

Udio apoptotskih stanica u uzorcima 3D sferoida glioblastoma različite veličine

Tomić, Nikolina

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:152:878902>

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**

Nikolina Tomić

**UDIO APOPTOTSKIH STANICA U
UZORCIMA 3D SFEROIDA
GLIOBLASTOMA RAZLIČITE
VELIČINE**

Završni rad

Osijek, 2021.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Nikolina Tomić

**UDIO APOPTOTSKIH STANICA U
UZORCIMA 3D SFEROIDA
GLIOBLASTOMA RAZLIČITE
VELIČINE**

Završni rad

Osijek, 2021.

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

Mentor: doc.dr.sc. Teuta Opačak-Bernardi.

Rad ima 24 lista, 6 slika i 1 tablicu.

Zahvala

Svima onima koji su na bilo koji način sudjelovali u izradi ovoga rada zahvaljujem od srca. Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorici, doc.dr.sc. Teuti Opačak-Bernardi na uloženom vremenu i trudu te stručnom vodstvu i prenesenom znanju.

Veliko hvala mojoj obitelji, posebice roditeljima koji su mi omogućili školovanje, podupirali me i pružili mi sve što mi je potrebno.

Zahvaljujem mojim prijateljicama za sve korisne savjete.

Hvala svim kolegama na nesebičnoj suradnji.

Posebnu zahvalnost dugujem Anti, mom najvećem osloncu, na bezuvjetnoj podršci, strpljenju i vjeri u moj uspjeh.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Glioblastom.....	1
1.2. Stanična smrt	1
1.3. Apoptoza.....	2
1.4. Protočna citometrija.....	3
1.5. Sferoidi kao vrsta 3D staničnih kultura	4
1.5.1. Magnetska levitacija.....	5
2. HIPOTEZA	7
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	8
4. MATERIJALI I METODE	9
4.1. Ustroj studije.....	9
4.2. Materijali.....	9
4.2.1. Stanične linije	9
4.2.2. Kemikalije i pribor	9
4.3. Metode	10
4.3.1. Kultivacija i održavanje stanica in vitro	10
4.3.2. Određivanje broja vijabilnih stanica (kontrola preživljenja bojanjem).....	10
4.3.3. Formiranje sferoida magnetskom levitacijom	11
4.3.4. Priprema uzoraka za protočnu citometriju	12
4.3.5. Statistička obrada podataka	12
5. REZULTATI.....	13
5.1. Analiza udjela stanica u apoptozi protočnom citometrijom	13
6. RASPRAVA	17
7. ZAKLJUČAK	19
8. SAŽETAK	20
9. SUMMARY	21
10. LITERATURA.....	22
11. ŽIVOTOPIS	24

POPIS KRATICA

Apaf-1	aktivirajući faktor-1 apoptozne proteaze
Bax	Bcl-2-pridruženi x protein (eng. <i>Bcl-2-associated X protein</i>)
Bcl-2	B-stanični limfom 2 protein (eng. <i>B-cell lymphoma 2</i>)
Bcl-xL	B-stanični limfom-ekstra velik (eng. <i>B-cell lymphoma-extra large</i>)
DISC	signalni kompleks koji inducira smrt (eng. <i>death inducing signaling complex</i>)
DMEM	Dulbecco modificirani Eagleov medij
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ECM	izvanstanični matriks (eng. <i>extracellular matrix</i>)
Fas-L	Fas ligand
FITC	fluorescin izocijanat
HIF-1 α	hipoksijom inducirani faktor 1 alfa (eng. <i>hypoxia-induced factor 1 alpha</i>)
HIF-2 α	hipoksijom inducirani faktor 2 alfa (eng. <i>hypoxia-induced factor 2 alpha</i>)
PBS	fosfatni pufer (eng. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PI	propidij jodid
TNF	faktor tumorske nekroze (eng. <i>tumor necrosis factor</i>)
TRAIL-R	receptor za ligand koji inducira apoptozu povezan s TNF (eng. <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor</i>)
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (eng. <i>vascular endothelial growth factor</i>)

1. UVOD

1.1. Glioblastom

Gliomi se odnose na intra-aksijalne tumore koji potječu iz glija stanica središnjeg živčanog sustava. Ovisno o razini malignosti novotvorenina i histopatološkoj procjeni, gliomi su klasificirani u četiri stupnja. Četvrti (IV.) stupanj glioma povezan je sa brzim napredovanjem bolesti i čestom lošom prognozom. Najozbiljniji podtip glioma IV. stupnja, glioblastom, najčešći je i najagresivniji tumor sa slabim preživljenjem. Unatoč agresivnim pristupima liječenja, prosječan period preživljavanja nakon liječenja iznosi jednu godinu. Visoka otpornost na apoptozu uzrokuje probleme u liječenju glioblastoma. Također, zaštitna uloga krvno-moždane barijere smanjuje količinu dostupnih terapijskih opcija. Nadalje, antitumorski lijekovi i radioterapija utječu na regulaciju apoptoze u stanicama glioblastoma, aktivirajući mehanizme preživljavanja koji liječenje čine neučinkovitim (1, 2). Karakteristike mikrokoliša jasno utječu na ponašanje matičnih stanica glioblastoma. Matične stanice u hipoksičnoj srži odgovorne su za infiltraciju zdravog tkiva, izbjegavanje apoptoze i progresiju tumora. Hipoksija je jedna od najmoćnijih pokretačkih snaga angiogeneze tumora. Naime, dokazano je da hipoksični uvjeti olakšavaju samoobnavljanje matičnih stanica glioblastoma. Hipoksijom inducirani faktor-1 α (HIF-1 α) i hipoksijom inducirani faktor 2 alfa (HIF-2 α), kao i karboanhidraza IX, podržavaju maligni potencijal i povezani su s lošom prognozom pacijenata. Također, niska razina kisika vodi ka proizvodnji čimbenika poput VEGF-a (vaskularni endotelni faktor rasta) koji polarizira imunološke stanice u imunosupresivni fenotip, što uzrokuje otpornost tumora na imunoterapiju. Identifikacija mehanizama preživljavanja tumorskih stanica te mehanizama koji uzrokuju smanjenu apoptotičnu aktivnost, koristeći 3D (trodimenzionalne) stanične linije, u budućnosti bi mogla rezultirati pronalaskom adekvatnije terapije (3).

1.2. Stanična smrt

Stanična smrt ključan je proces u održavanju tkivne homeostaze i integriteta. Kako bi višestanični organizmi očuvali ravnotežu između stvaranja i gubitka stanica, uz stvaranje novih stanica i proliferaciju, neophodno je uklanjanje neželjenih stanica koje se odvija putem stanične smrti. Eliminacija stanica prisutna je u embrionalnom razvoju, atrofiji tkiva, metamorfozi, sazrijevanju imunološkog sustava, ali i u mehanizmima nastanka određenih bolesti (4). Poznata

tri tipa stanične smrti su: nekroza, autofagija i programirana stanična smrt ili apoptoza. Izvršenje svih tipova odvija se signalnim putevima koji nastaju kao odgovor na razne podražaje (5). Kerr i suradnici godine 1972. predlažu pojam apoptoze, danas najistraženiji mehanizam stanične smrti koji se morfološkim karakteristikama razlikuje od nekroze stanica i autofagije (4).

1.3. Apoptoza

Apoptoza ili programirana stanična smrt strogo je regulirana vrsta stanične smrti u kojoj se uz pomoć proteina kaspaza odvija tzv. samoubojstvo stanice kako bi se uklonile štetne ili nepotrebne stanice. Također se javlja kao obrambeni mehanizam u slučaju da su stanice bile izložene štetnim agensima (6). Pretjerana ili pak nedostatna apoptoza čimbenik je mnogih patoloških stanja, uključujući razne tipove tumora (7). Ključnu ulogu u izvršenju apoptoze imaju kaspaze, obitelj cisteinskih proteaza koje imaju sposobnost selektivnog cijepanja proteina na C-terminalnom dijelu aspartata. Kaspaze su sintetizirane kao inaktivni zimogeni, odnosno prokaspaze koje se aktiviraju određenim stimulansima. Nakon što ih određeni apoptotski signal aktivira, prokaspaze se podijele u manje i veće podjedinice formirajući heterodimere te dva takva dimera zatim stvaraju aktivni tetramer (5, 6). Postoje dva signalna puta aktivacije programirane stanične smrti: unutarstanični i izvanstanični (4). Unutarstanični put apoptoze, također zvan mitohondrijski put, aktivira se kao odgovor na oštećenje DNA molekule ili oksidativni stres. Naime, mitohondrijska membrana i citoplazma u fiziološkim uvjetima luče anti-apoptotske proteine Bcl-2 (B stanični limfom 2 protein) i Bcl-xL (eng. *Bcl-2-associated X protein*) koji čuvaju integritet mitohondrijske membrane sprječavajući izlazak citokroma C u citoplazmu. Međutim, zbog ozljeda molekula DNA ili staničnog stresa, pro-apoptotski članovi Bcl-2 porodice (primjerice Bcl-2-pridruženi x protein, odnosno Bax) tvore kanale u mitohondrijskoj membrani. Tvoreći pore u mitohondrijskoj membrani, Bax (Bcl-2-pridruženi x protein) dozvoljava ispuštanje citokroma C u citoplazmu. Citokrom C veže protein Apaf-1 (aktivirajući faktor-1 apoptozne proteaze), tako tvoreći kompleks apoptosom. Apoptosom zatim veže kaspazu-9, koja kao inicijator kaspaze aktivira egzekutorske kaspazu-3 i kaspazu-6, što u konačnici vodi do apoptoze (4, 6, 7). Vanjski put aktivacije podrazumijeva vezanje signalnih molekula poput Fas-L (Fas ligand), TNF (eng. *tumor necrosis factor*), TRAIL-R (eng. *TNF-related apoptosis-inducing ligand- receptor*) za staničnu površinu, odnosno vezanje takozvanih receptora smrti. Vezivanje liganada na receptore će aktivirati DISC (eng. *death inducing*

signaling complex), kojeg čine adaptorska molekula i vezana kaspaza-8. Osim što započinje kaskadnu aktivaciju, kaspaza-8 (koja predstavlja izvršnu fazu vanjskog puta apoptoze) može aktivirati unutarnji put apoptoze (8, 9). Oba apoptotska puta uzrokuju morfološke promjene stanice koje uključuju: smanjenje veličine stanice, bubrenje membrane, kondenzaciju kromatina i fragmentaciju deoksiribonukleinske kiseline (DNA). Nadalje, formiraju se apoptotska tjelešca koja se sastoje od citoplazme sa gusto zbijenim organelima. Biokemijske promjene uključuju aktivaciju kaspaza i premještanje fosfatidilserina na staničnu površinu gdje ga prepoznaju receptori izraženi na makrofagima. Na osnovi morfoloških i biokemijskih promjena specijalizirani fagociti i susjedne stanice prepoznaju apoptotska tjelešca te ih eliminiraju putem fagocitoze. Budući da ne postoji proizvodnja protuupalnih citokina niti se stanični sadržaj ispušta u okolno tkivo, apoptotične stanice ne izazivaju upalni odgovor organizma (10, 11).

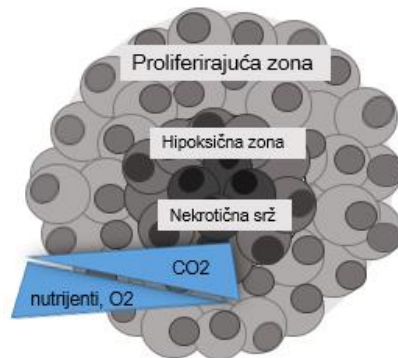
1.4. Protočna citometrija

Budući da se njome može uočiti većina apoptotskih obilježja, protočna citometrija metoda je izbora za detekciju i kvantifikaciju apoptoze. Ova metoda moćan je alat koji se primjenjuje i u imunologiji, molekularnoj biologiji, proučavanju tumora i praćenju infektivnih bolesti. Protočna citometrija nudi brzo vrijeme analize, mogućnost proučavanja velikog broja zasebnih stanica te pregled ekspresije raznih proteina kao što su indikatori apoptoze. Naime, protočnom se citometrijom uz pomoć fluorescentno obilježenih antitijela može određivati bilo koji površinski protein koji mijenja svoju ekspresiju tijekom apoptoze. Protočni citometri koriste lasere kao izvore svjetlosti za proizvodnju raspršenih i fluorescencijskih svjetlosnih signala koji se očitavaju detektorima poput fotomultiplikatora. Stanične populacije analiziraju se na njihovim karakteristikama rasipanja svjetlosti. Koriste se razni fluorescencijski reagensi poput fluorescentno konjugiranih protutijela i fluorescentnih ekspresijskih proteina. Ispitivanje apoptoze protočnom citometrijom temelji se na aktivaciji kaspaza, mitohondrijskom potencijalu, apoptotskim promjenama u membrani ili procjeni frakcijskog sadržaja DNA. Odabir metode ovisi o vrsti stanica i željenoj informaciji, a detekcija apoptotskih obilježja moguća je u ranim, srednjim i kasnim fazama apoptoze (12). U ranim fazama apoptoze događaju se promjene na površini stanice. Jedna od promjena plazmatske membrane je translokacija fosfatidilserina s unutarnje strane plazmatske membrane na vanjsku stranu, što ga čini izloženim na površini stanice. Annexin V je protein koji ima visoki afinitet za vezanje

fosfatidilserina. Obilježen fluorescein izocijanatom (FITC), detektira početnu fazu apoptoze u kojoj je stanična membrana još očuvana. Međutim, translokacija fosfatidilserina nije svojstvena samo za apoptozu, već se događa i tijekom nekroze stanica. Razlika između ova dva oblika stanične smrti je u tome što tijekom početnih faza apoptoze stanična membrana ostaje netaknuta, dok u trenutku kada se dogodi nekroza stanična membrana gubi svoj integritet i postaje propusna. Za razlikovanje apoptoze od nekroze te rane od kasne apoptoze, koristi se bojanje propidij jodidom (PI) koji veže DNA molekule. Zbog sposobnosti ulaska u stanice s oštećenom membranom, propidij jodid služi kao indikator kasne apoptoze (13).

1.5. Sferoidi kao vrsta 3D staničnih kultura

Trodimenzionalne (3D) stanične kulture postaju sve popularnije u tumorskim istraživanjima zbog sposobnosti oponašanja ljudskih tkiva. 3D stanični modeli, poput sferoida, nalikuju prirodnom staničnom mikrookolišu te na taj način nude bolji uvid u fiziološke karakteristike tumora, u čemu se dvodimenzionalni (2D) modeli nisu pokazali jednako uspješnim (14). Budući da se u živućem tkivu odvija komunikacija između stanica i izvanstaničnog matriksa (eng. *extracellular matrix*, *ECM*) te međustanična komunikacija, jednoslojne dvodimenzionalne stanične kulture neadekvatno oponašaju prirodno okruženje stanica. Sferoidi učinkovitije oponašaju tumore od 2D kultura jer, slično kao i tumori, sadrže površinske proliferirajuće i neproliferirajuće stanice srži te dobro oksigenirane i hipoksične stanice. Sferoidi su trodimenzionalni stanični agregati koji imaju sposobnost rasta i proliferacije. Sastoje se od stanica koje su smještene u više slojeva što im omogućava interakciju između stanica i ECM. Iako posjeduju sposobnost samokreiranja u uvjetima koji sprječavaju prijanjanje za ravnu površinu, sferoidi ne podliježu diferencijaciji i formiranju kompleksnijih struktura. Unutar slojeva sferoidne strukture postoje stanice u različitim fazama rasta (proliferirajuće, hipoksične, nekrotizirajuće, apoptotične stanice) koje ovise o gradijentu hranjivih tvari i razini kisika. Vanjski sloj sferoida sastoji se od proliferirajućih stanica budući da su izložene nutrijentima iz staničnog medija te tvore tzv. proliferirajuću zonu (eng. *proliferation zone*). Zbog slabe difuzije kisika i hranjivog medija, unutar sferoida dolazi do stvaranja srži (Slika 1). Stanice srži tvore hipoksičnu zonu (eng. *hypoxic/quiescent zone*), sa nekrotizirajućim ili apoptotskim stanicama u sredini (eng. *necrotic core*). Veći sferoidi održavaju gradijente kisika i hranjivih sastojaka na razini koja rezultira stvaranjem nekrotične srži slične onoj u slabo vaskulariziranim tumorima. Sferoid na taj način oponaša rastući tumor (15).



Slika 1. Shematski prikaz strukture sferoida. Vanjski sloj stanica tvori proliferirajuću zonu. Hipoksična zona unutar srži sastoji se od stanica u nekrozi i apoptozi. Izvor: izradila autorica rada.

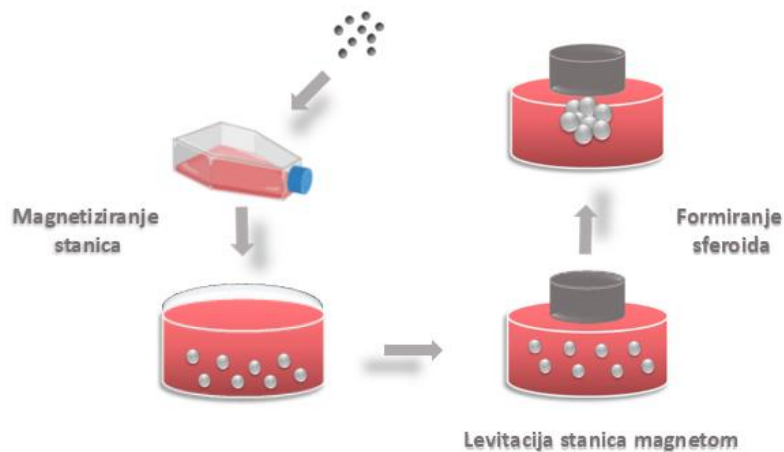
Udio apoptotskih stanica u srži ovisi o vrsti stanica od kojih se sferoid sastoji, metodi formiranja sferoida i njegovoj veličini. Također, udio apoptotskih stanica ukazuje na staničnu sposobnost izbjegavanja apoptoze u nepovoljnim uvjetima (15, 16). Tumori se sastoje od tumorskih stanica, stromalnih stanica i komponenti izvanstaničnog matriksa koje se mogu naći i u mikrookruženju sferoida, gdje je moguća i međustanična interakcija koja regulira ponašanje i funkciju stanica. Višestanični tumorski sferoidi podsjećaju na avaskularne tumorske čvorove ili intravaskularne regije velikih tumora s obzirom na njihove morfološke značajke, kinetiku rasta, mikrookoliš, raspodjelu hranjivih tvari i staničnu proliferaciju (17).

1.5.1. Magnetska levitacija

Magnetska levitacija jedna je od metoda formiranja staničnih sferoida prilikom koje stanice agregiraju i tvore veće strukture pri tome sintetizirajući proteine izvanstaničnog matriksa kao što su kolagen, fibronektin i laminin. Zadržavajući staničnu aktivnost, stanice se zahvaljujući ovoj metodi udružuju u trodimenzionalnu strukturu i proizvode ECM. Vanjsko magnetno polje levitira stanice s dna na granicu medija i zraka te im tako omogućuje samostalnu orijentaciju (Slika 2). Prednosti ove metode su neometani metabolizam i proliferacija stanica. Izlaganje

Uvod

magnetskom polju nema utjecaj na induciranje upalnog odgovora uzgajanih stanica. Također, prostornom kontrolom magnetskog polja može se manipulirati geometrijom stanične mase i postići višestanično grupiranje različitih tipova stanica u zajedničkoj kulturi. Nadalje, magnetom levitirane stanice humanog glioblastoma pokazale su profile ekspresije proteina slične onima koji su uočeni u ksenograftovima humanog tumora. Poznato je da 3D sferoidne stanične kulture imaju značajnu ulogu u neuro-onkološkim istraživanjima, a korištenje tumorskih sferoida prije svega rezultira boljim razumijevanjem metastaziranja i angiogeneze. Uz to, tumorski sferoidi neprocjenjiv su alat za ispitivanje tumorske terapije budući da slaba penetracija lijekova u hipoksičnu zonu može biti uzrok slabog terapijskog odgovora (16, 17).



Slika 2. Shematski prikaz formiranja sferoida magnetskom levitacijom. Izvor: izradila autorica rada.

2. HIPOTEZA

Duži period rasta rezultira većim udjelom apoptotskih stanica.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog istraživanja odrediti udio apoptotskih stanica u sferoidima formiranim metodom magnetske levitacije nakon 5, 10 i 15 dana rasta.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Rad je osmišljen kao pokusno istraživanje (18). Provedeno je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku u periodu od travnja do lipnja 2021. godine.

4.2. Materijali

4.2.1. Stanične linije

Za određivanje udjela apoptoze nakon 5, 10 i 15 dana rasta korištene su adherentne stanice glioblastoma, odnosno stanična linija D54.

4.2.2. Kemikalije i pribor

Kemikalije i pribor korišteni tijekom rada su sljedeći :

- DMEM Dulbecco modificirani Eagleov medij sa 4500 mg/L glukoze, L-glutaminom, natrijevim hidrogenkarbonatom, kompletiran 10 %-tnim FBS-om (fetalni goveđi serum), 1 %-tnim anti-anti (antimikotik, antibiotik) te 1 %-tnim glutamaxom, Sigma-Aldrich (Velika Britanija)
- Tripsin / EDTA, tripsin 0,25 % (1Mm EDTA-Na₄ u HBSS s phenol red), Panbiotech (Aidenbach, Njemačka)
- PBS pufer - izotonična otopina; fosfatom puferirana otopina soli
- Set za detekciju apoptoze AlexaFluor 488 (Annexin V/ Dead cell apoptosis kit), Life Technologies GmbH /ThermoFisher Scientific (Eugene, Oregon, SAD)
- Ploča s jažicama za magnetsku levitaciju (Cell culture multiwell plate), CELLSTAR®, Greiner Bio-One (Njemačka)
- Ploča s magnetima za magnetsku levitaciju (Concentrating drive), Greiner Bio-One (SAD)
- Magnetne čestice NanoShuttle™, Greiner Bio-One

Materijali i metode

- Boce za uzgoj adherentnih stanica, 25 cm², Nunc™
- Bürker-Türkova komorica za brojanje stanica

4.3. Metode

4.3.1. Kultivacija i održavanje stanica in vitro

Rad sa staničnim kulturama odvija se sterilnim tehnikama rukovanja u sterilnom kabinetu s laminarnim protokom zraka. Koriste se sterilni mediji, kemikalije i laboratorijska oprema koja se obavezno prije unosa u kabinet prebriše alkoholom.

Stanična linija D54 nasađena je u boci za uzgoj površine 25 cm² (Nunc™ EasYFlask™ Cell Culture Flasks, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) te je držana u inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) u atmosferi s 5 % CO₂ te pri temperaturi od 37°C. Korišten je DMEM medij za održavanje s dodatkom 10 %-tnog FBS-a (fetalni goveđi serum), 4500 mg/L glukoze, natrijevog hidrogenkarbonata, L-glutamina i 1 %-tnog antimikotika-antibiotika (penicilin/streptomycin). DMEM medij korišten u daljnjem radu sa stanicama nije sadržavao dodatak antimikotika/antibiotika. Nakon što je tumorska stanična linija izvađena iz inkubatora u kojem je kultivirana, daljnje održavanje stanica temeljilo se na presađivanju. Za početak je uklonjen stari medij, nakon čega je slijedilo ispiranje stanica PBS-om koji uklanja ostatak medija. Budući da je D54 adherentna stanična linija, za odvajanje od podloge vršena je tripsinizacija. Nakon dodatka tripsina kultura je inkubirana 6 minuta na temperaturi od 37°C jer temperatura pospješuje odvajanje stanice od podloge. Nakon 6 minuta pod invertnim mikroskopom Zeiss Axiovert 25 (Njemačka) je provjereno jesu li se stanice odvojile, nakon čega su prikupljene u svježem mediju za pokus u Falcon epruvetu od 15 ml.

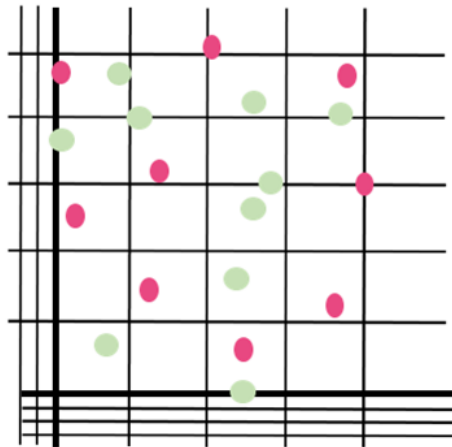
4.3.2. Određivanje broja vijabilnih stanica (kontrola preživljenja bojanjem)

Broj vijabilnih stanica u staničnoj kulturi određuje se uz pomoć eritrozina B (ružičaste) boje i Bürker-Türk-ove komorice za brojanje stanica. 100 µl boje i 50 µl stanične suspenzije nanosi se na komoricu za brojanje. Vijabilne stanice imaju sposobnost aktivnog izbacivanja boje, dok

će mrtve ili oštećene stanice poprimiti ružičastu boju. U Bürker-Türk-ovoj komorici broje se stanice u četiri vanjska kvadranta, uzimajući u obzir pravilo slova L koje nalaže da se broje i stanice koje se nalaze na linijama dvaju susjednih vanjskih stranica kvadranta (Slika 3). Ukupan broj vijabilnih stanica u 1 ml određen je pod invertnim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka) koristeći sljedeću formulu :

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

Pri tome R predstavlja ukupan broj vijabilnih stanica, N broj izbrojenih stanica, 4 je broj kvadranta komorice, a 3 je faktor razrjeđenja.



- Mrtve stanice koje ne brojimo
- Žive stanice koje brojimo

Slika 3. Shematski prikaz vijabilnih i mrtvih stanica u kvadrantu komorice. Izvor: izradila autorica rada.

4.3.3. Formiranje sferoida magnetskom levitacijom

Iz jednoslojnih (2D) stanica formirana je 3D kultura pomoću sustava za magnetnu levitaciju koji se sastoji od ploče s 24 jažice (Cell culture multiwell plate, Cellstar, Greiner Bio-One,

Njemačka) te 24 magneta (24 well concentrating drive, Greiner Bio-One, SAD) koji se postavje iznad jažica u kojima su stanice. Kako bi stanice postale magnetizirane, potrebno im je dodati magnetne čestice (NanoShuttle™, Greiner Bio-One) najranije 24 sata prije nasađivanja. Konfluentnost stanica na koje se dodaju magnetne čestice iznosila je 80 %. Na bočicu za uzgoj stanica koja ima površinu 25 cm² dodano je 100 µl magnetskih čestica, što znači da je po cm² dodano 4 µl magnetskih čestica. Slijedilo je presađivanje, brojenje stanica te računanje volumena medija i stanica koji se nanose u jažice sustava za magnetsku levitaciju. Nasađena je ploča sa 24 jažice u koncentraciji od 10⁴ stanica po jažici (u 350 µl medija). Na stanice je stavljena ploča s magnetima koja uzrokuje levitiranje stanica sa dna na granicu medija i zraka gdje se formiraju sferoidi. Stanice su prebačene u inkubator gdje su rasle 5, 10 i 15 dana, uz promjenu medija po potrebi.

4.3.4. Priprema uzoraka za protočnu citometriju

Stanice koje su rasle 5, 10 i 15 dana skupljene su i centrifugirane tijekom 6 minuta na 1100 rpm. Nakon ispiranja sa 1 ml PBS-a, stanice su ponovno centrifugirane. Nakon što su sferoidi skupljeni, dodano je 500 µl 0,05 % tripsina te su inkubirani 30 minuta na 37°C. Sferoidi su zatim razbijeni pipetiranjem. Bojenjem stanica kombinacijom Annexin V-FITC-a i propidij jodida omogućena je detekcija stanica u različitim fazama apoptoze. Stanice su resuspendirane u 100 µl annexin pufera. Dodan je 1 µl propidij jodida i 5 µl Annexin V-FITC-a. Uslijedila je inkubacija u mraku u trajanju od 15 minuta. Zatim je dodano 400 µl annexin pufera. Uzorak je neposredno prije protočne citometrije propušten kroz 40-mikronsku mrežicu.

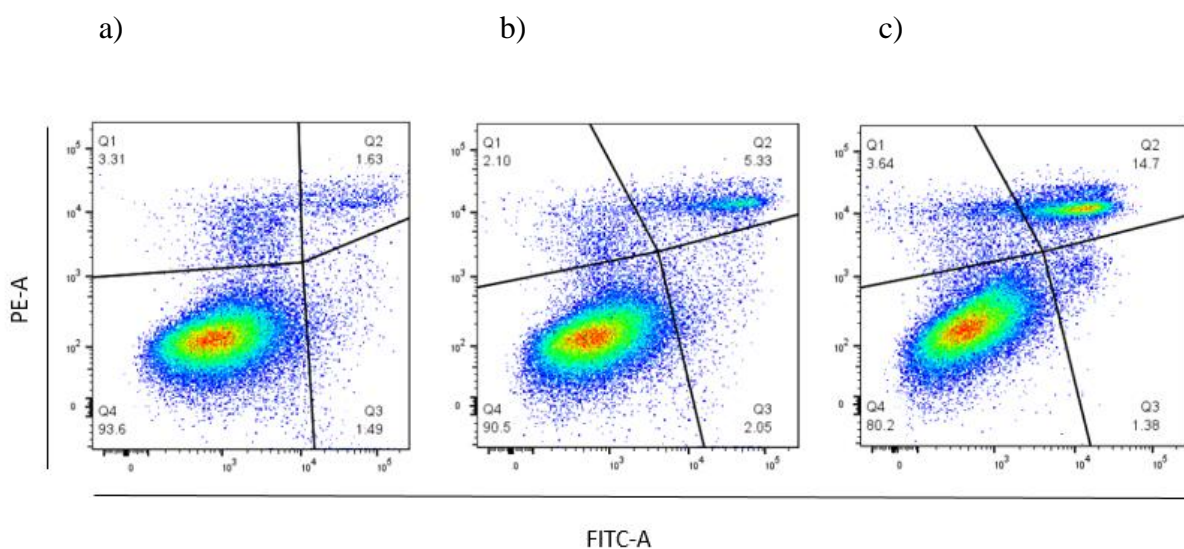
4.3.5. Statistička obrada podataka

Mjerenje udjela apoptotskih stanica 5., 10. i 15. dana izvedena su u triplikatu. Rezultati dobiveni na protočnom citometru analizirani su računalnim programom FlowJo software (v10.4.2., LLC, Data Analysis Software). Za statističku obradu podataka korišten je jednosmjerni ANOVA test s Bonfferoni korekcijom. Rezultati su prikazani grafički.

5. REZULTATI

5.1. Analiza udjela stanica u apoptozi protočnom citometrijom

Udio apoptotskih stanica u sferoidima stanične linije D54 nakon 5, 10 i 15 dana rasta određen je na protočnom citometru. Udjeli stanica analizirani su pomoću dijagrama gdje svaki kvadrant (Q1-Q4) predstavlja određenu staničnu populaciju-stanični debris (Q1), stanice u nekrozi (Q2), stanice u apoptozi (Q3) te populaciju zdravih stanica (Q4). Skupina stanica Q2 kvadranta su pozitivne na propidij jodid i na Annexin V FITC, što znači da su stanice tog kvadranta u stadiju nekroze. Q3 kvadrant pozitivan je na Annexin V FITC, što znači da se u njemu nalaze apoptotske stanice. Stanice Q4 kvadranta su zdrave stanice budući da nisu pozitivne niti na propidij jodid niti na Annexin V FITC. Prikazani su točkasti dijagrami protočnog citometra nakon 5, 10 i 15 dana sferoidnog rasta (Slika 4).



Slika 4. Točkasti dijagrami nakon: a) 5 dana rasta, b) 10 dana rasta, c) 15 dana rasta. Nekrotične stanice dvostruko su pozitivne, apoptotske stanice su Annexin V FITC pozitivne, a zdrave stanice su dvostruko negativne.

Rezultati

Budući da su mjerenja izvedena u triplikatu, tablica 2 prikazuje iznose aritmetičkih sredina uzoraka nakon 5, 10 i 15 dana rasta za sva četiri kvadranta. Q1 predstavlja kvadrant sa ostacima raspadnutih stanica. Q2 predstavlja kvadrant sa stanicama u nekrozi, a Q3 predstavlja kvadrant sa stanicama u apoptozi. Q4 označava kvadrant sa zdravim stanicama. Oznaka \bar{X} predstavlja aritmetičku sredinu.

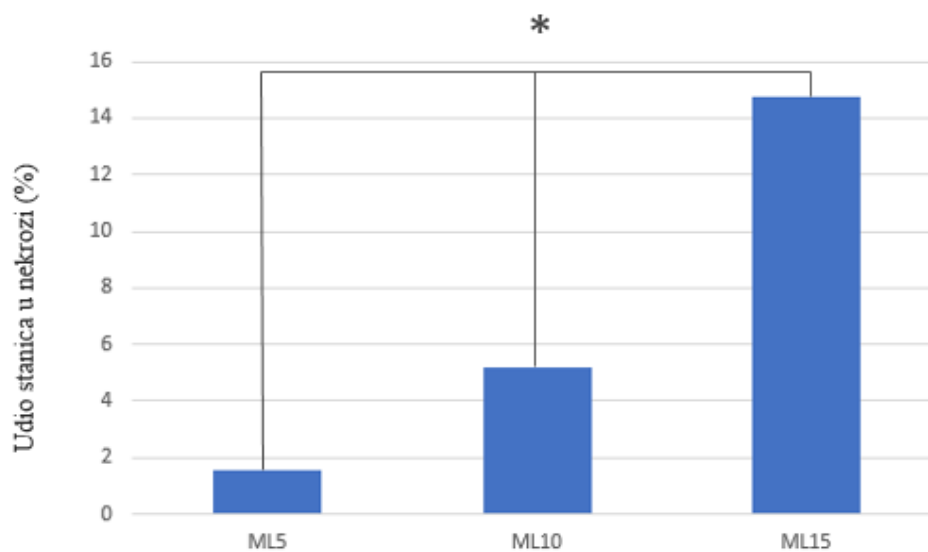
Tablica 1. Aritmetičke sredine uzoraka nakon 5, 10 i 15 dana rasta.

	Q1	Q2	Q3	Q4
\bar{X} (5 dana)	3,55 %	1,54 %	1,43 %	93,5 %
\bar{X} (10 dana)	2,97 %	5,16 %	1,96 %	89,9 %
\bar{X} (15 dana)	3,97 %	14,77 %	1,35 %	79,9 %

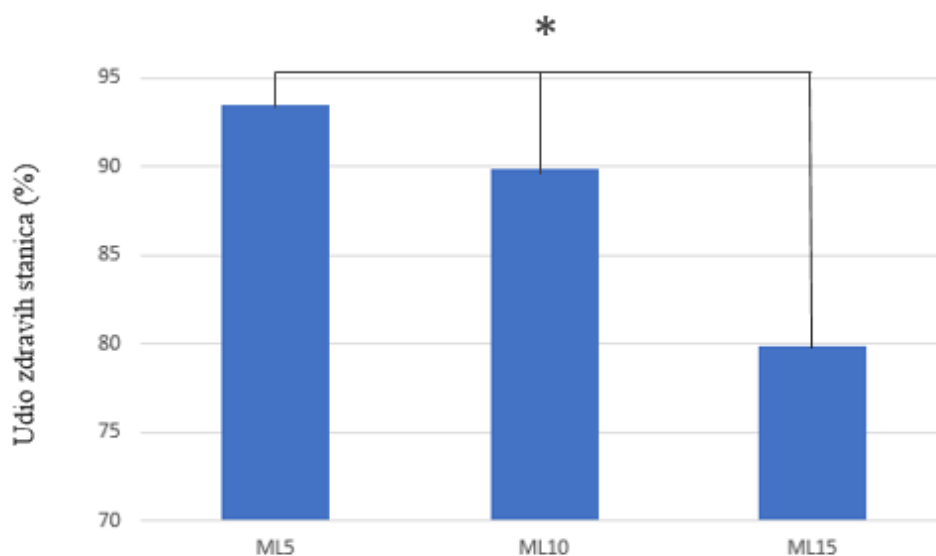
Rezultati Q1 kvadranta (gdje se nalaze ostaci raspadnutih stanica, odnosno debris) su pokazali kako ne postoji značajna razlika između udjela stanica nakon 5, 10 i 15 dana rasta. Naime, P vrijednost prilikom usporedbe udjela stanica između 5. i 10. dana rasta iznosila je 0,22. Usporedbom udjela apoptotskih stanica između 10. i 15. dana rasta dobivena je P vrijednost u iznosu od 0,06, dok je usporedba 5. i 15. dana rasta rezultirala P vrijednošću u iznosu od 0,36. Nadalje, primijećena je statistički značajna razlika ($P < 0,001$) u udjelu stanica u kvadrantu s nekrotičnim stanicama (Q2), kao i u Q4 kvadrantu sa zdravim stanicama ($P < 0,001$). Svaka od navedenih P vrijednosti dobivena je jednosmjernim ANOVA testom s Bonfferoni korekcijom. Slike 5 i 6 prikazuju udjele stanica te postojanost značajne razlike u udjelima stanica između 5, 10 i 15 dana rasta za kvadrante Q2, Q4 i Q3.

Rezultati

a)



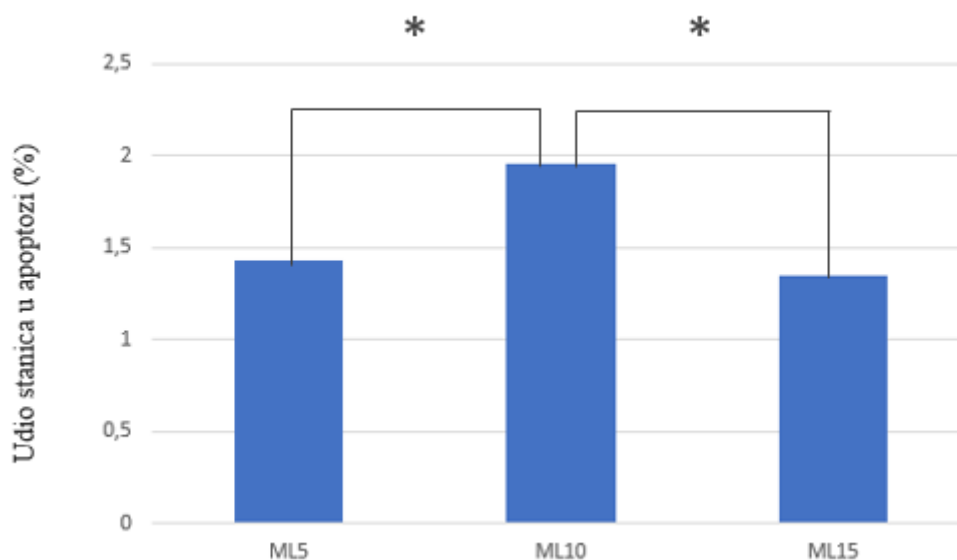
b)



Slika 5. Grafički prikaz udjela stanica. Slika prikazuje a) udio stanica (nekrotičnih) u Q2 kvadrantu te b) udio stanica (zdravih) u Q4 kvadrantu. Stupci su formirani od aritmetičkih sredina uzoraka koji su rasli 5,10 i 15 dana. "ML" je oznaka za uzorak, a "*" označava statistički značajnu vrijednost, koja je definirana kao $P < 0,05$.

Rezultati

Rezultati kvadranta u kojemu su stanice u apoptozi (Q3) pokazali su postojanost statistički značajne razlike u udjelu apoptotskih stanica između 5. i 10. dana rasta ($P = 0,003$), kao i između 10. i 15. dana rasta ($P = 0,001$). Međutim, između 5. i 15. dana rasta nije primijećena statistički značajna razlika ($P = 0,51$). Navedene P vrijednosti dobivene su jednosmjernim ANOVA testom s Bonfferoni korekcijom.



Slika 6. Grafički prikaz udjela apoptotskih stanica Q3 kvadranta. Stupci su formirani od aritmetičkih sredina uzoraka koji su rasli 5,10 i 15 dana. "ML" je oznaka za uzorak, a "*" označava statistički značajnu vrijednost, koja je definirana kao $P < 0,05$.

6. RASPRAVA

Trodimenzionalne stanične kulture korištene su u širokom spektru istraživanja biologije tumora budući da pružaju dobar *in vitro* sustav za oponašanje populacije hipoksičnih stanica koje su otporne na terapiju, a često su prisutne u tumorima. Sferoidi su, dakle, 3D stanični sustavi koji usko oponašaju uvjete u nedovoljno perfuziranim, rastućim tumorima u kojima se heterogenost razvija uslijed sve veće udaljenosti od krvnih kapilara (19). U ovome istraživanju, sferoidi su korišteni kako bi se analizirali udjeli apoptotskih, nekrotičnih te zdravih stanica.

Slično kao i u tumorskim stanicama, sferoidima je omogućen rast te interakcija s okolinom u sve tri dimenzije. Na kinetiku rasta sferoida, kao i na stanična svojstva, značajno utječu stanični metabolizam i mikrookolišni uvjeti. Ti uvjeti primjerice uključuju sastav medija, učestalost nadopunjavanja medija te koncentracije kisika i glukoze. Stanice rastu u okruženju koje sadržava medij za opskrbu esencijalnih hranjivih sastojaka poput aminokiselina, ugljikohidrata, vitamina i čimbenika rasta. Također, regulirano je fizikalno-kemijsko okruženje (pH, temperatura). Povećanje veličine tumora može rezultirati nedostatkom kisika unutar tumora zbog nedostupnosti krvnih kapilara. Utjecaj takvih stresora može utjecati na stanični rast te povećati udio stanica u apoptozi i nekrozi (20). Sukladno tomu, rezultati ovoga rada pokazali su kako postoji značajna razlika u udjelu nekrotičnih stanica (Q2 kvadrant) između 5. i 10. dana rasta, kao i između 10. i 15. dana rasta. Naime, kako su sferoidi rasli, povećavao se broj stanica u nekrozi vjerojatno zbog toga što su hranjive tvari i kisik slabije difundirali do stanica. Nadalje, naša pretpostavka je da prisutnost malog postotka raspadnutih stanica u Q1 kvadrantu je rezultat postupka razdvajanja sferoida. Međutim, u udjelu ostataka raspadnutih stanica (Q1 kvadrant) nije uočena statistički značajna razlika.

Jedan od najistaknutijih čimbenika koji utječu na fenotip matičnih stanica glioblastoma jest prisutnost hipoksije. Istraživanja su pokazala kako je neposredni prilagodljivi stanični odgovor na nisku razinu kisika stabilizacija transkripcijskih čimbenika poput hipoksija inducibilnih faktora (HIF), koji doprinose samoobnavljanju tumora. Imunomodulacija, metabolička disfunkcija i angiogeneza mehanizmi su koji podržavaju daljnji razvitak tumora te su međusobno povezani zahvaljujući hipoksiji unutar tumorske nekrotične srži. Također, hipoksični stres u staničnoj kulturi može inducirati apoptozu (21). Analizom udjela apoptotskih stanica u Q3 kvadrantu uočili smo postojanje statistički značajne razlike u udjelu apoptotskih

Rasprava

stanica između 5. i 10. dana rasta te između 10. i 15. dana rasta. Međutim, između 5. i 15. dana rasta nije uočena statistički značajna razlika u udjelu stanica u apoptozi. Udio apoptotskih stanica mjeren desetog dana u odnosu na peti dan se povećao. Zatim se petnaestog dana, u odnosu na deseti dan, smanjio. Iz rezultata vidljiv porast udjela apoptotskih stanica desetog dana rasta (u odnosu na peti dan rasta) može biti rezultat smanjenih koncentracija hranjivih tvari i kisika koje su posljedica sferoidnog rasta. Nadalje, smanjenje broja apoptotskih stanica petnaestog dana rasta (u odnosu na peti i deseti dan) može se objasniti antiapoptotskom prirodom sferoidnih struktura. Naime, tumorske stanice postaju otporne na apoptotske signale putem niza biokemijskih promjena (20).

Od ranije je utvrđena povezanost rasta tumora s dostupnošću kisika i hranjivih tvari koje opskrbljuju krvne žile. Vanjski sloj sferoida sastoji se od proliferirajućih stanica koje imaju najbolji pristup nutrijentima i kisiku (21). Sukladno tomu, vidljiv je relativno visok udio proliferirajućih stanica (Q4 kvadrant) tijekom 5, 10 i 15 dana rasta. Međutim, kako su sferoidi rasli, udio proliferirajućih stanica zbog potrošnje hranjivih tvari i kisika ipak se smanjivao. Naime, nedostatak nutrijenata te povećana potrošnja kisika (osim što povećavaju udio apoptotskih stanica) vjerojatno doprinose smanjenju udjela zdravih, proliferirajućih stanica. Uočena je značajna razlika u udjelu zdravih stanica između 5., 10. i 15. dana rasta.

Sukladno navedenim podacima, istraživanje udjela stanica u apoptozi koristeći sferoidnu staničnu kulturu je ponovljivo. Budući da sferoidne stanične kulture nude prednosti u proučavanju ponašanja tumora u odnosu na prethodno korištene 2D kulture, potrebna su daljna istraživanja koja bi koristila upravo sferoidne kulture u svrhu pronalaska adekvatnije terapije te proučavanja glioblastoma.

7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Mikrokolišni uvjeti utječu na udio proliferirajućih, apoptotskih i nekrotičnih stanica.
- Kako sferoidi rastu, smanjuje se udio proliferirajućih stanica.
- Duži period rasta rezultira povećanjem udjela stanica u nekrozi.
- Duži period rasta ne rezultira povećanjem udjela stanica u apoptozi.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Odrediti udio apoptotskih stanica u 3D sferoidima glioblastoma formiranim metodom magnetske levitacije nakon 5, 10 i 15 dana rasta.

Nacrt studije: Istraživanje je osmišljeno kao pokusno.

Materijali i metode: Udio apoptoze nakon 5, 10 i 15 dana rasta ispitan je na stanicama glioblastoma (stanična linija D54). Sferoidi su formirani metodom magnetske levitacije. Udio apoptotskih stanica analiziran je na protočnom citometru uz prethodno bojanje stanica Annexin V FITC-om i propidij jodidom.

Rezultati: Tijekom vremena smanjen je udio proliferirajućih stanica. Udio nekrotičnih stanica s vremenom se povećao. Ne postoji značajna razlika u udjelu apoptotskih stanica između 5. i 15. dana rasta.

Zaključak: Duži period rasta ne rezultira povećanjem udjela apoptotskih stanica, nego se povećava udio stanica u nekrozi.

Ključne riječi: apoptoza; glioblastom; protočna citometrija; stanična kultura

9. SUMMARY

Apoptotic cell proportion in glioblastoma 3D spheroid samples of different sizes

Objectives: The aim of this study is to analyse apoptotic cell proportion in glioblastoma 3D spheroids that were formed using magnetic levitation method after 5,10 and 15 days of growth.

Study Design: The study was designed as experimental.

Materials and Methods: Apoptotic cell proportion after 5, 10 and 15 days of growth is tested on glioblastoma cells (cell line D54). Spheroids are formed using magnetic levitation method. Apoptotic cell proportion was analysed on a flow cytometer with prior staining of the cells with Annexin V FITC and propidium iodide.

Results: Proportion of proliferating cells has been reduced, as oppose to proportion of necrotic cells that has been increased over time. There is no significant difference in apoptotic cell proportion between 5th and 15th day of growth.

Conclusion: Longer period of growth does not result in increased proportion of apoptotic cells, but the proportion of necrotic cells grows in corelation.

Keywords: apoptosis; cell culture; glioblastoma; flow citometry

10. LITERATURA

1. Rao SS, Lannutti JJ, Viapiano MS, Sarkar A, Winter JO. Toward 3D biomimetic models to understand the behavior of glioblastoma multiforme cells. *Tissue Eng - Part B Rev.* 2014;20(4):314–27.
2. Valdés-Rives SA, Casique-Aguirre D, Germán-Castelán L, Velasco-Velázquez MA, González-Arenas A. Apoptotic Signaling Pathways in Glioblastoma and Therapeutic Implications. *Biomed Res Int.* 2017;2017.
3. Soubéran A, Cappai J, Chocry M, Nuccio C, Raujol J, Colin C, et al. Inhibitor of Apoptosis Proteins Determines Glioblastoma Stem-Like Cell Fate in an Oxygen-Dependent Manner. *Stem Cells.* 2019;37(6):731–42.
4. Yaghoubi A, Ghojzadeh M, Abolhasani S, Alikhah H, Khaki-Khatibi F. Correlation of Serum Levels of Vitronectin, Malondialdehyde and Hs-CRP With Disease Severity in Coronary Artery Disease. *J Cardiovasc Thorac Res [Internet].* 2015;7(3):113–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.15171/jcvtr.2015.24>
5. Green DR, Llamby F. Cell death signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(12):1–24.
6. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far A. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Public Access. Bone.* 2011;23(1):1–7.
7. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495–516.
8. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):1–28.
9. Wu CC, Bratton SB. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. *Antioxidants Redox Signal.* 2013;19(6):546–58.
10. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000;45(3):528–37.
11. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med.* 2005;258(6):479–517.
12. Ormerod MG. The study of apoptotic cells by flow cytometry. *Leukemia.* 1998;12(7):1013–25.
13. Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods Mol Biol.* 2009;559(0):19–32.
14. Bordanaba-Florit G, Madarieta I, Olalde B, Falcón-Pérez JM, Royo F. 3D cell cultures as prospective models to study extracellular vesicles in cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(2):1–17.
15. Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K. Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the most important application. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):1–17.

Literatura

16. Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *J R Soc Interface*. 2017;14(127).
17. Sant, Shilpa PAJ. The Production of 3D Tumor Spheroids for Cancer Drug Discovery - HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2017;176(1):139–48.
18. Preglej L. Istraživanja U Nastavi. *Educ Biol*. 2014;1(1):100–16.
19. Khaitan D, Chandna S, Arya MB, Dwarakanath BS. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; implications for tumor therapy. *J Transl Med*. 2006;4:1–13.
20. Gayan S, Teli A, Nair A, Dey T. Nutritional stress alone can control in vitro tumor formation and its invasive nature. 2020;
21. Riffle S, Pandey RN, Albert M, Hegde RS. Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. *BMC Cancer*. 2017;17(1):1–12.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

- Ime i prezime: Nikolina Tomić
- Datum i mjesto rođenja: 15.12.1999., Slavonski Brod
- e-mail: nikolinatomic71@gmail.com

Obrazovanje:

- 2014.- 2018. Klasična gimnazija fra Marijana Lanosovića u Slavonskom Brodu
- 2018.-2021. Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

Članstva:

- 2018.-2019. članstvo u Hrvatskoj udruzi studenata medicinsko laboratorijske dijagnostike-CMLDSA