

Zadržavanje magnetskih čestica u sferoidima tumorskih stanica dojke

Jagodić, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:152:063140>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Matea Jagodić

**ZADRŽAVANJE MAGNETSKIH
ČESTICA U SFEROIDIMA TUMORSKIH
STANICA DOJKE**

Završni rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Matea Jagodić

**ZADRŽAVANJE MAGNETSKIH
ČESTICA U SFEROIDIMA TUMORSKIH
STANICA DOJKE**

Završni rad

Osijek, 2022.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za stanične kulture pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu Medicinskog fakulteta Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Barbara Vilječić

Rad ima 23 lista, 3 tablice i 5 slika.

ZAHVALA

Posebno hvala mentorici, doc. dr. sc. Barbari Viljetić na uloženom trudu i vremenu, potrebnim savjetima i pomoći za izradu ovog rada.

Hvala doc. dr. sc. Teuti Opačak Bernardi na pomoći prilikom izrade rada, te članovima Laboratorija za stanične kulture na susretljivosti i savjetima.

Zahvaljujem i kolegici Aidi Imeri s kojom sam provodila vrijeme tijekom izrade ovog rada, ali i vrijeme za učenje koje je bilo produktivnije i zabavnije uz zajedničke metode i savjete.

Veliko hvala zaslužuju moji roditelji, braća, stric i prijatelji za podršku koju su mi pružali tijekom obrazovanja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. MODELI RAKA DOJKE	1
1.2. KULTURA STANICA	2
1.2.1. Dvodimenzionalna kultura stanica (2D)	3
1.2.2. Trodimenzionalna kultura stanica (3D)	3
1.3. METODE UZGOJA STANIČNIH SFEROIDA	5
1.3.1. Magnetska levitacija	5
2. CILJEVI	7
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. USTROJ STUDIJE	8
3.2. MATERIJALI	8
3.2.1. Stanične linije	8
3.2.2. Kemikalije	8
3.3. METODE	9
3.3.1. Kultura stanica <i>in vitro</i>	9
3.3.2. Određivanje varijabilnosti stanica u kulturi	10
3.3.3. Uzgoj 3D kulture	10
3.3.4. Rezanje sferoida na kriostatu	11
3.3.5. Bojenje sferoida	11
3.3.6. Mikroskopiranje i slikanje	12
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	12
5. RASPRAVA	16
6. ZAKLJUČAK	18
7. SAŽETAK	19
8. SUMMARY	20
9. LITERATURA	21
10. ŽIVOTOPIS	23

POPIS KRATICA

BJ - stanice normalnih humanih fibroblasta (engl. *normal human fibroblast cells*)

CT – temperatura komore (engl. *chamber temperature*)

DMEM - Dulbeccov minimalni esencijalni medij (engl. *Dulbecco's Minimal Essential Medium*)

ECM - izvanstanični prostor (engl. *extracellular matrix*)

FBS - fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*)

MCF-7 - stanična linija raka dojke (engl. *human breast cancer cell line*)

OT – temperatura objekta (engl. *object temperature*)

PBS - fosfatni pufer (engl. *phosphate-buffered saline*)

1. UVOD

Rak dojke predstavlja javnozdravstveni problem u cijelom svijetu, najčešći je karcinom i primarni uzrok smrti u žena. Sve veća pažnja javnosti te svijest o ovom karcinomu kao i sve naprednija dijagnostička tehnologija imaju pozitivan učinak na prepoznavanje i probir raka dojke (1). U zadnja dva desetljeća brojna istraživanja tumora dojke doprinijela su sve boljem razumijevanju nastanka ovog tumora, a tako i poboljšanju u metodama liječenja. No, iako je ovo globalni zdravstveni problem, nacionalni programi probira provode se samo u razvijenim zemljama te se rak dojke i dalje često dijagnosticira u kasnim stadijima (2).

Molekule stanične adhezije omogućuju čvrstu vezu između epitelnih i mioepitelnih stanica u normalnom epitelu dojke. Takva organizacija neophodna je za normalno funkcioniranje mliječne žlijezde. U tumorskim stanicama adhezija stanica je smanjena što rezultira njihovom brzom proliferacijom i nereguliranim rastom. Zbog toga dolazi do poremećaja epitelne organizacije, napredovanja tumora i metastaza (3,4). Kako su adhezijska svojstva neoplastičnih stanica promijenjena, gubitak međustanične adhezije omogućuje malignim stanicama napuštanje mjesta nastanka i degradiranje izvanstaničnog matriksa, odnosno pokretljivost i invazivnost (3).

Unatoč brojnim istraživanjima, mehanizam inicijacije i napredovanja tumora nisu do kraja razjašnjeni što otežava liječenje. Liječenje raka dojke obuhvaća različite metode, ali pronalaženje učinkovite terapije nije jednostavno zbog složenosti bolesti, heterogenosti stanica unutar tumora i same individualnosti pacijenata. Upravo zbog toga važan je razvoj modela za proučavanje tumorogeneze i biologije karcinoma te za otkrivanje novih lijekova i terapije (4).

1.1. MODELI RAKA DOJKE

Postoje tri pristupa u modeliranju raka dojke: *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro* modeli. No kako svaki model ima svoje specifičnosti, potrebno je dobro proučiti cilj istraživanja te tako izabrati odgovarajući model (4).

In vivo modeli, odnosno životinjski modeli, predstavljaju zlatni standard i završni test prije nego liječenje prijeđe na kliničko ispitivanje. Rezovi tumora životinjskog ili ljudskog podrijetla postavljeni u gel čine *ex vivo* kulturu, takva kultura omogućuje čuvanje nativnog

sastava i strukture izvanstaničnog prostora (ECM, engl. *extracellular matrix*) (4). Za razliku od *in vivo* metode, *in vitro* metoda ne koristi životinje u istraživačke svrhe te izostavljaju potrebe za legalnim, moralnim i etičkim pitanjima. *In vitro* studije koriste stanice ljudskog tkiva kako bi takve stanične kulture oponašale fiziološke i metaboličke funkcije ljudi. Primarne kulture stanica su stanice dobivene izravno iz živih tkiva, dok se stanice koje su modificirane i neograničeno žive nazivaju besmrtne stanične linije. Karakteristike stanica raka, koje ih čine pogodnim za stvaranje staničnih linija, su genske mutacije i sposobnost kontinuiranog dijeljenja (5,6).

In vitro modeli su važan segment istraživanja raka, služe za identifikaciju kancerogenih tvari, razvoj terapije raka, probir lijekova i uvid u molekularne mehanizme rasta tumora i metastaza. *In vitro* ispitivanja izvode se na staničnim kulturama, a modeli tumora razlikuju se po složenosti, od jednostavnih staničnih linija izvedenih iz tumora do trodimenzionalnog (3D) modela (5).

1.2. KULTURA STANICA

Kultura stanica definira se kao umjetan uzgoj stanica koje rastu u okolišu izvan prirodnog okruženja u kontroliranim uvjetima. Ti se uvjeti odnose na optimalnu temperaturu i izvor hranjivih tvari što omogućuje stanicama preživljavanje i rast (6).

Usitnjavanje tumorskog ili normalnog tkiva prvi je korak kulture stanica. Dobivena suspenzija stanica stavlja se u posudicu za kulturu ispunjenu hranjivim medijem. Medij za uzgoj stanica izabire se prema potrebama stanica. Harry Eagle je 1955. odredio točno definirani medij koji omogućuje rast animalnim stanicama u kulturi. Takav medij sastojao se od trinaest aminokiselina, nekoliko vitamina, soli, glukoze i seruma. Medij koji je Eagle definirao 1955. danas čini osnovni medij za kulturu stanica (7). Serum, bilo životinjskog bilo ljudskog porijekla, koristi se kao osnovni dodatak mediju zbog pozitivnog učinka na rast stanica i održavanje stanica u kulturi (8).

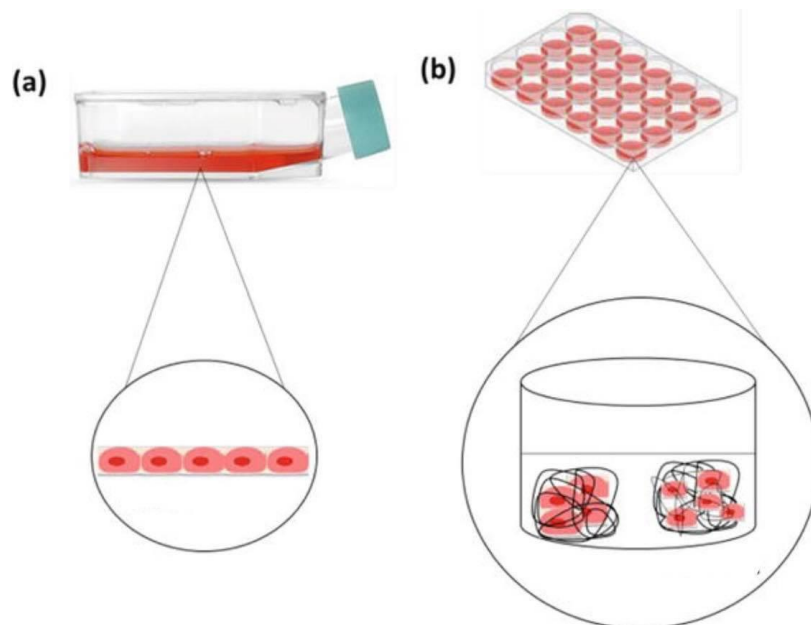
1.2.1. Dvodimenzionalna kultura stanica (2D)

2D stanična kultura je kultura stanica koja raste na ravnoj podlozi. Stanice rastu u jednom sloju (Slika 1a), ravnopravno raspolažu hranjivim tvarima i faktorom rasta, a rezultat toga je homogeni rast i proliferacija. Brojne su prednosti korištenja 2D kulture - jednostavne su za rukovanje, manji troškovi, vrijeme potrebno za tretiranje je kraće te je mjerenje specifičnih promjena u stanicama jednostavnije nego u *in vivo* modelima. Međutim, morfologija stanica uzgajana u jednom sloju utječe na stanične procese koji se onda razlikuju od onih u *in vivo* uvjetima (9,10).

Iako jednostavna i jeftina metoda u istraživanju raka i djelovanja lijekova, zbog nepotpunog preslika *in vivo* uvjeta vidljiv je neuspjeh u terapijama koje su testirane na 2D kulturama. Iz tog razloga 3D kultura je sve učestalija u primjeni i istraživanjima (11,12).

1.2.2. Trodimenzionalna kultura stanica (3D)

3D kultura stanica model je koji oponaša komunikaciju stanica-stanica i interakciju stanica-ECM, perfuziju i hipoksične uvjete tumora koji su vrlo slični onima u *in vivo* okruženju. Među 3D modelima sferoidi i organoidi predstavljaju modele koji mogu oponašati heterogenost i patofiziologiju tumora te tako popuniti prazninu koja nastaje između testiranja na 2D kulturama i životinjama (10). U sferoidima tumorske stanice poprimaju zaobljeni oblik te se grupiraju i nastaju tvorevine slične tumorima (Slika 1b). Kada se uspoređuju sa 2D kulturom stanica, može se vidjeti da ekspresija gena, stanična proliferacija i migracija, stanična morfologija i heterogenost u 3D *in vitro* modelima su znatno bliži onima u *in vivo* uvjetima (13).

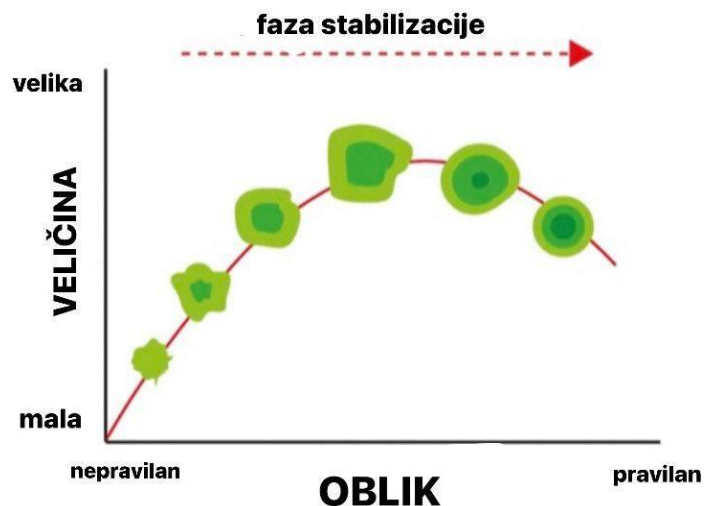


Slika 1. Prikaz: a) 2D kultura; b) 3D kultura (prilagođeno prema shematskom prikazu reference 12.)

Sferoidi se zbog svoje strukture sastoje od stanica u različitim stadijima. Vanjski slojevi su izloženiji mediju te oni sadrže žive stanice koje se dijele. Stanice koje se nalaze u središtu primaju manje hranjivih tvari, faktora rasta i kisika iz medija što takve stanice dovodi u stanje mirovanja ili hipoksije. Stanična raznolikost od živih do stanica u mirovanju nalikuje *in vivo* uvjetima (10,13).

U ranim fazama formiranja sferoida volumen eksponencijalno raste, nakon toga slijedi faza takozvane stabilizacije u kojoj sferoidi postižu ravnotežu (Slika 2). U ravnotežnom stanju sferoidi su pravilnijeg oblika i vidljivo je smanjenje volumena. Faza stabilizacije značajna je za razvoj funkcionalnih i strukturnih karakteristika samog sferoida (14).

Zbog dodatne dimenzije u 3D kulturi ekspresija gena, stanična proliferacija, stanična migracija, stanična morfologija i heterogenost u 3D *in vitro* modelima su bliži *in vivo* uvjetima. Temeljem sličnosti *in vivo* uvjeta 3D modeli su sve prisutniji u istraživanju raka, tkivnom inženjerstvu i osnovnim biološkim istraživanjima (9,15).



Slika 2. Shematski prikaz promjene sferoida u obliku i veličini tijekom vremena (prilagođeno prema shematskom prikazu reference 14.)

1.3. METODE UZGOJA STANIČNIH SFEROIDA

Stanične sferoide moguće je uzgojiti različitim metodama koje se dijele na metode s nosačem ili bez njega (14).

Metode s nosačem koriste nosač koji pruža strukturnu odnosno fizičku potporu, a biokemijska i mehanička svojstva nosača utječu na ponašanje stanica. Korištenjem takvih metoda potrebno je odabrati odgovarajući materijal nosača za željenu primjenu (15).

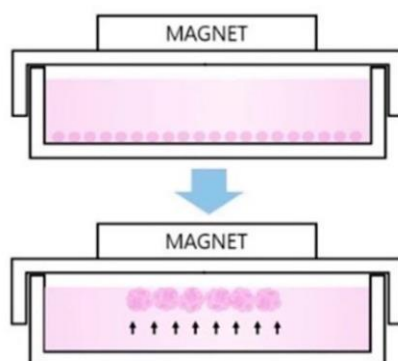
Glavne karakteristike metoda bez nosača su samostalna agregacija i neadherentni uvjeti. U metode bez nosača ubrajaju se: metoda viseće kapljice, metoda plutajućih stanica i magnetska levitacija. Jedna od novijih metoda je metoda magnetske levitacije (16,17).

1.3.1. Magnetska levitacija

Magnetska levitacija je metoda formiranja sferoida koja koristi magnetske čestice. Magnetske čestice dodaju se stanicama i zatim se primjenjuje vanjsko magnetsko polje (Slika 3). Zbog magnetske sile, stanice koje su tretirane magnetskim česticama levitiraju protivno

gravitaciji. Takvo okruženje potiče interakcije između stanica što dovodi do sljepljivanja i koncentriranja stanica te se tako stvara okoliš u kojem se može sintetizirati izvanstanični matriks i formirati sferoid. Upotrebom vanjskog magnetskog polja lako se manipulira sferoidima i daje dodatna kontrola. Magnetska levitacija je metoda koja se koristi za stvaranje sferoida iz različitih tkiva te se primjenjuje za istraživanja u tkivnom inženjerstvu (16,17,18).

Magnetskom levitacijom jednostavno se stvaraju stanični agregati u suspenziji, ali postoje određena ograničenja, a to su vrijeme i kontrola veličine stanica. Vrijeme koje je potrebno da stanice dođu u bliski kontakt je značajno i čini nepovoljni dio metode, a samu kontrolu veličine stanica nije moguće precizno pratiti. Kako bi se dobio uvid u sposobnost metode, potrebno je pratiti uvjete okoline, kao što su broj stanica i koncentracija magnetskih čestica (19).



Slika 3. Prikaz metode magnetske levitacije (shematski prikaz reference 18.)

2. CILJEVI

1. Korištenjem metode magnetske levitacije uzgojiti sferoide tumora dojke različite starosti, odnosno 7, 14 i 21 dan.
2. Odrediti količinu magnetskih čestica u sferoidima u različitim vremenskim razdobljima, odnosno nakon 7, 14 i 21 dan.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. USTROJ STUDIJE

Studija je ustrojena kao *in vitro* studija-kontrolirani pokus. Rad je napravljen u sklopu institucijskog znanstveno-istraživačkog projekta "*Primjena tekućih anestetika na 3D stanične kulture*" (IP19). Praktični dio napravljen je u Laboratoriju za stanične kulture Medicinskog fakulteta Osijek.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Stanične linije

Za izradu ovog rada koristili smo dvije komercijalno dostupne humane stanične linije:

- MCF-7 (ATCC® HTB-22™) - adherentne stanice adenokarcinoma dojke
- BJ (ATCC® CRL-2522™) - stanice normalnih humanih fibroblasta

3.2.2. Kemikalije

- Fosfatni pufer (PBS):
 - NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 - KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 - Na₂HPO₄ x 7H₂O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 - KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- DMEM, s visokim udjelom glukoze (4,5g/L), uz dodatak glutamin-S (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)
- Fetalni goveđi serum (FBS), dodatak antibiotik-antimikotik (penicilin/streptomycin) 100x; (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)
- Tripsin/EDTA, tripsin 0,25%, 1mM EDTA-Na₄ u HBSS (Panbiotech GmbH, Aidenbach, Germany)

- Erytrosin B, sterilno filtriran (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)
- Magnetske čestice (NanoShuttle-PL.; Greiner, Frickenhausen, Germany)
- Medij za kriostatsko rezanje (*Tissue Freezing Medium*; Leica, Nussloch, Germany)
- Aceton (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Ksilol (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)
- Alkoholi – Histanol (Biognost, Zagreb, Hrvatska)
- Boje: fuksin, ksilidin, fosfomolibden, anilin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)
- Kanada balzam (Carlo Erba Reagents, Emmendingen, Germany)

3.3. METODE

3.3.1. Kultura stanica *in vitro*

Postupak kulture stanica odvija se u laboratoriju koji omogućuje sterilne uvjete i rad u kabinetu s laminarnim protokom zraka. Sav pribor potrebno je sterilizirati prije unošenja u takav kabinet.

Stanice su uzgajane u bočicama za kulturu stanica, površine rasta 25 cm² (BD, Falcon, Germany). Rast stanica odvijao se u inkubatoru (IGO 150 CELLlifeTM, Jouan, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) uz kontroliranu atmosferu s 5% CO₂ i temperaturu od 37°C.

Napravljena je kokultvacija dvije stanične linije: stanice normalnih humanih fibroblasta (BJ) i adherentne stanice adenokarcinoma dojke (MCF-7).

Za održavanje staničnih linija MCF-7 i BJ primjenjuje se DMEM medij, kojemu se dodaje 10% FBS-a, 200 mM glutamina-S i 100 U/0,1 mg penicilina/streptomycin antibiotika.

Korištenjem invertnog mikroskopa (Zeiss Axiovert 25, Germany) svakodnevno se pregledava konfluentnost stanica. Ukoliko je potrebno stanice se odljepljuju s površine i prenose u svježi medij. Proces odvajanja stanica obuhvaća: izvlačenje medija, ispiranje stanica PBS-om i zatim odvajanje od podloge primjenom proteolitičkog enzima tripsina. Slijedi inkubacija od 6 minuta, nakon koje se dodaje svježi medij i na taj način inaktivira tripsin. Na kraju se stanice pakuju svježim medijem za održavanje i stave u novu posudicu.

3.3.2. Određivanje varijabilnosti stanica u kulturi

Varijabilnost stanica određuje kvalitetu i reproducibilnost rezultata. Kako bi se odredio broj stanica, korišten je test s bojom Erytrosine B. Stanice se prvo resuspendiraju, zatim se uzima 50 μL stanične suspenzije i 100 μL boje. Na Bürker Türkovu komoricu nanosi se obojena stanična suspenzija te se broje žive stanice pod invertnim mikroskopom. Žive stanice ostaju neobojene, dok mrtve stanice poprimaju ružičastu boju jer imaju oštećenu membranu.

Broj živih stanica određuje se formulom:

$$N/4 \cdot 3 = X \cdot 10^4 \text{ stanica/cm}^3$$

Gdje je:

N – broj stanica

4 – broj polja u komorici

3 – faktor razrjeđenja

3.3.3. Uzgoj 3D kulture

Stanične linije nasađene su u 3D obliku korištenjem metode magnetske levitacije.

Prvi korak čini dodavanje magnetskih čestica u medij, dodali smo 30 μL magnetskih čestica. Kako bi stanice optimalno pokupile čestice, moraju biti 70-80 % konfluentne. Nakon dodavanja čestica slijedi inkubacija od 6-8 h, naša inkubacija trajala je 6 h. Sljedeći korak je nasađivanje sferoida za što je korištena ploča s 24 jažice (Greiner; Frickenhausen, Germany) u koju je nasađeno 5000 stanica stanične linije MCF-7 u 350 μL medija te je na njih stavljena ploča s magnetima (Greiner; Monroe, USA). Magnet djeluje na način da povuče sve stanice kako ne bi doticale podlogu. Stanice su tako okružene medijem sa svih strana. Magnetsko polje je skupilo stanice na hrpu te su se one same od sebe slijepile i formirale sferoid. Jednom kada se sferoid formira, magnetsko polje više nije potrebno.

3.3.4. Rezanje sferoida na kriostatu

Nakon točno određenog vremena uzgajanja sferoida (7, 14 ili 21 dan), sferoidi su uklopljeni u medij za kriostatsko rezanje bez prethodne obrade i zatim rezani na kriostatu (Cryostat CM30350S, Leica, Nussloch, Germany). Temperatura rezanja bila je CT (engl. *chamber temperature*) -25°C i OT (engl. *object temperature*) -22°C , a rezovi debljine $10\ \mu\text{m}$.

3.3.5. Bojenje sferoida

$10\ \mu\text{m}$ rezovi sferoida stavljeni su na polilizirana predmetna stakalca (Menzel-Glaser, Thermo Scientific, Braunschweig, Germany). Rezovi su potom fiksirani acetonom i ostavljeni da se osuše na sobnoj temperaturi.

Kako bi se magnetske čestice mogle što bolje vidjeti na rezovima sferoida, preparati su bojani po Massonu praćenjem sljedećih koraka:

1. uranjanje u ksilol
2. rehidriranje alkoholima: 100%-tni alkohol, 90%-tni alkohol, 70%-tni alkohol
3. inkubacija u otopini kiselog fuksina i ksilidina 10 minuta
4. ispranje u destiliranoj vodi
5. inkubacija u otopini 1%-tnog fosfomolibdena 5 minuta
6. ispranje u destiliranoj vodi
7. inkubacija u otopini 2%-tnog anilina 10 minuta
8. ispranje u destiliranoj vodi
9. dehidriranje alkoholima: 70%-tni alkohol, 95%-tni alkohol, 100%-tni alkohol
10. dehidriranje u ksilolu

Nakon postupka bojenja sferoida preparati su pokriveni kanada balzomom te pokriveni pokrovnicom, čime su preparati bili spremni za mikroskopiranje i slikanje.

3.3.6. Mikroskopiranje i slikanje

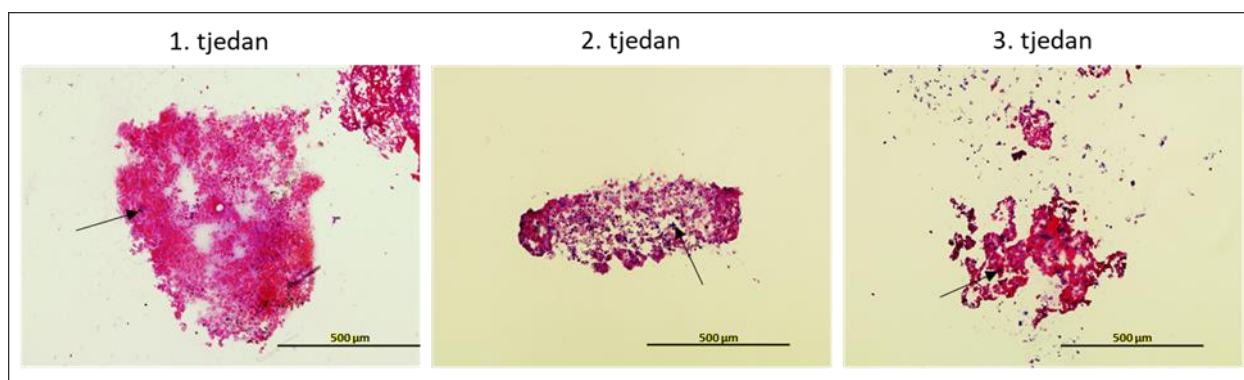
Preparate smo mikroskopirali pomoću svjetlosnog mikroskopa (Carl Zeiss, Axioskop 2MOT, Jena, Germany) na koji je montirana kamera Olympus DP70 (Olympus DP70, Optical Olympus, Japan). Kamera je korištena za fotografiranje preparata, a povećanje pod kojim su slikani je 100x.

3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Slike su kvantificirane koristeći računalni program *ImageJ (Fiji 101)* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SAD). Analizom slika određena je količina piksela ukupne površine slike, zatim količina piksela koju čine praznine na slici te količina koju čine magnetske čestice. Korištenjem formule: pikseli magnetskih čestica / (ukupni pikseli – pikseli praznog dijela slike) dobivena je količina piksela magnetskih čestica po tkivu kroz tri tjedna. Za statističku obradu podataka korišten je program R, v4.1.0 (<https://www.r-project.org/>). Za generiranje grafova korišten je ggstatsplot paket (20). Numerički podaci opisani su medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR). Statistička značajnost razlike među neovisnim skupinama ispitana je neparametrijskim Kruskal-Wallisovim testom, dok su razlike između distribucija dviju nezavisnih varijabli utvrđene Mann-Whitney testom. Statistička značajnost postavljena je na $p < 0,05$.

4. REZULTATI

Zadržavanje magnetskih čestica promatrano je kroz tri tjedna, odnosno nakon 7, 14 i 21 dan, u sferoidima tumorskih stanica dojke. Svaki tjedan sferoidi su se uklapali u medij za kriostatsko rezanje, rezali, fiksirali, bojali, mikroskopirali i slikali (Slika 4). Slike su zatim analizirane u računalnom programu *Fiji*.

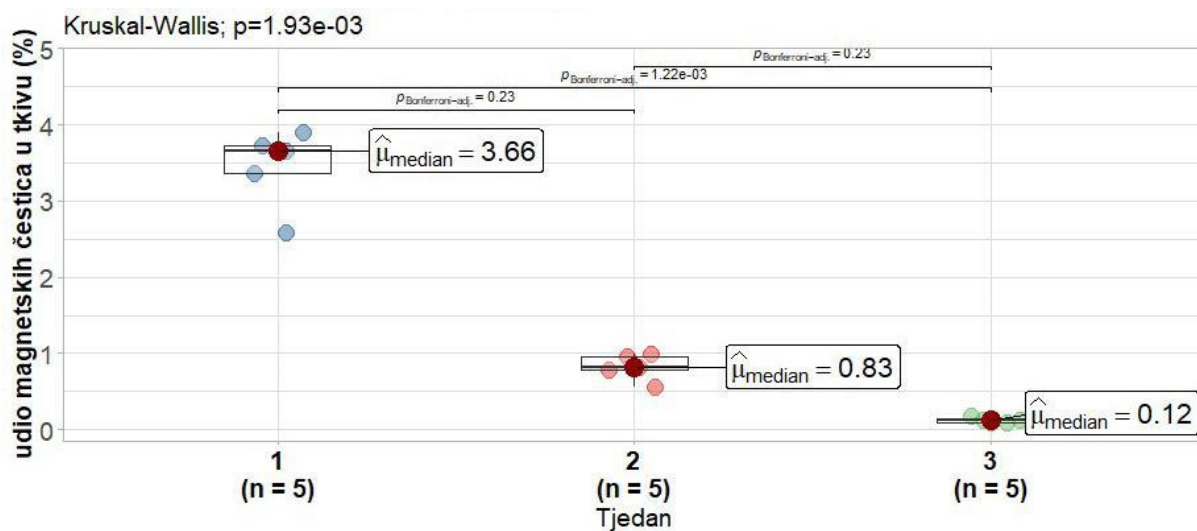


Slika 4. Prikaz sferoida bojenih metodom po Massonu nakon 1., 2. i 3. tjedna uzgoja. Povećanje je 100x. Strjelicama su označene magnetske čestice u sferoidu.

Analizom slika dobivena je količina magnetskih čestica po tkivu kroz tri tjedna (Tablica 1). Najveće količine magnetskih čestica vidljive su u prvom tjednu, kako su se sferoidi formirali broj magnetskih čestica se smanjuje (Tablica 1). Kruskal-Wallisovim testom napravljena je usporedba među više nezavisnih uzoraka, odnosno između tri vremenska razdoblja. Test je pokazao statistički značajnu razliku ($p = 0,00193$) (Tablica 2 i Slika 5). Grafički prikaz usporedbe udjela magnetskih čestica u sferoidima tumorskih stanica dojke u različitim vremenskim razdobljima, odnosno nakon 7, 14 i 21 dan je na Slici 5. Mann-Whitney testom utvrđene su razlike među dvjema nezavisnim varijablama, a rezultati su prikazani u Tablici 2. Statistički značajna razlika dobivena je usporedbom prvog i drugog te prvog i trećeg tjedna. Vrijednosti medijana i interkvartilnog raspona prikazane su u Tablici 3.

Tablica 1. Udjeli magnetskih čestica u sferoidima tumorskih stanica dojke promatranih 7., 14. i 21. dan uzgoja prema kojima je odrađena statistička analiza.

	1. tjedan	2. tjedan	3. tjedan
Udio magnetskih čestica u tkivu (%)	3,660	0,551	0,169
	2,579	0,781	0,117
	3,905	0,953	0,086
	3,729	0,991	0,095
	3,360	0,826	0,126



Slika 5. Grafički prikaz usporedbe udjela magnetskih čestica u sferoidima tumorskih stanica dojke u različitim vremenskim razdobljima, odnosno nakon 7, 14 i 21 dan. $p = 0,00193$ (Kruskal-Wallisov test s post hoc Bonferroni-Dunnovom korekcijom.)

Tablica 2. Prikaz p vrijednosti dobivenih Kruskal-Wallis i Mann-Whitney testom.

Test	Razlika između tjedana	p
Kruskal-Wallis	1., 2. i 3. tjedan	0,00193
Mann-Whitney	1. i 3. tjedan	0,01
Mann-Whitney	1. i 2. tjedan	0,01
Mann-Whitney	2. i 3. tjedan	0,14

Tablica 3. Deskriptivna statistika magnetskih čestica u sferoidima tumorskih stanica dojke promatranih 7., 14. i 21. dan uzgoja. (IQR- interkvartilni raspon, Q1-kvartila 1, Q3-kvartila 3, min-minimum, max-maksimum)

Tjedan	median	IQR	Q1	Q3	min	max
1	3,660	0,369	3,360	3,729	2,579	3,905
2	0,826	0,172	0,781	0,953	0,551	0,991
3	0,117	0,031	0,095	0,126	0,086	0,169

5. RASPRAVA

Rak je složena bolest u kojoj genetički defekti zajedno sa promjenama komponenata mikrookoliša doprinose razvoju, napredovanju i metastaziranju bolesti. Rak dojke smatra se javnozdravstvenim problemom diljem svijeta te je primarni uzrok smrti u žena. Unatoč znatnom napretku u posljednjih nekoliko desetljeća u poboljšanju dijagnostike, prevencije i liječenja raka, još uvijek postoje brojne prepreke u pronalasku učinkovitijih metoda liječenja (1).

Za otkrivanje uspješnog liječenja glavnu ulogu predstavljaju modeli za proučavanje biologije raka i odgovora na lijekove (1). Tu se sve više ističu 3D modeli koji zauzimaju sve važnije mjesto u pretkliničkim istraživanjima jer su znatno sličniji složenom tkivu i građi tumora nego što je to u 2D kulturama stanica.

3D kultura stanica čini model koji oponaša komunikaciju stanica-stanica i interakciju stanica-ECM, na taj način preslikava *in vivo* uvjete. Zbog sličnosti *in vivo* uvjetima, odnosno dostojnog oponašanja strukture i funkcije tkiva, pogodna je za istraživanje raka, tkivno inženjerstvo i biološka istraživanja (15). Magnetska levitacija koristi se kao novija metoda formiranja 3D kulture stanica. Ubraja se u metode bez nosača te tako omogućuje samostalnu agregaciju i neadherentne uvjete. Uočena je visoka učinkovitost analize za probir toksičnosti u 3D kulturama primjenom magnetske levitacije što ju čini poželjnom i u istraživanju lijekova (16).

Primjenom vanjskog magnetskog polja nakon dodavanja magnetskih čestica omogućuje se interakcija između stanica, sljepljivanje i formiranje sferoida. Na taj način stanicama se manipulira i daje dodatna kontrola (18). U ovome je radu također korištena metoda magnetske levitacije u svrhu istraživanja vremena zadržavanje magnetskih čestica u sferoidima tumorskih stanica dojke. Stanice su tretirane magnetskim česticama te su praćene promjene kroz tri tjedna. Nakon što su se sferoidi formirali iz stanica se izlučuju čestice. Iz rezultata je vidljivo da je najviše magnetskih čestica u prvom tjednu promatranja, a kako vrijeme odmiče, broj magnetskih čestica se smanjuje. Statističkim analizama utvrđeno je statistički značajno smanjenje broja magnetskih čestica između 1. i 3. tjedna.

Iako je jednostavna i lako dostupna, ova metoda posjeduje i određena ograničenja. Vrijeme u kojem stanice dolaze u kontakt je značajno te kontrola veličine stanica jer ju nije moguće precizno pratiti. Učinkovitost metode provjerava se praćenjem uvjeta okoline poput broja stanica i koncentracije magnetskih čestica (19).

3D kulture stanica predstavljaju budućnost u brojnim istraživanjima, gdje magnetska levitacija kao jedan od načina formiranja sferoida ima značajnu ulogu. U daljnjim istraživanjima bilo bi korisno poraditi na ograničenjima magnetske levitacije radi točnosti rezultata i ispitivanja koje uzgoj 3D kultura donosi.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja zaključeno je sljedeće:

1. Broj magnetskih čestica nakon formiranja sferoida se smanjuje, točnije od 1. do 3. tjedna promatranja vidljivo je smanjenje količine magnetskih čestica.
2. Usporedbom između svaka dva tjedna utvrđena je statistički značajna razlika količine magnetskih čestica.

7. SAŽETAK

Ciljevi: Korištenjem metode magnetske levitacije cilj je uzgojiti sferoide tumora dojke različite starosti, odnosno 7, 14 i 21 dan. Zatim odrediti količinu magnetskih čestica u sferoidima u različitim vremenskim razdobljima, odnosno nakon 7, 14 i 21 dan.

Nacrt studije: *In vitro* studija-kontrolirani pokus.

Materijali i metode: 3D kultura stanica dobivena je korištenjem metode magnetske levitacije. Stanicama se dodaju magnetske čestice i uz pomoć vanjskog magnetskog polja formiraju se sferoidi kojima se lako manipulira. Zadržavanje magnetskih čestica u sferoidima stanica tumora dojke MCF-7 praćeno je svjetlosnim mikroskopom na koji je montirana kamera. Prethodno su sferoidi uklopljeni u medij za kriostatsko rezanje, rezani i bojeni. Fotografije su analizirane u programu *Fiji*, a statistika je napravljena u programu R.

Rezultati: Analiziranjem količine magnetskih čestica u sferoidima stanica tumora dojke može se uočiti da je najviše čestica vidljivo u 1. tjednu, te da se njihov broj s vremenom smanjuje. Dobivena je statistički značajna razlika između 1. i 3. tjedna.

Zaključak: Količina magnetskih čestica s vremenom se smanjuje. Broj magnetskih čestica značajno je manji 3. tjedan u odnosu na 1. tjedan.

Ključne riječi: Magnetska levitacija; sferoidi; stanična kultura; tumor dojke

8. SUMMARY

Retention of magnetic particles in breast cancer cells spheroids

Objectives: To grow breast cancer spheroids of different ages, i.e., 7, 14, and 21 days, using the method of magnetic levitation. To determine the number of magnetic particles in the spheroids at different time periods, i.e., after 7, 14, and 21 days.

Study Design: *In vitro* study-controlled experiment

Material and methods: 3D cell culture was obtained by the magnetic levitation method. Magnetic particles were added to the cells and with the help an external magnetic field spheroids were formed. The retention of magnetic particles in MCF -7 breast cancer cells spheroids were monitored whit an optical microscope mounted on a camera. Previously, the spheroids were embedded in a medium for cryostat cutting, cut and stained. Photos were analyzed in Fiji and statistics is performed in R.

Results: When monitoring the retention of magnetic particles in breast cancer cells spheroids, the most particles were visible in the 1st week. By the 3rd week, a decrease in the number of particles was observed. A statistically significant difference was obtained between the 1st and 3rd week.

Conclusion: The number of magnetic particles decreases with time. It is significantly lower in the 3rd week compared to the 1st week.

Key words: Magnetic fields; cell; cell culture techniques; breast cancer

9. LITERATURA

1. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res.* 2017;50,33.
2. Mascara M, Constantinou C. Global Perceptions of Women on Breast Cancer and Barriers to Screening. *Curr Oncol Rep.* 2021;23,74.
3. Okegawa T, Pongo RC, Li Y, Hsieh JT. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim Pol.* 2004; 51(2):445-57.
4. Bahcecioglu G, Basara G, Ellis BW, Ren X, Zorlutuna P. Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment. *Acta Biomater.* 2020; 1;106:1-21.
5. Katt ME, Placone AL, Wong AD, Xu ZS, Searson PC. In vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Front Bioeng Biotechnol.* 2016;4:12.
6. Teimouri A, Yeung P, Agu R. 2D vs. 3D Cell Culture Models for In Vitro Topical (Dermatological) Medication Testing. *Cell Culture.* 2019.
7. Cooper GM, Haudmann RE. Stanica: Molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
8. Villasante A, Robinson ST, Cohen AR, Lock R, Guo XE, Vunjak-Novakovic G. Human Serum Enhances Biomimicry of Engineered Tissue of Bone and Cancer. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021;9:658472.
9. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro A, Fredberg J, Chen Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology(Bethesda).* 2017; 32(4):266-277.
10. Edmondson R, Brogelie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* 2014;12(4):207_218.
11. Hu Q, Liu X, Yang L, Yuan X, Chen Y, Wu W i sur. 3D printed porous microgel for lung cancer cells culture in vitro. *Materials & Design.* 2021. Volume 210.
12. Ballav S, Deshmukh AJ, Siddiqui S, Aich A, Basu. Two-Dimensional and Three-Dimensional Cell Culture and Their Applications. 2021; In *Cell Culture - Advanced Technology and Applications in Medical and Life Sciences*, edited by Xianquan Zhan.

13. Breslin S, O'Driscoll L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget*. 2016; 7(29):45745-45756.
14. Zaroni M, Cortesi M, Zamagni A, Arienti C, Pignatta S, Tesei A. Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. *Journal of Hematology & Oncology*. 2020;13,97.
15. Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet, Delort L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.; 22(22):12200
16. Langhans SA. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front. Pharmacol*. 2018;9:16.
17. Caleb J, Young T. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020;7.
18. Ryu N-E, Lee S-H, Park H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*. 2019;8(12):1620.
19. Kim JA, Choi JH, Kim M, Rhee WJ, Son B i sur. High-throughput generation of spheroids using magnetic nanoparticles for three-dimensional cell culture. *Biomaterials*. 2013;34(34):8555-8563.
20. Patil, I. Visualizations with statistical details: The 'ggstatsplot' approach. *Journal of Open Source Software*. 2021;6(61):3167.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Matea Jagodić

Datum i mjesto rođenja: 06.10.2000., Osijek

Adresa stanovanja: Punitovačka 7, Gorjani

E-mail: jagodicmatea4@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2015. – 2019. – Zdravstvena gimnazija. Medicinska škola Osijek

2019. – 2022. – Sveučilište u Osijeku, Medicinski fakultet, Preddiplomski sveučilišni studij
Medicinsko laboratorijska dijagnostika

AKTIVNOSTI TIJEKOM STUDIJA

Sudjelovanje na radionicama:

- Osnove znanstvenog istraživanja (4. i 5. prosinca 2020.)
- Hematologija (15. travnja 2021.)

Pasivni sudionik 3rd Student Congress OSCON (19.-20. ožujka 2021.)

Voditeljica radionice „Život“ na festivalu znanosti (2.-7. svibnja 2022.)