lizosoma, donesene proteine ili organele tj. stanični otpad degradiraju lizosomski enzimi (*Slika 1.*). Poznavanju molekularnih mehanizama makroautofagije najviše su doprinijela istraživanja u genetici kvasca. Probiranjem mutanata kvasca pronađeno je više od 3 ATG (*engl. Autophagy related gene*), a nakon toga i mnogi ortolozi ATG geni identificirani su u viših eukariota (7).



Slika 1. Prikaz makroautofagije – stvaranje autolizosoma. Izvor: izradila autorica rada.

Za razliku od makroautofagije, u mikroautofagiji stanični otpad iz citoplazme direktno se unosi u lizosom uvrtaњem membrane lizosoma. Kada se materijal namijenjen degradaciji nalazi u lizosomu, razgrađuju ga lizosomske proteaze (8,9). Iako je prošlo više od 50 godina otkako je proces opisan, malo se zna o samom molekularnom mehanizmu i o regulaciji u sisavaca. Razlog je mala veličina lizosoma u stanicama kao i nedostatak testova za mjerenje razine mikroautofagije. Praćenje je znatno olakšano u stanici kvasca jer ona posjeduje jedan veliki „lizosom” nazvan vakuolom. Koji će proteini biti „pogođeni” mikroautofagijom ovisi o staničnom stanju, npr. eliminacija peroksisoma dogodit će se kada kvasac kao izvor energije umjesto glukoze koristi metanol (8).

Autofagija posredovana šaperonima (*engl. CMA – chaperon mediated autophagy*) selektivni je oblik autofagije specijaliziran za razgradnju proteina, a temelji se na translokaciji proteina kroz membranu lizosoma gdje će biti razgrađen. Kada je otkriven, ovaj tip autofagije bio je jedinstven, selektivni oblik autofagije, no kasnije su opisani i selektivni oblici makroautofagije i mikroautofagije. Preduvjet za odvijanje procesa je vezanje šaperona HSC70 (protein toplinskog šoka, *engl. heat shock cognate 70*) s proteinom za razgradnju – HSC70 usmjerava protein prema membrani lizosoma. Za prepoznavanje, protein mora imati slijed aminokiselina specifičnog naboja i hidrofobnosti - „KFERQ” motiv. Nastali kompleks šaperon-protein prepoznaje se preko receptora membrane lizosoma – lizosom-povezani membranski proteini 2 (*engl. LAMP2 – lysosome-associated membrane protein 2*). Supstrati se mogu vezati na LAMP2 u savijenom obliku, ali je odmatanje neophodno za translokaciju u lumen lizosoma, što je zadatak HSC70 i drugih šaperona. HSC70 koji su unutar lizosoma potiču translokaciju supstrata sprječavajući njegov povratak u citosol (10).

1.1.2. Autofagija kao tumor promotor i tumor supresor

Stanice raka su tijekom karcinogeneze izložene mnogobrojnim staničnim stresorima. Kako bi se obranile imaju mogućnost aktivacije različitih mehanizama za prilagodbu i rast (11). Već je spomenuto kako autofagija u stanju gladovanja, stresa i hipoksije recikliranjem staničnog materijala omogućuje preživljenje, ali njezina uloga u tumorigenezi je dvojaka. Može djelovati kao tumor supresor, ali može i poticati nastanak tumora (11-15). U ranijim stadijima karcinogeneze suprimira nastanak tumora degradirajući potencijalne onkogene dok u kasnijim stadijima potiče opstanak stanica prilagodbom na stres (11).

Supresivnu ulogu podupiru istraživanja koja su pokazala povećani razvoj spontanih, benignih tumora pluća i jetre te limfoma u miševa kojima su „uklonjeni” geni za autofagiju (BECN 1 – *engl. Beclin 1*, Atg 7 – *engl. Autophagy related gene 7* i Atg 5 – *engl. Autophagy related gene 5*). Sva tri gena važna su za sintezu autofagolizosoma (11,14,15). Delecija gena BECN 1 koji kodira Beclin 1, protein ključan za stvaranje fagofora, uočen je i u tumorima dojke, prostate i jajnika. Delecija rezultira smanjenjem razine autofagije te višom razinom stanične proliferacije. Miševi s delecijom gena Atg 7 i Atg5 razvili su karcinom jetre zbog smanjene razine autofagije u hepatocitima uslijed oštećenja mitohondrija i oksidativnog stresa. Oštećenja mitohondrija rezultiraju pretjeranim stvaranjem ROS-a (*engl. reactive oxygen substance*), promovirajući karcinogenezu (15). Općenito, autofagija čuva integritet genoma uklanjajući oštećene organele koji bi stvaranjem ROS-a mogli uzrokovati nestabilnost genoma mijenjajući gensku ekspresiju (12). Još jedan način suprimiranja tumorigeneze je uklanjanje agregata p62, bjelančevine koja isporučuje ubikvitirani otpad za staničnu razgradnju. Nakupljanje p62 uzrokuje oštećenje same DNK, proteina i mitohondrija. Kod oboljelih od glioblastoma primijećena je pretjerana ekspresija p62 koja je proporcionalna s lošom prognozom bolesti (12,16).

Iako mehanizmi nisu razjašnjeni, smatra se kako autofagija može pomoći preživljavanju tumorskih stanica tijekom terapije protiv raka. Na primjeru tumora pluća otkriveno je kako recikliranjem staničnih organela i organskih molekula (aminokiselina, masnih kiselina i glukoze) opskrbljuje onkogene. U tumorima povezanim s onkogenom KRAS (*engl. Kirsten rat sarcoma*

viral oncogene) selektivna razgradnja neispravnih mitohondrija (mitofagija) omogućuje održavanje metabolizma mitohondrija u stanicama raka i tako potpomaže njihov rast (13,14). Zbog prevelike i nekontrolirane proliferacije tijekom karcinogeneze, tkivo postaje hipoksično jer stanica ima veću potrebu za kisikom i hranjivim tvarima (12,13). Normalna je pojava u tumorima, a potiče aktiviranje hipoksija-inducibilnog faktora 1- α (*engl. HIF-1 α - hypoxia-inducible factor 1 α*) koji promovira autofagiju regulacijom transkripcije gena autofagije kao što su BECN1, Atg 5 i sl. Stvaranjem proteina Beclin-1 označen je početak autofagije. Osim toga, HIF-1 α inducira angiogenezu kako bi osigurao dostupnost kisika i hranjivih tvari za tumorske stanice. Razina hipoksije i faktora angiogeneze u korelaciji su sa stupnjem tumora i lošijom prognozom (12).

1.2. Stanična kultura

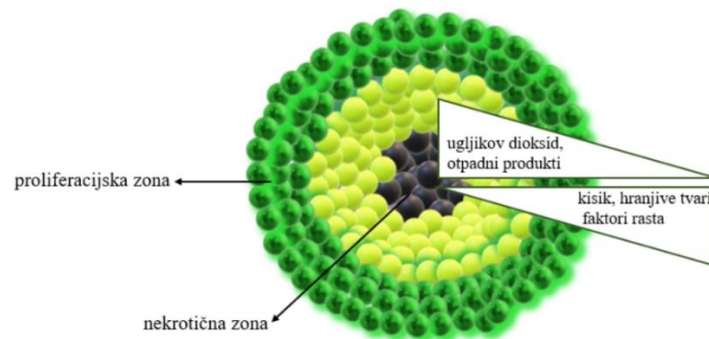
Pojam kulture stanica odnosi se na laboratorijske metode kojima se prokariotskim i eukariotskim stanicama omogućuje rast izvan organizma (17). Danas ima široku primjenu u istraživanjima i biotehnologiji: razvoj i odabir novih lijekova, istraživanje karcinoma, genska terapija, izvantjelesna oplodnja, proizvodnja monoklonskih protutijela i cjepiva. Pojam stanične kulture podrazumijeva izdvajanje stanica, tkiva ili organa iz organizma (životinje/čovjeka) i njihov uzgoj u kontroliranim, optimalnim uvjetima u laboratoriju (18). Neprecizno definirani mediji usporavali su razvoj kulture stanica. Prve kulture rasle su u ugrušku plazme, a napredak je ostvaren sredinom 20. stoljeća kada je omogućen rast izoliranih stanica prihvaćenih za stjenku posudice. Sljedeći problem nedefiniranih medija riješio je Harry Eagle određivši specifične aminokiseline te količine vitamina i šećera koje su potrebne stanicama za rast (6). Uzgoj stanica *in vitro*, van živog organizma, danas je moguć upravo zbog uporabe tih definiranih medija koji sadrže sve hranjive tvari potrebne stanici za rast kao i održavanje određenih fizikalno-kemijskih uvjeta (18).

1.2.1. Prednost 3D nad 2D staničnom kulturom

Trodimenzionalna kultura stanica od 2000. godine zabilježava sve veću uporabu u istraživanju raka, matičnih stanica i lijekova (19). I danas najveći dio istraživanja čini onaj na 2D

kulturi stanica koja raste u monosloju, ali njezina ograničenja sve su više prepoznata (20). Najveća kritika istraživanjima temeljenim na 2D kulturi je njihova pretpostavka kako se fiziologija životinja može reproducirati pomoću stanica koje rastu u jednome sloju na polistirenu ili staklu (21). Uzgoj stanica u trodimenzionalni oblik dovodi do formiranja *in vitro* modela koji ima visok potencijal oponašanja složene interakcije i organizacije stanica kakav je u *in vivo* uvjetima. Istraživanjima je pokazano kako zaista postoji razlika u morfologiji i fiziologiji između stanica u 2D i 3D kulturi (20).

Rastom u monosloju na ravnoj podlozi sve stanice dobivaju jednaku količinu hranjivih tvari i faktora rasta iz medija što nije slučaj u *in vivo* uvjetima. Osim toga, kako se medij mijenja tijekom uzgoja stanica, sa starijim medijem uklonjene su i nekrotične stanice pa monosloj čine same proliferacijske stanice. Kod 3D kulture, interakcije između stanica i ekstracelularnog matriksa bolje oponašaju prirodno stanje u organizmu. Iz tog razloga morfologija stanica sličij u tijelu. Naime, rastući na ravnoj podlozi stanice su ravnije i razvučene više nego u *in vivo* uvjetima. Za razliku od 2D, 3D kulturu čine stanice u različitim stadijima. Vanjski dio sferoida, najizloženiji mediju, čine najvećim dijelom proliferacijske stanice. Stanice u unutrašnjosti sferoida manje su izložene tvarima iz medija i kisiku pa su uglavnom hipoksične (Slika 2). Takav model više sličij onome u tkivu, posebno kada je riječ o tumorima (20).



Slika 2. Raspodjela nutritivnih tvari iz medija i produkata metabolizma u sferoidu. Izvor: izradila autorica rada.

1.2.2. Načini uspostave 3D stanične kulture

Za trodimenzionalni uzgoj mogu se koristiti određeni sustavi podrške, ali i ne moraju ako stanice pokazuju sklonost agregaciji i stvaranju sferoida.

Sustavi podrške (hidrogel, vlakna hidrofilnog stakla, organoidi) pokazuju niz prednosti. Načinjeni su od bioloških ili umjetnih poroznih materijala koji služe kao potpora tijekom formiranja sferoida (22). Posebnost hidrogela kao sustava podrške je njegovo oponašanje ekstracelularnog matriksa i mogućnost topivih faktora poput citokina i faktora rasta da putuju njime. Vlakna hidrofilnog stakla, iako zahtijevaju još istraživanja, pokazuju veliki potencijal za praćenje invazije i migracije stanica u tumorima. Posljednji spomenuti, organoidi, omogućuju modeliranje bolesti korištenjem pluripotentnih stanica čovjeka. Organoidi se mogu grupirati u sferoide stvaranjem vlakana ekstracelularnog matriksa koji omogućuje spajanje stanica preko integrina (19).

Metode koje se ne koriste sustavima podrške su: uzgajanje sferoida kao visećih kapi, magnetska levitacija te metoda korištena u ovome istraživanju, uzgoj sferoida pomoću slabo prijanjajućih površina, tj. u jažicama s tzv. V ili U dnom (19,22). Magnetska levitacija jedna je od novijih metoda. S obzirom da stanice inače ne pokazuju svojstva magneta, potrebno ih je „hraniti” magnetskim nanočesticama. Korištenjem magnetne sile stanice levitiraju između medija i zraka odakle i sam naziv magnetska levitacija. Nije potreban poseban medij jer ga stanice same proizvode. Za metodu viseće kapljice koriste se Petrijeve posudice u kojima je potaknuta interakcija među stanicama omogućena formiranjem kapljica na poklopcu posudice (22). I metoda viseće kapljice i uzgoj sferoida u slabo prijanjajućoj jažici potiču samoagregaciju stanica u jedan sferoid po jažici. Istraživanjem je pokazano da su te dvije metode usporedive u pogledu veličine, duljine života i funkcionalnih karakteristika tkiva (23).

Zajednički cilj istraživanja na 3D staničnim kulturama je spojiti kvalitete korištenja životinjskih modela i uzgoja stanica u monosloju. Za razliku od istraživanja na životinjskim modelima koja su skupa, istraživanja na staničnim kulturama pružila su jednostavniji, brži i isplativiji način otkrivanja lijekova (20,24). 3D kultura ima sve veću ulogu u probiru lijekova, ali mnoge trenutno korištene tehnike su skupe, dugotrajne i bez mogućnosti reproduciranja zbog čega

se izdaju veliki naponi za razvijanje standardnih i brzih protokola za njihovo korištenje u testiranju lijekova (20).

2. HIPOTEZA

Primjećuju se promjene u zastupljenosti autofagije u stanicama neurosfera u ovisnosti o vremenskom periodu kultivacije sfera.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj rada je odrediti zastupljenost autofagije u formiranim neurosferama, te utvrditi utječe li vremenski period uzgoja sferoida na pojavnost autofagije.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Rad je koncipiran kao *in vitro* studija (kontrolirani pokus). Pokus je proveden u Laboratoriju za kulturu tkiva i funkcionalnu genomiku pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku.

4.2. Materijali

4.2.1. Kemikalije

Za provedbu pokusa korištene su sljedeće kemikalije:

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose) medij s 4500 mg/L glukoze, L-glutaminom i natrijevim dikarbonatom, bez natrijevog piruvata, s dodatkom 10% FBS-a, *Sigma-Aldrich (Velika Britanija)*
- Tripsin / EDTA, tripsin 0.25 %, 1mM EDTA- Na_4 u HBSS s phenol red, bez Ca^{2+} i Mg^{2+} , *Panbiotech (Aidenbach, Njemačka)*
- PBS pufer – izotonična otopina; fosfatom puferirana otopina soli
- Eritrozin B, *Merck (Njemačka)*
- Acridine orange solution, *Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)*

4.2.2. Stanična linija

Za procjenu zastupljenosti autofagije ovisno o vremenskom periodu uzgoja stanica korištene su adherentne stanice glioblastoma D54 (RRID:CVCL_7185).

4.3. Metode

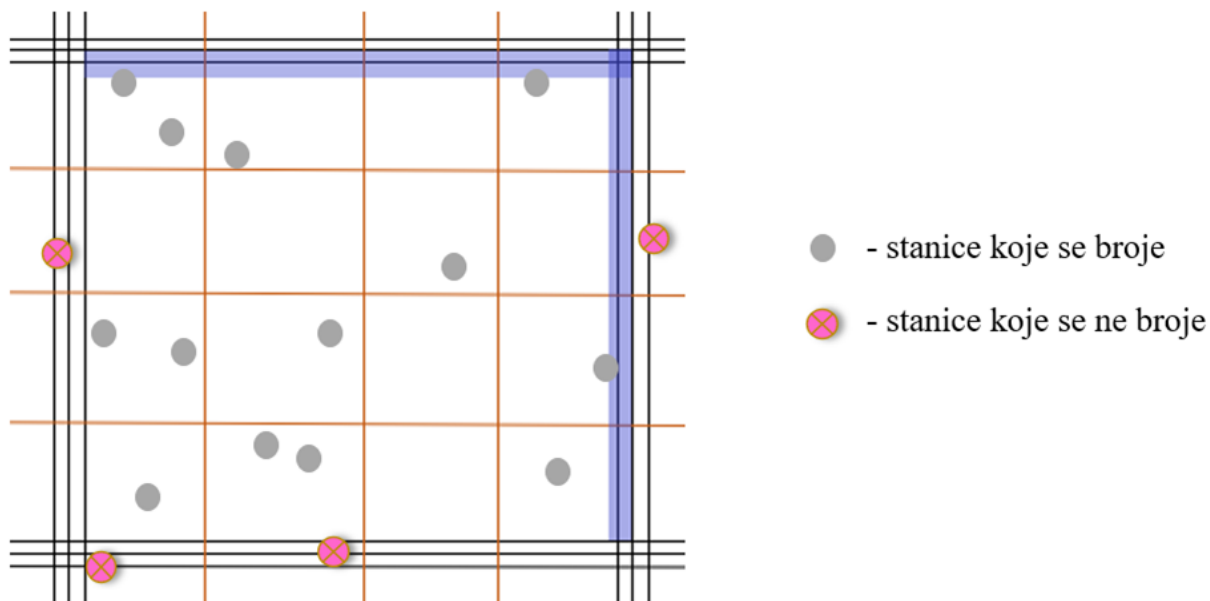
4.3.1. Kultivacija i održavanje stanica u *in vitro* uvjetima

Stanična linija D54 nasađena je u boce za uzgoj te kultivirana u inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) na temperaturi od 37 °C i razinom CO₂ od 5%.

Za održavanje i daljnju upotrebu stanica potrebno ih je presađivati. Pri presađivanju stanica prvo ih je potrebno pregledati pod mikroskopom. Nakon toga uklanja se stari medij, a stanice se tretiraju tripsinom kako bi se odvojile od površine. Prije dodatka tripsina, bočicu je potrebno isprati sa PBS-om, puferom izotoničnim sa stanicama jer će u protivnom ostaci medija inaktivirati tripsin. Tripsinom se pređe po površini stanica, nakon čega se višak ukloni, a stanice u bočici stavljaju se u inkubator 6-8 minuta. Nakon isteka vremena, pod mikroskopom se provjeri jesu li stanice odlijepile. Dio stanica za pokus stavljaju se u Falcon epruvete od 15 ml, a u ostatak u bočici dodaje se svježiji DMEM medij kako bi se uzgoj nastavio.

4.3.2. Određivanje broja živih stanica

Tijekom uzgoja, rukovanja ili presađivanja stanice mogu umrijeti. Kako je određeni broj stanica potreban za provođenje istraživanja, važno je razlikovati žive stanice od mrtvih. Za određivanje vijabilnosti stanica korištena je boja eritrozina B – selektivno boja mrtve stanice. Žive stanice s očuvanom membranom ostaju nebojene, one aktivno izbacuju boju. Žive stanice se prije nasađivanja broje u Bürker-Türkovoj komorici u 4 kvadranta uz poštivanje pravila L – broje se sve stanice unutar kvadranta i one koje se nalaze na 2 susjedna ruba (*Slika 3.*). Stanice su izbrojane pod invertnim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka).



Slika 3. Prikaz jednog kvadranta u Bürker-Türkovoju komorici – pravilo slova L. Izvor: izradila autorica rada.

Broj živih stanica u 1 ml određuje se prema formuli:

$$\text{Broj vijabilnih stanica} = \frac{N}{4} \times 3 \times 10^4 \text{ stanica/ml}$$

N označava izbrojane stanice, 4 kvadrante u kojima su brojane, a 3 faktor razrjeđenja.

4.3.3. Analiza autofagije u neurosferama

Na mikrotitarsku pločicu sa 96 jažica nasadene su D54 stanice u koncentraciji od 1×10^4 stanica/ml u volumenu od 200 μL . Mikrotitarska pločica sa stanicama centrifugirana je (Eppendorf Centrifuge 5804R) na 1100 rpm 10 minuta. Stanični sferoidi uzgajani su kroz 5, 10 i 15 dana. Po završetku vremena inkubacije formirane sfere su pokupljene u falkonicu, centrifugirana 6 min. na 1100rpm. Ostatak medija je uklonjen sa staničnih sferoida, te su sferoidi isprani PBS-om. Sferoidi su inkubirani 30 min sa 0,05% tripsinom kako bi se razdvojili na pojedinačne stanice. Po isteku vremena inkubacije sa stanica je uklonjen tripsin i stanice su isprane

sa PBS-om. Za detekciju autofagije stanice su obojane acridin orange bojom u koncentraciji od 1 $\mu\text{g/ml}$ kroz 30 minuta na 37°C u mraku. Po isteku vremena inkubacije stanice su ponovno centrifugirane 6 minuta na 1100 rpm, boja je odbačena te su stanice prenesene u posudice za protočnu citometriju s 300 μl PBS-a. Uzorci su analizirani u duplikatu na *BD FACScanto II* protočnom citometru. Rezultati su obrađeni programom FlowJo.

4.3.4. Statistička obrada podataka

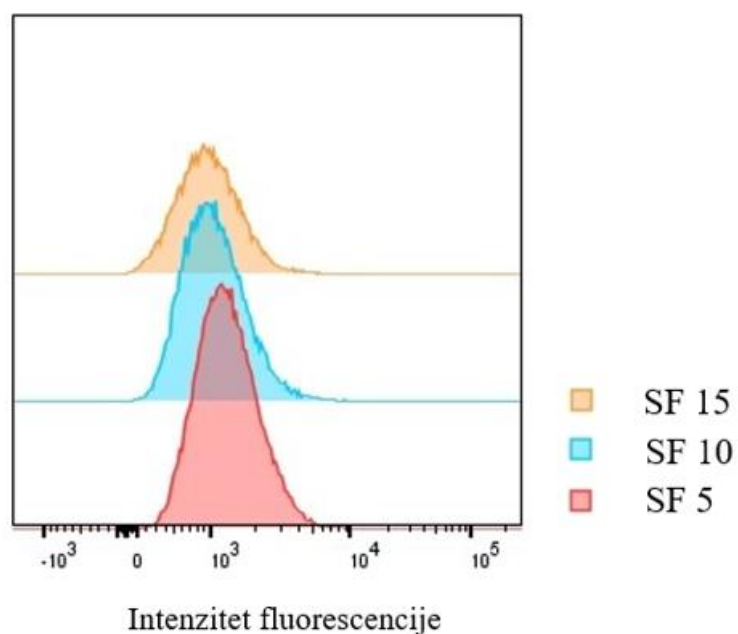
Za obradu i analizu podataka sa protočnog citometra koristio se FlowJo program. Statistička analiza podataka obavljena je pomoću statističkog programa XLSTAT 2021.2.2 za Windows 10 operativni sustav (25). Analiza varijance između neurosfera uzgojenih u različitom vremenu određena je ANOVA testom s Dunnettovim testom gdje je razina statističke značajnosti definirana kao $p < 0,05$.

5. REZULTATI

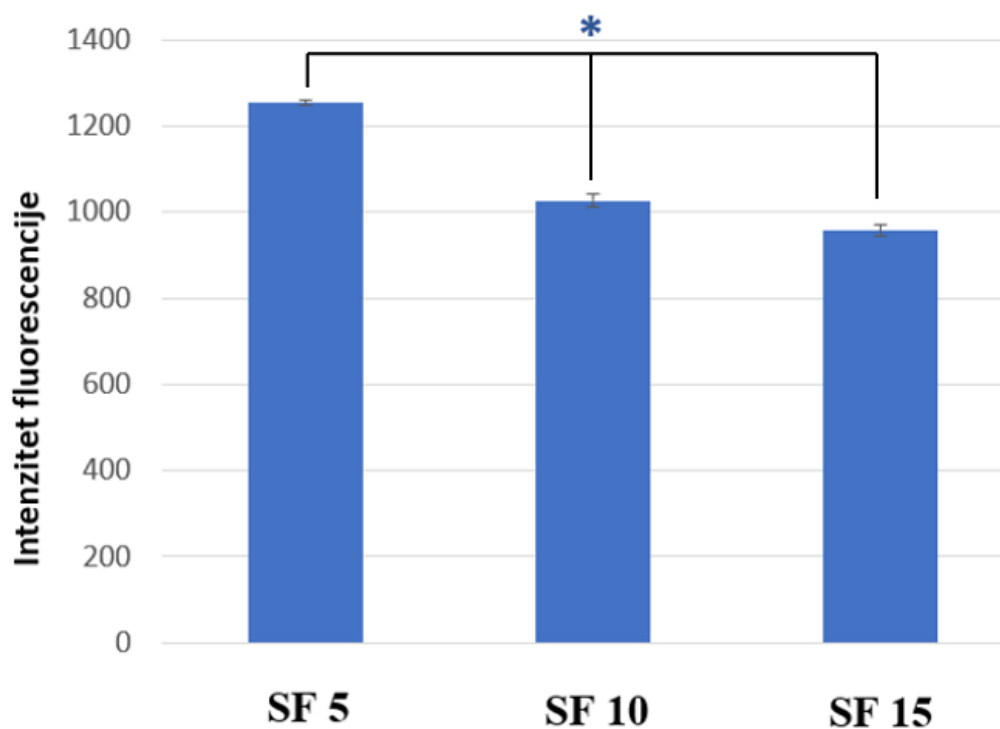
5.1. Analiza zastupljenosti autofagije u formiranim neurosferama protočnom citometrijom

Acridin orange je fluorescentna boja koja ulaskom u kisele vakuole, tj. autolizosome fluorescira crveno. Izmjerena fluorescencija proporcionalna je zastupljenosti autofagije u D54 stanicama glioblastoma uzgojenih u sferoidima. Rezultati su obrađeni programom FlowJo te su prikazani histogramom (*Slika 4*). Osim toga, prikazani su grafički računom srednje vrijednosti i standardne devijacije za sferoide uzgajane 5, 10 i 15 dana (*Slika 5*).

Procjena zastupljenosti autofagije određena je u neurosferama formiranim od D54 stanica, koje su kultivirane u jažicama sa slabo prijanjajući dnom u različitim vremenskim periodima. Dobiveni rezultati ukazuju na promjenu fluorescencije u ovisnosti o vremenu kultivacije. Na histogramskom prikazu vidljiv je pomak fluorescencije u lijevo s produženim vremenom uzgoja, što nam ukazuje na smanjenje autofagije (*Slika 4*). Statističkom analizom utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u prisutnosti autofagije u ovisnosti o vremenskom uzgoju (*Slika 5*). Dobiveni rezultati upućuju na smanjenje zastupljenosti autofagije s porastom sferoida zbog dužeg perioda uzgoja. Razlika u intenzitetu fluorescencije između neurosfera uzgojenih kroz 5 i 10 dana je 226, dok je manja razlika vidljiva između 10 i 15 dana od 70.



Slika 4. Histogramski prikaz fluorescencije D54 stanica obojanih acridin orange bojom. Slika prikazuje pomak u promjeni intenziteta fluorescencije između D54 neurosfera uzgajanih kroz 5 dana (crveni histogram), 10 dana (plavi histogram) i 15 dana (narančasti histogram).



Slika 5. Grafički prikaz zastupljenosti autofagije u D54 neurosferama. Stupci su prikazani kao srednja vrijednost intenziteta fluorescencije sferoida starih 5, 10 i 15 dana analiziranih u duplikatu sa standardnim devijacijama. Na grafu SF5 označuje neurosfere uzgajane kroz 5 dana, SF10 neurosfere uzgajane kroz 10 dana i SF15 neurosfere uzgajane kroz 15 dana. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) određena je ANOVA statističkim testom s Bonferroni korekcijama i označena (*).

6. RASPRAVA

U posljednja dva desetljeća bilježi se sve veća upotreba 3D staničnih kultura u istraživanjima raka i lijekova (19). Svojim mogućnostima kao što su očuvanje prirodnog oblika stanica, nejednaka raspodjela hranjivih tvari iz medija, postojanje stanica u različitim stadijima te otpornost na lijekove, sferoidna stanična kultura čini *in vitro* model s visokim potencijalom oponašanja složene interakcije stanica sličan onome *in vivo* (19, 20).

Čimbenici poput mikrookoline, izvanstaničnog matriksa i stresa utječu na metastaziranje raka. Nedostatak hranjivih tvari i kisika ima važnu ulogu u angiogenezi i razini agresije tumora (26). Iz tog razloga, 3D uzgoj stanica pogodniji je za proučavanje tumora od uzgoja stanica u monosloju. Razlika rezultata ispitivanja i prednost 3D stanične kulture vidljiva je i na istraživanjima protutumorskih lijekova. Primjerice, neki lijekovi koji su na 2D staničnoj kulturi pokazali učinkovitost, u stvarnih bolesnika imaju slabo ili nikakvo djelovanje. Ta pojava objašnjava se manjkom složene trodimenzionalne okoline i interakcije među stanicama koje su prisutne u ljudskom organizmu. S druge strane, stanice raka jetre u 3D kulturi pokazuju identičnu razinu rezistencije na lijekove kao i solidni tumori *in vivo*. Iz sličnih istraživanja može se zaključiti kako osjetljivost stanica raka na lijekove znatno ovisi o mikrookruženju stanica te je zato nepouzdana procjena učinkovitosti na stanicama koje rastu u monosloju (27).

Zbog velike i nekontrolirane proliferacije tijekom karcinogeneze tkivo postaje hipoksično jer raste potreba za kisikom i hranjivim tvarima (13, 14). Kako su hipoksija i nekroza normalna pojava u tumoru, pojavljuju se i tijekom *in vitro* uzgoja sferoida. Dostupnost hranjivih tvari i kisika uvjetuju postojanje triju zona u sferoidu. Od nekrotične zone prema proliferirajućoj dostupnost hranjivih tvari i kisika se povećava. Stanice koje nemaju dovoljno kisika i nutrijenata zbog gladovanja umiru. Zona između stanica u nekrozi i proliferirajuće, „mirna” zona, ima mogućnost otpuštanja faktora rasta uslijed nedostatka hrane i kisika što dovodi do angiogeneze kako bi se osigurala dostupnost kisika i nutrijenata za tumorske stanice (12, 28). Hipoksične stanice potiču aktiviranje hipoksija-inducibilnog faktora 1- α (*engl. HIF-1 α - hypoxia-inducible factor 1 α*) koji potiče autofagiju regulacijom transkripcije gena autofagije (12). Da hipoksija, tj. nedovoljna oksigenacija omogućuje širenje tumora na zdravo tkivo dokazano je i u samih pacijenata koji

boluju od glioblastoma. Širenje tumora otežava liječenje koje se sastoji od operacije i kemoterapije te je glavni uzrok smrti u oboljelih (29).

Daljnji razvoj studija u 3D kulturama posebno može unaprijediti proučavanje procesa autofagije. Sukladno boljoj sposobnosti oponašanja mikrookoline tumora, sve je više dokaza boljeg prikazivanja autofagije 3D staničnim modelima nego 2D. Neke od glavnih značajki 3D kultura, difuzija hranjivih tvari i kisika, regulatori su autofagije. Osim toga, utvrđene su i razlike u signalnim putevima između 2D i 3D uzgoja stanica (30). Grimes et al. proučavali su u sferoidima raspodjelu kisika, regulatora autofagije. Rezultati su pokazali povećanje hipoksične i nekrotične zone povećanjem promjera sferoida. Däster et al. su nakon uzgoja sferoida različitih promjera metodom viseće kapi zaključili kako se nekrotične regije pojavljuju u sferoidima promjera većeg od 500 μm , tj. rast zone nekroze proporcionalan je rastu samog sferoida. Hu i Li, proučavajući drugi regulator autofagije, koncentraciju nutritivnih tvari, zaključili su kako dostupnost nutrijenata unutar sferoida opada njegovim rastom (28).

Shodno navedenim istraživanjima, u ovome pokusu na neurosferama dobivenih iz glioblastoma, rastom sferoida rasla je i zona nekroze, tj. zona mrtvih stanica što je rezultiralo smanjenjem razine autofagije. Uspoređivanjem srednjih vrijednosti fluorescencije stanica, tj. stanica u autofagiji, dokazana je statistički značajna razlika među svim populacijama stanica. Najveća razlika zamijećena je između neurosfera uzgajanih kroz 5 i 10 dana, gdje je došlo i do većeg rasta sfera odnosno do vidljivijeg smanjenja autofagije. Dok je usporen rast sfere kroz narednih 5 dana odražen kroz nešto manju razliku između uzgoja kroz 10 i 15 dana.

Proučavanje autofagije postaje sve važnije u istraživanju mogućnosti liječenja raka. Njezina uloga u karcinomu je dvojaka – smatra se kako sprječava nastanak, ali jednom kada do njega dođe ona stanicama raka omogućuje rast i preživljenje (31). Glioblastom, kao tumor s procjenom života 15 mjeseci nakon dijagnoze unatoč brojnim načinima liječenja, najčešći je i najagresivniji tumor mozga. Rezistentnost terapiji pokazuje zbog mutiranog genoma koji rezultira većoj proliferaciji stanica, angiogenezi i izbjegavanju apoptoze. Zbog defektne apoptoze, potaknuta autofagija mogla bi biti potencijalan način uklanjanja tumorskih stanica. Kao što je spomenuto, autofagija može i poticati i suprimirati tumor stoga je put autofagije kao način liječenja tumora potrebno modulirati da djeluje kao „ubojica” stanica (12). Istraživanja pokazuju kako promotori autofagije u početnim, premalignim lezijama sprječavaju pojavu tumora dok u kasnijim

stadijima tumora i promotori i supresori autofagije pokazuju potencijal za liječenje. Unatoč tome, naglasak u liječenju je na sprječavanju autofagije (31).

Zaključno, kontrolirani pokus određivanja zastupljenosti autofagije u sferoidima ponovljiv je. Postoje veliki izgledi za spajanje kvaliteta 2D staničnih kultura i korištenja životinjskih modela pomoću uzgoja stanica u sferoidima te su potrebna buduća istraživanja za pronalazak jednostavnijeg i bržeg načina uspostave 3D staničnih kultura u svrhu istraživanja raka te lijekova.

7. ZAKLJUČAK

Nakon provedenog istraživanja zastupljenosti autofagije na sferoidima uzgajanim različiti broj dana može se zaključiti:

- Dokazana je statistički značajna razlika srednjih vrijednosti intenziteta fluorescencije tj. autofagije u sferoidima formiranim tijekom 5, 10 te 15 dana.
- Razina autofagije smanjuje se od sferoida starih 5 dana prema sferoidima starim 15 dana
- Proces autofagije potencijalna je meta u terapiji raka.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Odrediti zastupljenost autofagije u neurosferama dobivenih iz glioblastoma te utvrditi ima li ulogu vremenski period uzgoja neurosfera na pojavnost autofagije.

Nacrt studije: Rad je koncipiran kao *in vitro* studija (kontrolirani pokus).

Materijal i metode: Stanična linija D54 nakon uzgoja i kultivacije u inkubatoru nasadena je na mikrotitarsku pločicu sa tzv. V dnom kako bi se omogućilo formiranje sfera. Sferoidi su tako uzgajani kroz 5, 10 i 15 dana. Po isteku vremena stanice su tretirane tripsinom kako bi se razdvojile na pojedinačne stanice koje će se detektirati protočnim citometrom. Za detekciju autofagije obojane su acridin orange fluorescentnom bojom. Izmjerena fluorescencija proporcionalna je razini autofagije u stanicama. Uzorci su analizirani u duplikatu na BD FACScanto II protočnom citometru te su rezultati obrađeni programom FlowJo.

Rezultati: Duljim uzgojem sferoida razina autofagije opada. Dokazana je statistički značajna razlika međusobnim uspoređivanjem sferoida formiranih tijekom 5, 10 i 15 dana.

Zaključak: Regulatori autofagije su raspodjela hranjivih tvari i kisika koja u 3D staničnoj kulturi više sličići onoj u ljudskom organizmu nego što je slučaj u 2D staničnoj kulturi. Razina autofagije smanjuje se od sferoida starih 5 dana prema sferoidima starim 15 dana jer rastom sferoida raste i zona mrtvih stanica.

Ključne riječi: 3D stanična kultura; autofagija; glioblastom; protočna citometrija; sferoidi; zona nekroze

9. SUMMARY

Autophagy abundance in neurospheres derived from glioblastoma cells

Objectives: The aim of this study is to determine the rate of autophagy in neurospheres derived from glioblastoma cells and to establish whether the time period of cultivation of spheres affects the occurrence of autophagy.

Study design: The study is designed as a controlled experiment.

Materials and Methods: After cultivation, the D54 cells were seeded on a V bottom microtiter plates to allow the formation of spheres. Spheroid were grown for 5, 10 and 15 days. The cells were treated with trypsin to separate the cells which are later detected by a flow cytometer. For autophagy detection, cells were stained with a fluorescent dye, acridine orange. The measured fluorescence is proportional to the level of autophagy. Samples were analyzed in duplicate on a BD FACScanto II flow cytometer and the results were processed by the FlowJo program.

Results: With prolonged spheroid cultivation, the level of autophagy decreases. A statistically significant difference was proven by comparing spheroids formed during 5, 10 and 15 days.

Conclusion: Distribution of nutrients and oxygen regulate autophagy and are more similar to the one in the human body in 3D cell culture than in the 2D cell culture. The level of autophagy decreases from 5-day-old spheroids to 15-day-old spheroids because as spheroids grow, so does the zone of dead cells.

Key words: 3D cell culture; autophagy; glioblastoma; flow cytometry; spheroids; zone of necrosis

10. LITERATURA

1. Denton D, Kumar S. Autophagy-dependent cell death [Internet]. Vol. 26, Cell Death and Differentiation. Nature Publishing Group; 2019; p. 605–16.
2. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004 Apr 1;6(4):463–77.
3. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010; 221(1):3–12.
4. Lin L, Baehrecke EH. Autophagy, cell death, and cancer. *Mol Cell Oncol*. 2015 Jul 3;2(3).
5. Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res*. 2014 Jan 24;24(1):9–23.
6. Cooper G, Hausman R. Stanica; molekularni pristup. Treće izdanje. Lauc G, editor. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. 313–317 p.
7. Ghosh R, Pattison JS. Macroautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy in Heart Failure: The Known and the Unknown. *Oxid Med Cell Longev*. 2018.
8. Yim WWY, Mizushima N. Lysosome biology in autophagy. *Cell Discov* [Internet]. 2020 Dec 1; 6(1):6.
9. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J*. 2017 Jul 3; 36(13):1811–36.
10. Auzmendi-Iriarte J, Matheu A. Impact of Chaperone-Mediated Autophagy in Brain Aging: Neurodegenerative Diseases and Glioblastoma. *Front Aging Neurosci*. 2021 Jan 28; 12:509.
11. Chavez-Dominguez R, Perez-Medina M, Lopez-Gonzalez JS, Galicia-Velasco M, Aguilar-Cazares D. The Double-Edge Sword of Autophagy in Cancer: From Tumor Suppression to Pro-tumor Activity. Vol. 10, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
12. Escamilla-Ramírez A, Castillo-Rodríguez RA, Zavala-Vega S, Jimenez-Farfan D, Anaya-Rubio I, Briseño E, et al. Autophagy as a potential therapy for malignant glioma. Vol. 13, *Pharmaceuticals*. MDPI AG; 2020. p. 1–76.

13. Amaravadi RK, Kimmelman AC, Debnath J. Targeting autophagy in cancer: Recent advances and future directions. Vol. 9, *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc.; 2019. p. 1167–81.
14. Simpson JE, Gammoh N. The impact of autophagy during the development and survival of glioblastoma: Role of autophagy in glioblastoma. *Open Biol*. 2020 Sep 1; 10(9).
15. Yun CW, Lee SH. The roles of autophagy in cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):1–18.
16. Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. Vol. 21, *Cellular and Molecular Biology Letters*. BioMed Central Ltd.; 2016. p. 29.
17. Segeritz CP, Vallier L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. *Basic Sci Methods Clin Res*. 2017 Apr 14; 151–72.
18. Radošević K. Kulture životinjskih stanica. *Osvježimo znanje*. 2020;69:561–2.
19. Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci*. 2020;7(March):1–15.
20. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. Vol. 12, *Assay and Drug Development Technologies*. Mary Ann Liebert Inc.; 2014. p. 207–18.
21. Haycock JW. Chapter 1 and Techniques. *3D Cell Cult Methods Protoc Methods Mol Biol*. 2011;695(January 2011):1–15.
22. Špoljarić KM, Jukić M, Opačak-Bernardi T, Glavaš-Obrovac L. 3D Cell Technology in Biomedical Research. *Coll Antropol*. 2020;44(3):171–4.
23. Group A, Ravenscroft SM, Gitschier HJ, Randle DH, Walker P. Comparison of Ultra-Low Attachment Spheroid Microplates and Hanging Drop Microtissue Formation for High Content Screening Sn APP Shots. :1–4.
24. Guyon J, Andrique L, Pujol N, Røsland GV, Bikfalvi A, Daubon T, et al. A 3D Spheroid Model for Glioblastoma. 2020;

25. Addinsoft (2021). XLSTAT statistical and data analysis solution. New York, USA.
<https://www.xlstat.com>.
26. Gayan S, Teli A, Nair A, Dey T. Nutritional stress alone can control *in vitro* tumor formation and its invasive nature. 2020.
27. Donglai Lv Zongtao Hu Lin Lu Husheng Lu Xiuli Xu. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncology Letters*; 2017
28. Barisam M, Saidi M, Kashaninejad N, Nguyen N. Prediction of Necrotic Core and Hypoxic Zone of Multicellular Spheroids in a Microbioreactor with a U-Shaped Barrier. *Micromachines*; 2018.
29. Monteiro A R, Hill R, Pilkington G, Madureira P. The role of Hypoxia in Glioblastoma Invasion. *Cells*; 2017.
30. Follo C, Barbone D, Richards W et al. Autophagy in 3D In Vitro and Ex Vivo Cancer Models. *Methods in Molecular Biology*; 2019.
31. Mulcahy Levy J, Towers C, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*; 2017.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

- Ime i prezime: Ivona Sivonjić
- Datum i mjesto rođenja: 28.10.1999., Vinkovci
- e-mail: ivona.sivonjic@gmail.com

Obrazovanje:

- 2014.-2018. Opća gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci
- 2018.-2021. Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku