

Energetski status MRC-5 staničnih sferoida u ovisnosti o veličini sfera i dostupnosti nutrijenata

Main, Ena

Master's thesis / Diplomski 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:152:048317>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Ena Main

**ENERGETSKI STATUS MRC-5
STANIČNIH SFEROIDA U OVISNOSTI O
VELIČINI SFERA I DOSTUPNOSTI
NUTRIJENATA**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Ena Main

**ENERGETSKI STATUS MRC-5
STANIČNIH SFEROIDA U OVISNOSTI O
VELIČINI SFERA I DOSTUPNOSTI
NUTRIJENATA**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Rad je ostvaren na Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Marijana Leventić

Rad ima 26 listova, 1 tablicu i 6 slika.

ZAHVALA

Zahvaljujem ponajprije svojoj mentorici, doc. dr. sc. Marijani Leventić na pruženoj prilici, predloženoj temi i stručnom vodstvu tijekom izrade diplomskog rada.

Posebnu zahvalu želim iskazati svojoj majci, baki i djedu koji su mi bili najveća potpora tijekom studiranja. Hvala vam za svu brigu, strpljenje, podršku i motivaciju koju ste mi dali tijekom studiranja.

1. UVOD	1
1.1. Trodimenzionalna (3D) kultura stanica	1
1.2. MRC-5 stanični sferoidi	3
1.3. Molekula adenozin trifosfat (ATP)	3
2. HIPOTEZA	5
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	6
4. MATERIJALI I METODE	7
4.1. Ustroj studije	7
4.2. Materijali	7
4.3. Kultivacija stanica	7
4.4. Određivanje broja živih stanica	8
4.5. Uzgoj sfere	8
4.6. LDH analiza	10
4.7. Procjena aktivnosti mitohondrija	11
4.8. Kolorimetrijsko određivanje ATP statusa	12
4.9. Statističke metode	13
5. REZULTATI	14
5.1. Udio otpuštenog LDH	14
5.2. Procjena aktivnosti mitohondrija	15
5.3. Kolorimetrijsko određivanje ATP statusa	16
6. RASPRAVA	17
7. ZAKLJUČAK	20
8. SAŽETAK	21
9. SUMMARY	22
10. LITERATURA	23
11. ŽIVOTOPIS	26

Popis kratica

ADP	adenozin difosfat (engl. <i>adenosine diphosphate</i>)
AMP	adenozin monofosfat (engl. <i>adenosine monophosphate</i>)
ATP	adenozin trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i>)
ECM	ekstracelularni matriks (engl. <i>extracellular matrix</i>)
HGF	faktora rasta hepatocita (engl. <i>hepatocyte growth factor</i>)
LDH	laktat dehidrogenaza (engl. <i>lactate dehydrogenase</i>)
MRC-5	Medical Research Council cell strain 5
PBS	puferirana otopina fosfatnih soli (engl. <i>phosphate buffer saline</i>)
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)

1. UVOD

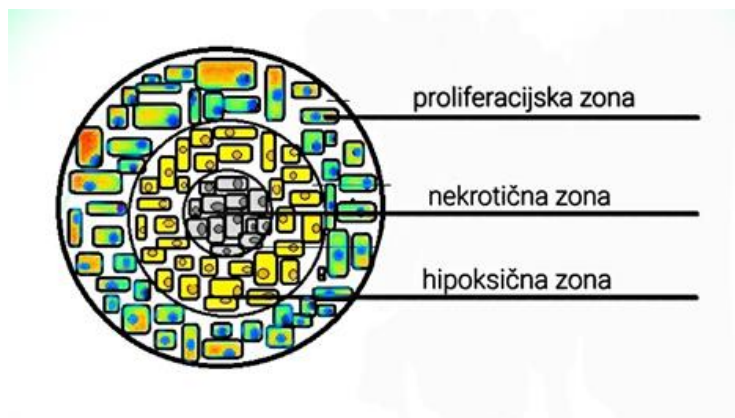
1.1. Trodimenzionalna (3D) kultura stanica

Sve stanice u tijelu žive u trodimenzionalnom (3D) okruženju, što je ključno za njihov metabolizam i rast. Fenotip i funkcija svake stanice uvelike ovise o interakcijama sa susjednim stanicama, ekstracelularnim matriksom (ECM, engl. *extracellular matrix*) i proteinima. Te interakcije razlikuju se između dvodimenzionalnih (2D) i trodimenzionalnih (3D) kultura, kao i između staničnih slojeva u sferoidnim strukturama.

3D kultura stanica metoda je za uzgoj stanica koja približno oponaša *in vivo* uvjete. Tehnika 3D kulture stanica svoj je razvitak počela 1970. godine kada je uspostavljena prva kultura u obliku tekućeg gela od kolagena (1). 3D modeliranje kulture stanica obuhvaća cijele organizme (npr. životinje), organotipične eskplahirane kulture (uključujući i embrije), stanične sferoide te modele tkivnog inženjeringa (2). Najčešće su pak korišteni stanični sferoidi prvenstveno zbog svoje jednostavnosti, a potom i zbog toga što mogu biti proizvedeni iz širokog raspona stanica.

Uspostavljanje sferoida temelji se na agregiranju stanica i, upravo zbog takvog agregiranja, stanice se unutar sferoida nalaze u vrlo bliskom fizičkom kontaktu što omogućava staničnu signalizaciju kakva je primjerice prisutna u tumorima *in vivo* (3).

U 3D staničnoj kulturi mikrokoliš je sličan onome u tkivu jer se stanice unutar sferoida nalaze u različitim fazama rasta, pa tako unutar sferoida razlikujemo tri različite zone rasta (slika 1). Stanicama koje se nalaze u vanjskom sloju sferoida lako su dostupne hranjive tvari iz staničnog medija, pa se upravo iz tog razloga vanjski sloj sferoida naziva proliferacijskom zonom. Vijabilne stanice iz proliferacijskog sloja većinom se nalaze u S fazi staničnog ciklusa i aktivno se umnožavaju. Središnji dio sferoida predstavlja neaktivnu hipoksičnu zonu s nekrotičnim središtem u kojemu su stanice u nekrozi ili apoptozi zbog nedostatka hranjivih tvari i smanjenja dostupnosti kisika (3).



Slika 1. Shematski prikaz strukture sferoida gdje sivo obojani prostor predstavlja nekrotičnu zonu, žuto hipoksičnu zonu, a narančasto – zeleno proliferacijsku zonu (izvor: original autorice rada)

Uzgoj stanica u 3D kulturi vrlo je dobar model za biološka istraživanja zbog visokog potencijala oponašanja stanica u fiziološkom okruženju unutar organizma. Iako stanični sferoidi koji nastaju u 3D kulturi ne mogu biti stopostotna zamjena stvarnom tkivu, puno bolje oponašaju tkivo od jednostavnog uzgoja stanica u monosloju. Takve stanice, uzgojene kao tumorski sferoidi, pokazuju proliferacijski gradijent u ovisnosti o raspodjeli kisika, hranjivih tvari i energije, kao i nakupljenog metabolita od vanjske strane sferoida prema unutrašnjosti, slično nativnom tumorskom tkivu (3). Kako bi se poboljšala usporedivost s *in vivo* stanicama, procesima diferencijacije i modalitetima rasta uspostavljena su istraživanja koja su bazirana na tehnikama 3D kulture stanica, stvarajući sferoide i organoide.

Međutim, stanične linije kultivirane u *in vitro* uvjetima razlikuju se od stanica koje rastu *in vivo* po brojnim svojstvima. Veliku razliku čini živčani i endokrini sustav koji utječe na proliferaciju stanica u organizmu dok on u *in vitro* sustavu ne postoji, kao što su različite i specifične interakcije između stanica u tkivu. Prilikom *in vivo* rasta na jednom se mjestu može nalaziti više staničnih tipova za razliku od *in vitro* kultivacije gdje se uglavnom radi o uzgoju samo jednog staničnog tipa (4).

Stanični sferoidi u 3D kulturi stanica mogu se uzgajati sa ili bez nosača. Uzgoj sferoida bez nosača podrazumijeva sakupljanje stanica u neadherentnim uvjetima. Ovakav način 3D kulture stanica postiže se pomoću slabo prijanjajućih ploča te oblaganjem podloge polihidroksietil metakrilatom ili agarozom. Drugi način uzgoja stanica bez nosača je pomoću metode viseće kapljice, gdje kapljica medija koja sadrži stanice visi s podloge (5). Uzgoj 3D

stanične kulture pomoću nosača pak zahtijeva nosače koji mogu biti izgrađeni od poroznih prirodnih ili umjetnih materijala koji služe kao potpora u formiranju 3D strukture. Uz spomenute načine, sferoidi mogu biti formirani i u bocama s rotirajućim sustavom ili u okretnoj miješalici gdje kao rezultat vrtložnog sustava dolazi do formiranja 3D strukture (5, 6).

1.2. MRC-5 stanični sferoidi

MRC-5 stanice (Medical Research Council cell strain 5) fibroblasta porijeklom su iz pluća abortiranog muškog fetusa starog 14 tjedana. Dobivaju se održavanjem i propagiranjem normalnih diploidnih staničnih linija s kariotipom 46,XY proizvedenih 1966. godine (7).

Vrlo su vrijedne u proizvodnji cjepiva jer podržavaju rast mnogih ljudskih virusa i sterilne su pa se zbog toga koriste, između ostaloga, za uzgajanje virusa potrebnih za proizvodnju cjepiva protiv rubeole, vodenih kozica, ospica, bjesnoće i virusa hepatitisa A (7).

1.3. Molekula adenozin trifosfat (ATP)

Metabolizam stanica vrlo se brzo prilagođava dostupnosti hranjivih tvari i statusu stanične diferencijacije, kao i uvjetima rasta u kulturi. Sukladno tome, definiranje energetskeg statusa staničnih sferoida pruža bolji uvid u metaboličke promjene tijekom 3D uzgoja.

Molekula adenozin trifosfat (ATP) organska je molekula koja pripada skupini adenozin-fosfata u koju se uz ATP ubrajaju još i adenozin difosfat (ADP) i adenozin monofosfat (AMP). Sve tri molekule sastoje se od dušikove baze adenina, šećera riboze i fosfata. ATP je nukleotid koji se sastoji od adeninske baze vezane za šećer ribozu koja je vezana za tri fosfatne skupine koje su jedna s drugom povezane pomoću dvije visokoenergetske veze koje se nazivaju fosfoanhidridne veze. Kada se jedna fosfatna skupina ukloni prekidom fosfoanhidridne veze u procesu koji se naziva hidroliza, oslobađa se energija i ATP se pretvara u ADP. Isto tako, energija se oslobađa i kada se fosfatna skupina ukloni iz ADP-a te nastaje AMP. Energija oslobođena hidrolizom fosfatnih skupina vezanih na pentozni prsten riboze predstavlja

pogonsku energiju u reakcijama koje su potrebne za metaboličke i fizičke funkcije organizma (8).

Konstantna opskrba stanica energijom od ključne je važnosti jer im je ona potrebna za obavljanje osnovnih funkcija koje pomažu održati organizam na životu. Molekula ATP djeluje kao univerzalni stanični energetska kofaktor koji potiče sve životne procese, uključujući ekspresiju gena, metabolizam i transport. ATP se može proizvesti iz glukoze, pa je tako razgradnja ugljikohidrata glavni izvor stanične energije. Sastavni dio medija za uzgoj stanica upravo su glukoza i aminokiseline, stoga dostupnost glukoze u mediju uvelike utječe na proces staničnog disanja kroz koji stanice stvaraju ATP iz glukoze putem glikolize, ciklusa limunske kiseline i oksidativne fosforilacije (8, 9).

Glikoliza je početna faza razgradnje glukoze i ona je zajednička svim stanicama. S obzirom da se reakcije glikolize odvijaju u citosolu stanica bez utroška kisika, glikoliza anaerobnim organizmima može osigurati svu potrebnu metaboličku energiju. Kod aerobnih organizama glikoliza je prva faza nakon koje slijede ciklus limunske kiseline i oksidacijska fosforilacija koje se odvijaju u mitohondrijima. Ciklus limunske kiseline zbiva se u matriksu mitohondrija, dok se oksidacijska fosforilacija odvija na kristama, sastavnim dijelovima unutrašnje membrane mitohondrija (9).

Središnju ulogu u stvaranju ATP-a stoga zauzimaju mitohondriji gdje se prijenos elektrona preko gradijenta protona koristi za generiranje energije koja je potrebna za enzim ATP sintazu, odnosno za stvaranje ATP-a iz ADP-a i fosfata (8).

2. HIPOTEZA

Osnovna pretpostavka ovog istraživanja je da postoji razlika u energetske statusu kod MRC-5 staničnih sferoida različitih veličina i s različitom dostupnošću nutrijenata.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja procijeniti je postoji li razlika u energetsom statusu kod MRC-5 staničnih sferoida različitih veličina i s različitom dostupnošću nutrijenata.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao *in vitro* studija – kontrolirani pokus. Istraživanje je za provedbu odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (klasa: 602-04/22-08/02; ur. broj: 2158-61-46-22-155).

4.2. Materijali

Prilikom formiranja sferoida korištena je odabrana, komercionalno dostupna stanična linija fibroblasta MRC-5 (Medical Research Council cell strain 5; CCL-171™).

Praktični dio istraživanja energetskeg statusa MRC-5 staničnih sferoida proveden je u laboratoriju Zavoda za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Osijek.

4.3. Kultivacija stanica

Adherentne stanice fibroblasta MRC-5 uzgajane su u DMEM mediju obogaćenom s 10 % FBS-om, 2 mM glutaminom i 100 U/0,1 mg penicilinom/streptomicinom.

Stanice su inkubirane u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pri temperaturi od 37°C i 5 % CO₂ uz visoku vlažnost.

4.4. Određivanje broja živih stanica

Broj živih stanica određen je pomoću eritrozina B boje. To je kisela boja koja se veže na osnovne komponente stanice, uglavnom proteine koji se nalaze u citoplazmi. Eritrozinom se utvrđuje postotak živih i mrtvih stanica u uzorcima. U postupku bojanja uzeto je 50 μ l stanične suspenzije i 100 μ l boje. Prije uzimanja stanične suspenzije istu je potrebno resuspendirati pomoću pipete kako bi se spriječilo stanice da padnu na dno.

Stanice su nakon obojenja brojane pod mikroskopom u komorici po Bürker-Türku (slika 3). Mrtve stanice nemaju aktivne pumpe kako bi izbacile boju, što je razlog njihovog obojenja u jarko ružičastu boju, dok žive stanice ostaju nebojene. Zbrojene su sve nebojene žive stanice i broj je pomnožen s $\frac{3}{4}$, gdje 3 predstavlja faktor razrjeđenja, a 4 broj komorica koje gledamo. Rezultat je izražen u broju stanica $\times 10^4$ po ml.

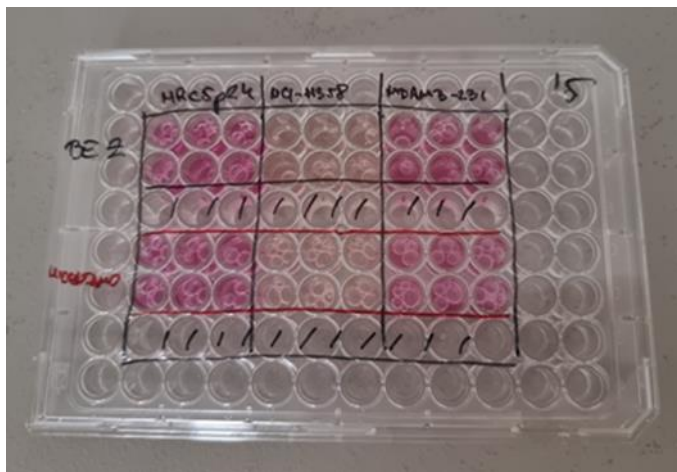


Slika 2. Komorica po Bürker-Türku (izvor: original autorice rada)

4.5. Uzgoj sfere

Stanične linije namijenjene formiranju staničnih sferoida najprije se tripsiniziraju te resuspendiraju u mediju za uzgoj stanica. Stanice su potom nasađene na mikrotitarske ploče s V-dnom i slabo prijanjajućom podlogom u koncentraciji od 1×10^4 stanica/ml u volumenu od

200 μ l. Mikrotitarske ploče prije nasađivanja bilo je potrebno adekvatno označiti – jažice koje sadrže stanične sferoide kojima neće biti mijenjan medij i one kojima će se medij mijenjati svakih nekoliko dana, odvojene pomoću 3 prazne jažice ispunjene PBS-om (slika 4).



Slika 3. Mikrotitarska ploča (izvor: original autorice rada)

Nasađene mikrotitarske ploče centrifugirane su na 1100 rpm tijekom 10 min (Eppendorf centrifuga, model 5804/5804 R), što pridonosi stvaranju staničnih sferoida (slika 5).



Slika 4. Centrifugiranje stanica (izvor: original autorice rada)

U svrhu formiranja staničnih sferoida, stanice su nakon centrifugiranja ostavljene u CO₂ inkubatoru na 37 °C i 5 % CO₂ u jažicama sa slabo prijanjajućim dnom. Sfere su uzgajane u dva

različita seta, jedan set tijekom 8, a drugi tijekom 13 dana. Jednom setu staničnih sferoida redovno je mijenjan medij za uzgoj (svakih nekoliko dana), dok je uzgoj drugog seta staničnih sferoida tekao bez izmjene medija.

4.6. LDH analiza

Prilikom stanične smrti dolazi do gubitka integriteta stanične membrane, što vodi oslobađanju citoplazmatskih enzima u okolinu. Upravo se iz tog razloga stanična smrt često ispituje pomoću kvantifikacije oštećenja stanične membrane.

LDH analiza temelji se na mjerenju aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze (LDH) oslobođenog iz oštećenih stanica. LDH je citoplazmatski enzim koji katalizira pretvorbu laktata u piruvat tijekom glikolize, a njegova aktivnost u mediju za uzgoj stanica direktno je proporcionalna povećanju broja stanica s oštećenom membranom, što LDH analizu čini citotoksičnim testom.

Aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) mjerena je u staničnom supernatantu jer se taj citoplazmatski enzim tijekom oštećenja membrane oslobađa u supernatant gdje se lako mjeri pomoću standardnih reagensa. Korištena analiza temelji se na kolorimetrijskom mjerenju ljubičastog formazana koji je nastao enzimatskom reakcijom u dva koraka. U prvom koraku LDH koji je prisutan u staničnom supernatantu katalizira pretvorbu laktata u piruvat, pri čemu se koenzim NAD^+ reducira u NADH. U drugom se koraku NADH oksidira u NAD^+ , dok katalizator diaforaza posreduje pretvorbu tetrazolijeve soli INT (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil tetrazolium klorid) u ljubičasti formazan, čija je količina direktno proporcionalna aktivnošću enzima LDH u mediju za održavanje stanica (10).

Udio otpuštenog LDH utvrđen je pomoću komercijalno dostupnog kompleta za kolorimetrijsko određivanje aktivnosti enzima LDH. Na dan analize 100 μl supernatanta preneseno je na ploču s 96 jažica i inkubirano tijekom 4 sata u CO_2 inkubatoru s 100 μl otopine C koja je pripremljena miješanjem 250 μl otopine A (pripremljena otapanjem liofiliziranog katalizatora - diaforaza/ NAD^+) i 11.25 ml otopine B (pripremljena otapanjem smrznute

originalne otopine INT boje) prema uputama proizvođača (LDH Cytotoxicity Detection Kit, TAKARA BIO INC.).

Niske kontrole pripremljene su dodavanjem 100 µl medija bez stanica i 100 µl reakcijske otopine C. Visoke kontrole pripremljene su dodatkom supernatanta stanica tretiranih Tritonom X-100 i 100 µl reakcijskog pufera C. Ploča je bila zaštićena aluminijskom folijom i ostavljena na sobnoj temperaturi 30 min. Po završetku inkubacije na čitaču mikroploča (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) izmjerena je apsorbancija na 515 nm, a na temelju očitanih apsorbancija određen je udio otpuštenog LDH u mediju. Udio LDH izračunao se preko apsorbance sfera tretiranih sa 1% TritonX prema preporuci proizvođača, koji uzrokuje potpuno oštećenje stanica i time maksimalno oslobađanje LDH u medij. Sfere kod kojih je maksimalno otpušten LDH uzgajane su pod istim uvjetima kao i sfere od interesa. Prije izračuna udjela LDH od svih dobivenih apsorbanci oduzeta je vrijednost medija za uzgoja kako bi se nulirao utjecaj LDH iz medija.

4.7. Procjena aktivnosti mitohondrija

Utvrđivanje aktivnosti mitohondrija može se postići određivanjem promjene mitohondrijskog membranskog potencijala (11). U zdravim stanicama s aktivnim mitohondrijima negativni naboj koji je uspostavljen očuvanom mitohondrijskom membranom omogućava ulazak boje u matriks mitohondrija gdje se ona potom nakuplja i emitira fluorescentni signal (12).

TMRE (tetrametilrodamin, etil ester) boja koristi se za označavanje aktivnih mitohondrija. To je lipofilna, stanično propusna, pozitivno nabijena, crveno-narančasta boja koja se lako nakuplja u aktivnim mitohondrijima zbog njihovog negativnog naboja, za razliku od neaktivnih mitohondrija kod kojih zbog pogubnih uvjeta dolazi do kolapsa mitohondrijskog elektrokemijskog potencijala zbog čega se mitohondrijska membrana depolarizira i signal TMRM boje se smanjuje (13). Kod aktivnih mitohondrija akumulacija boje proporcionalna je

negativnošću naboja što znači da nakon gubitka membranskog potencijala, mitohondriji ne mogu zadržati boju i fluorescencija se smanjuje (14).

Za određivanje aktivnosti mitohondrija prikupljene su sfere iz 28 jažica koje su inkubirane u različitim vremenskim intervalima sa i bez izmjene medija. Sfere su isprane pomoću PBS-a nakon čega su ostavljene pod tripsinom 3 minute kako bi se razdvojile na pojedinačne stanice. Tripsin je zatim inaktiviran svježim medijem te je nakon centrifugiranja uklonjen sa stanica. Stanice iz sfera inkubirane su TMRE bojom (TMRE Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit, abcam, Cambridge, UK) u koncentraciji od 200 nM tijekom 30min u CO₂ inkubatoru. Po završetku inkubacije sa stanica je uklonjena boja i stanice su resuspendirane u PBS-u. Intenzitet fluorescencije izmjeren je na čitaču mikroploča (Spark, Tecan) pri Ex/Em = 530/580.

4.8. Kolorimetrijsko određivanje ATP statusa

Kolorimetrijska analiza metoda je apsorpcijske spektroskopije pomoću koje se određuju koncentracije obojenih otopina koje apsorbiraju u vidljivom ili bliskom UV dijelu spektra. Boja koju otopina neke tvari reflektira komplementarna je boji koju ta tvar apsorbira. Kolorimetrija je temeljena na preciznom mjerenju apsorbirane svjetlosti, odnosno uspoređuje intenzitet boje nepoznate otopine s jednim ili više standardnih otopina poznate koncentracije. Ukoliko je ispitivana tvar u otopini bezbojna, potrebno je dodati reagens koji zajedno s tom tvari daje obojenje. S obzirom da se u ovoj metodi koristi polikromatsko zračenje, isključena je mogućnost kvalitativne analize, dok kvantitativna kolorimetrijska analiza primjenjuje LambertBeer-ov zakon i mjeri apsorbanciju uz prethodno eksperimentalno definiranu funkcionalnu vezu apsorbancije i koncentracije koje su linerano ovisne (15).

Kako bi se odredio ATP status u staničnim sferama, bilo je potrebno prikupiti sfere iz 32 jažice. Kolorimetrijska analiza provedena je prema uputama proizvođača ATP Assay Kit (abcam, Cambridge, UK). Na prikupljene sfere dodan je ATP pufer za lizu stanica. Stanice s dodanim puferom potom su centrifugirane tijekom 6 minuta na 1500 rpm pri temperaturi 4°C te je supernatant pokupljen u novu tubicu. Dobiveni uzorak deproteiniziran je pomoću perklorne

kiseline u finalnoj koncentraciji od 1 M te neutraliziran s kalijevim hidroksidom dodanim u 30 %-tnom volumenu od ukupnog volumena koncentracije 2M. Supernatant je, nakon centrifugiranja, prenesen u novu tubicu i pripremljen za analizu na ploči od 96 jažica.

Na uzorke je dodan reakcijski miks koji se sastoji od ATP pufera, ATP probe, ATP pretvarača i razvijaa boje. Pozadinska reakcija pripremljena je kao i ATP reakcijska smjesta bez ATP pretvarača. Pripremljen je ATP standardni pravac iz ATP standarda u koncentraciji od 0 do 10 nmol po jažici. Reakcijska smjesa inkubirana je tijekom 30 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi, nakon čega je izmjerena absorbanca na 515 nm pomoću čitača mikroploča (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA).

ATP koncentracija izračunata je po formuli:

$$ATP \text{ koncentracija} = \left(\frac{B}{V} * D \right) * DDF$$

U formuli B predstavlja količinu ATP-a u uzorku dobivenu iz standardnog pravca, V je volumen uzorka, D faktor razrijeđenja, dok je DDF deproteinizacijski faktor razrijeđenja (izračunat prema uputama proizvođača).

4.9. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti više ponovljenih rezultata. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli određena je Kolmogorov – Smirnovljevim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između ispitivanih skupina testirane su analizom varijance (ANOVA) korištenjem Tukey-Kramer testa. Kao prag statističke značajnosti uzeta je vrijednost $P < 0,05$. Za analizu podataka koristio se statistički program MedCalc (16).

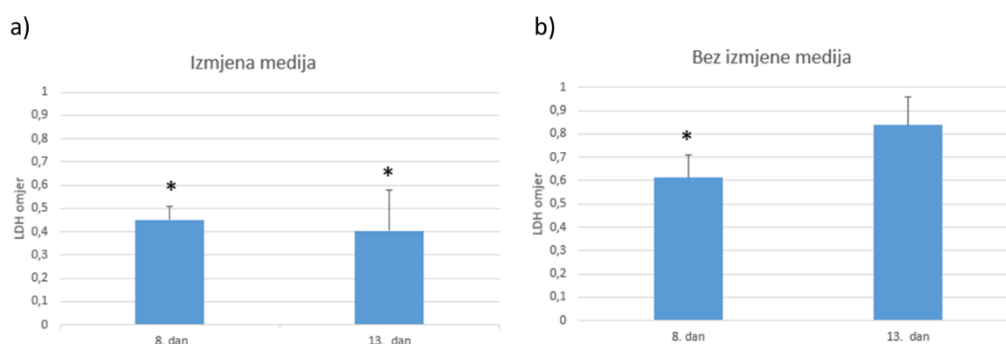
5. REZULTATI

5.1. Udio otpuštenog LDH

Rezultati vidljivi na slici 5. prikazuju omjer otpuštenog LDH iz staničnih sferoida i maksimalno otpušteni LDH u sferama tretiranim TritonX-om gdje sve stanice imaju narušeni integritet stanične membrane. Sfere kojima je maksimalno narušen stanični integritet pod utjecajem TritonX-a uzgajane su pod istim uvjetima kao i sfere od interesa. Nije utvrđena statistički značajna razlika između 8. i 13. dana uzgoja unutar grupe sfera s izmjenom medija, kao ni u grupi bez izmjene medija.

Statističkom analizom sfera koje su redovno prihranjivane utvrđena je razlika u udjelu otpuštenog LDH nakon 8. dana od $0,45 \pm 0,05$ ($P < 0,001$) u odnosu na maksimalno otpušteni LDH. Nakon produženog vremena uzgoja (13. dan) uz izmjenu medija udio LDH od $0,40 \pm 0,17$ statistički značajno ($P < 0,001$) razlikuje se od maksimalno otpuštenog LDH (slika 5 a)).

MRC-5 sfere koje su uzgajane bez izmjene medija pokazuju udio otpuštenog LDH nakon 8. dana uzgoja od $0,61 \pm 0,1$ koji se statistički značajno razlikuje ($P < 0,003$) od maksimalno otpuštenog LDH. Nije utvrđena statistički značajna razlika u sferama uzgajanih kroz 13 dana bez izmjene medija u odnosu na maksimalno otpušteni LDH (slika 5 b)).

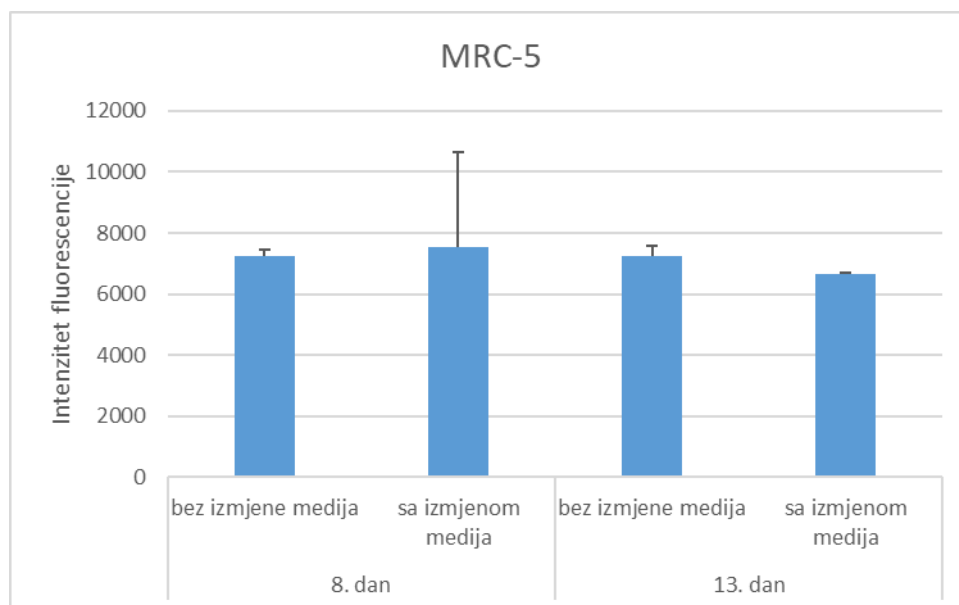


Slika 5. Omjer otpuštenog LDH iz sfera u odnosu na maksimalno otpušteni LDH u mediju. Na grafu a) prikazan je otpušteni LDH kod sfera s kontinuiranom izmjenom medija, a na grafu b) prikazan je otpušteni LDH kod sfera bez izmjene medija. Analiza LDH provedena je nakon 8. i 13. dana uzgoja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri ponavljanja. Statistička značajnost označena je zvjezdicom (*).

5.2. Procjena aktivnosti mitohondrija

Aktivnost mitohondrija u skupinama staničnih sferoida sa i bez izmjene medija određena je mjerenjem fluorescencije TMRE boje koja je proporcionalna aktivnosti mitohondrija. Smanjeni intenzitet fluorescencije odražava se u stanicama s narušenim mitohondrijskim sustavom zbog nemogućnosti zadržavanja boje.

Mjerenjem fluorescencije TMRE boje dobivena je podjednaka razina intenziteta u svim analiziranim grupama. Nije utvrđena statistički značajna razlika u aktivnosti mitohondrija MRC-5 sfera nakon 8. i 13. dana uzgoja. Također, nije zabilježena statistički značajna razlika između grupa sfera sa i bez izmjene medija (slika 6).



Slika 6. Aktivnost mitohondrija kod MRC-5 stanica uzgojenih kao sfere kroz 8 i 13 dana, sa i bez izmjene medija. Stanice su obojane TMRE bojom u koncentraciji 200 nM. Intenzitet fluorescencije prikazan je kao srednja vrijednost rezultata testova pripremljenih u duplikatu.

5.3. Kolorimetrijsko određivanje ATP statusa

Tablica 1. prikazuje koncentraciju ATP-a dobivenu kolorimetrijskom analizom. Nije utvrđena razlika u koncentraciji ATP-a između ispitivanih skupina nakon 8. niti nakon 13. dana uzgoja. Koncentracija ATP-a u ovisnosti o dostupnosti nutrijenata nešto je veća kod MRC-5 sfera sa izmjenom medija nakon 8. dana inkubacije, za razliku od ostalih mjerenja gdje nije zapažena razlika.

Tablica 1. Vrijednosti izmjerenog ATP

ATP status – MRC-5 stanični sferoidi		
Vrijeme inkubacije	Skupina	ATP (nmol/μl)
8. dan	bez izmjene medija	0,060
	sa izmjenom medija	0,071
13. dan	bez izmjene medija	0,067
	sa izmjenom medija	0,060

6. RASPRAVA

Tijekom posljednjih 15-ak godina troškovi uspješnog istraživanja utjecaja raznih spojeva i uvjeta uzgoja dosežu vrlo velike razmjere (17). Danas je uobičajeno da se potencijalni učinci prvo istraže u *in vitro* uvjetima na stanicama u 2D kulturi, nakon čega slijedi nastavak ispitivanja na animalnim modelima, a zatim i na ljudima u kliničkim studijama (18). Kako bi troškovi i vrijeme istraživanja bili smanjeni, najveći napori usmjereni su prema razvitku *in vitro* modela koji uključuje 2D kulturu stanica kao temeljni stanični model (18) koji se nadopunjava s 3D kulturom stanica koja, između ostalog, predstavlja dobar model za testiranje spojeva s visokim potencijalom oponašanja kompleksa 3D organizacije tumorskog tkiva *in vivo*. Kimlin i sur. detaljno su istražili 3D rast uspostavljenih staničnih linija i zaključili da takve stanične kulture posjeduju nekoliko *in vivo* karakteristika tumora kao što su međustanična interakcija, hipoksija, odgovarajuće prodiranje lijeka, odgovor i otpornost te proizvodnja/taloženje izvanstaničnog matriksa (19).

Sve stanice u tijelu žive u 3D okruženju koje je ključno za njihov metabolizam i rast. Fenotip i funkcija svake stanice u znatnoj mjeri ovise o interakcijama sa susjednim stanicama, ekstracelularnim matriksom (ECM) i proteinima (20). Te interakcije između stanica te stanice i ECM razlikuju se između 2D i 3D kulture, kao i između staničnih slojeva u sferoidnim strukturama, što može utjecati na rezultate citotoksičnosti (21). Iz tog razloga ispitivanje citotoksičnosti na 2D staničnim kulturama nije točno predviđanje onoga što se može očekivati u tijelu (20, 22). 3D stanične kulture ipak preciznije oponašaju prirodno stanično mikrookruženje. Morfologija i fiziologija stanica u 3D kulturama razlikuju se od stanica u 2D kulturama, pokazujući rezultate koji više odgovaraju ponašanju *in vivo* (22). U 2D modelima, molekule se mogu izlučiti u medij kulture te će, sukladno tome, promjena medija ukloniti te tvari što može utjecati na rezultate. Na primjer, u 2D modelu Alzheimerove bolesti, uklanjanje medija značilo bi da se izlučeni amiloid beta (A β) odbacuje i, prema tome, mijenja rezultate agregacije A β . Za razliku od 2D kulture, 3D stanične kulture mogu ograničiti difuziju A β u medij kulture (23).

Stanična linija MRC-5 pripada normalnim stanicama fibroblasta koju karakteriziraju spori rast i duže vrijeme udvostručavanja u kulturi (24). Te stanice pokazuju veliku sposobnost agregacije i stvaranja čvrstih staničnih sfera, te se kao takve MRC-5 stanice često koriste u 3D

kokulturama za formiranje tumorskih modela (25). Za stvaranje kompaktne 3D arhitekture sa uspostavljenim međustaničnim interakcijama u sferama za rekonstrukciju što realističnijeg modela tumorskog tkiva potrebno je vrijeme. Gradijent difuzije nutrijenata, kisika i metaboličkog otpada, slojevita organizacija stanica s različitom brzinom proliferacije, ekspresija specifičnih genskih obrazaca, prisutnost interakcije između stanica te signalizacija samo su neki od ključnih čimbenika tumora *in vivo* koje sfere mogu prikazivati (26). Jedna od karakteristika MRC-5 stanica zbog koje je zastupljena u kokulturama izlučivanje je faktora rasta hepatocita (HGF, engl. *hepatocyte growth factor*) koji podržava proliferaciju i migraciju nekoliko vrsta raka (26). Stanice fibroblasta zajedno sa stanicama raka za formiranje višestaničnog 3D modela uzgajane su kroz tjedan dana kako bi se stvorile stabilne sfere pogodne za daljnje istraživanje (27). Istraživanje u kojem su MRC-5 stanice korištene u kokulturi za određivanje koncentracije faktora rasta, citokina i kemokina provedeno je na sferama koje su uzgajane 11 dana (28).

Iako se sfere fibroblasta najčešće spominju u kokulturama s tumorskim stanicama, nedostatna literatura o karakteristikama MRC-5 sferama otvara područje za istraživanje. Kako bi utvrdili energetske status sfere različitih veličina, MRC-5 sfere uzgajane su kroz osam i trinaest dana. U svrhu određivanja energetske statusa sferoida jedna grupa sfera imala je kontinuirani izvor nutrijenata iz svježeg medija, dok je drugoj skupini reducirani izvor nutrijenata.

Mitochondriji, kao značajni organeli u kontroli i regulaciji energetske statusa stanice, dinamički odgovaraju zahtjevima unutar stanice u odnosu na okružje u kojemu se stanica nalazi. Otkrivena je povezanost mitohondrijskog sustava s ravnotežom između potražnje stanice za energijom i opskrbe nutrijentima, povezujući promjene u arhitekturi mitohondrija kao mehanizam za prilagodbu. Kako mitochondriji nisu statični organeli, energetske zahtjeve stanica modeliraju fuzijom (spajanjem) ili fizijom (cijepanjem) mitohondrija. Stanice koje imaju neograničen izvor nutrijenata imaju tendenciju svoje mitochondrije držati u odvojenom (fragmentiranom) rasporedu, za razliku od slučaja kada je stanici reducirani izvor nutrijenata gdje se mitochondriji povezuju (29). Učinak dostupnosti nutrijenata i vremena uzgoja sfera na aktivnost mitohondrija procijenjena je mjerenjem intenziteta fluorescencije TMRE boje koja se nakuplja u funkcionalnim mitohondrijima. U svim analiziranim grupama sfera zabilježen je podjednak intenzitet fluorescencije bez statističke značajnosti. Nadalje, kolorimetrijski određena koncentracija ATP-a u MRC-5 sferama nije statistički značajna između grupa sfera.

Mjerenjem zastupljenosti LDH enzima u mediju za uzgoj procijenjen je integritet stanične membrane kao pokazatelj vijabilnosti stanice. Udio stanica s narušenim integritetom stanične membrane od oko 0,4 zabilježen je kod sfera koje su uzgajane uz redovnu izmjenu medija u oba vremena, a statistički je značajno manji od kontrolnih sfera kod kojih je maksimalno narušen integritet stanične membrane. Promatrajući utjecaj vremena uzgoja na udio LDH nije zabilježena statistička značajnost kod uzgoja s redovnom izmjenom medija kao ni kod sfera koje su uzgajane bez izmjene medija. Citoplazmatski LDH brzo se otpušta u stanični medij kada je plazmatska membrana oštećena, kao posljedica događaja unutar stanica koje mogu dovesti do apoptoze, nekroze ili nekog drugog oblika stanične smrti (30). Zabilježeni udio stanica s oštećenom staničnom membranom u sferama sa stalnim izvorom nutrijenata sugerira na formiranje nekrotične sfere unutar staničnog sferoida. Povećana osjetljivost stanica u sferi vidljiva je kod uzgoja s reduciranim izvorom nutrijenata gdje je zabilježen veći udio otpuštenog LDH. Iako je zabilježen narušen stanični integritet u sferama koje su uzgajane u reduciranim uvjetima, promjena u dinamici mitohondrija nije zabilježena. Mitohondriji kao multifunkcionalni organi sudjeluju u biosintezi, metabolizmu i funkcijama stanične smrti ili preživljenja. Odgovor stanice na fiziološke uvjete i okolišne podražaje odražava se u promjeni broja, morfologiji, raspodjeli i aktivnosti mitohondrija (31). Istraživanje Horn-a i suradnika (32) ukazuje na ulogu mitohondrija u lokaliziranoj staničnoj signalizaciji kod stanica s oštećenom plazmatskom membranom. Dobiveni rezultati između sfera uzgajanih pod istim uvjetima kroz različito vrijeme ne upućuju na promjenu veličine sfere tj. rasta sfera kroz duže vrijeme od 13 dana. Daljnja analiza ove pretpostavke svakako bi se trebala odrediti mikroskopski.

Dobiveni rezultati upućuju na potrebu prehranjivanja sfera formiranih od MRC-5 stanica koje kroz duži period uzgoja pokazuju smanjenje vijabilnosti. Osjetljivost sfera odražava se nedostatkom nutrijenata u mediju za uzgoj. Za bolje razumijevanje postavljenih pretpostavki i biokemijskih procesa unutar MRC-5 sfera potrebna su opsežnija istraživanja.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata možemo zaključiti da:

- nije zabilježena statistički značajna razlika u udjelu LDH između sfera uzgajanih kroz 8 i 13 dana sa izmjenom medija, kao ni kod sfera bez izmjene medija
- sfere uzgajane s reduciranim nutrijentima pokazuju narušen integritet stanične membrane kod većine stanica
- nije zabilježena statistički značajna promjena u aktivnosti mitohondrija MRC-5 staničnih sferoida s obzirom na duljinu uzgoja i dostupnost nutrijenata
- nije zabilježena promjena u koncentraciji ATP-a u ovisnosti o veličini sfera i dostupnosti nutrijenata

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Procijeniti razliku u energetske statusu kod MRC-5 staničnih sferoida različitih veličina i s različitom dostupnošću nutrijenata.

Nacrt studije: *In vitro* studija – kontrolirani pokus

Materijali i metode: Prilikom formiranja staničnih sferoida korištena je odabrana, komercionalno dostupna stanična linija MRC-5 (Medical Research Council cell strain 5; CCL-171™). Stanice su uzgojene u jažicama sa slabo prijanjajućim dnom kako bi se formirali stanični sferoidi. Jednom setu sferoida redovno je izmjenjivan medij za uzgoj, dok je drugi set staničnih sfera uzgojen bez izmjene medija. Sfere za analizu prikupljene su nakon 8. i 13. dana uzgoja, nakon čega je uslijedilo određivanje udjela enzima LDH, aktivnost mitohondrija i kolorimetrijsko određivanje koncentracije ATP-a.

Rezultati: Nije zabilježena značajna razlika u udjelu LDH između sfera uzgajanih tijekom 8 i 13 dana, sa i bez izmjene medija. Udio LDH od oko 0,4 vidljiv je u sferama s redovnom izmjenom medija neovisno o vremenu inkubacije. Sfere uzgajane u uvjetima s reduciranim nutrijentima odražavaju veću osjetljivost s povećanim udjelom stanica koje imaju narušen stanični integritet. Zabilježena je podjednaka aktivnost mitohondrija i koncentracija ATP-a između grupa sfera bez statističke značajnosti.

Zaključak: Dostupnost nutrijenata pri uzgoju i održavanju kulture MRC-5 staničnih sferoida dovodi do promjene otpuštenog LDH u stanični medij bez promjena mitohondrijskog potencijala i koncentracije ATP-a između seta sfera.

Ključne riječi: ATP, MRC-5, stanični sferoidi, LDH, energetske status

9. SUMMARY

Energy status of MRC-5 cell spheroids depending on sphere size and nutrient availability

Aim: The main goal of this study was to evaluate the difference in energy status of MRC-5 cell spheroids of different sizes and with different availability of nutrients.

Study design: *In vitro* study - controlled experiment

Materials and methods: During the formation of cell spheroids, the selected, commercially available cell line MRC-5 (Medical Research Council cell strain 5; CCL-171™) was used. Cells were cultured in wells with faintly adhering base to form cell spheroids. One set of spheroids was cultured with a regularly change of culture medium, while the other set of cell spheres was cultured without medium change. Spheres were collected after the 8th and 13th days of cultivation, followed by the determination of LDH enzyme proportion, mitochondrial activity and colorimetric determination of ATP concentration.

Results: No significant difference was recorded in the proportion of LDH between the spheres grown for 8 and 13 days, with and without medium change. The proportion of LDH of about 0,4 is visible in spheres with regular medium changes, regardless of incubation time. Spheres cultured under nutrient-reduced conditions reflect greater sensitivity with an increased proportion of cells with compromised cellular integrity. Mitochondrial activity and ATP concentration were recorded to be equal between groups of spheres without statistical significance.

Conclusion: The availability of nutrients during the cultivation and maintenance of the culture of MRC-5 cell spheroids leads to a change of the released LDH into the cell medium without changes in the mitochondrial potential and the ATP concentration between the set of spheres.

Keywords: ATP, MRC-5, cell spheroids, LDH, energy status

10. LITERATURA

1. Koledova Z. 3D Cell Culture: An Introduction. *Methods Mol Biol.* 2017; 1612: 1 - 11.
2. Haycock JW. 3D Cell Culture: a review of current approaches and techniques. *Methods Mol Biol.* 2011; 695: 1 - 15.
3. Costa EC, Moreira AF, Melo-Diogo D, Gaspar VM, Carvalho MP, Correia IJ. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol. Adv.* 34 (8) 2016; 1427 - 1441.
4. Glavaš-Obrovac Lj. *Kultura stanica. Interna skripta za studente doktorskog studija Biomedicina i zdravstvo. Osijek: Medicinski fakultet Osijek Sveučilište „J. J. Strossmayer“; 2008.*
5. Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Advanced cell culture techniques for cancer drug discovery. *Biology.* 2014.;3(2):345–67.
6. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* svibanj 2014.;12(4):207–18.
7. Frank Destefano, Paul A. Offit, Allison Fisher. *Vaccine Safety. Plotkin's Vaccines.* 7. izd. 2018. str. 1584-1600.
8. Dunn J., Grider M. H. *Physiology, adenosine triphosphate. StatPearls, Treasure Island, FL.* 2021.
9. Berg J., Tymoczko J., Stryer L. (2019): *Biochemistry.* MacMillan, New York.
10. Takara Bio Inc. *LDH Cytotoxicity Detection Kit. Product manual.*
11. Rosenkranz SC et al. Enhancing mitochondrial activity in neurons protects against neurodegeneration in a mouse model of multiple sclerosis. *Elife* 10:N/A. 2021.
12. Yamada Y., Munechika R., Satrialdi Kubota F., Sato Y., Sakurai Y., Harashima H. Mitochondrial Delivery of an Anticancer Drug Via Systemic Administration Using a Mitochondrial Delivery System That Inhibits the Growth of Drug-Resistant Cancer Engrafted on Mice. *J Pharm Sci* 2020; (109):8 2493-2500
13. Dane M. Wolf, Marc Liesa. *Methods in Cell Biology,* 2020.
14. Samuel Chackalamannil, David Rotella, Simon Ward. *Comprehensive Medicinal Chemistry III,* 2017.
15. Ohta N, Robertson A. *Colorimetry: Fundamentals and Applications.* Engleska: John Wiley & Sons; 2005.

16. MedCalc® Statistical Software version 20.112 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2022)
17. Brajša K, Trzun M, Zlatar I, Jelić D. Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery. *Period Biol.* 2016.;118(1):59-65.
18. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol. svibanj* 2014.;12(4):207–18.
19. Kimlin L. C., Casagrande G. & Virador V. M. *In vitro* three-dimensional (3D) models in cancer research: an update. *Mol. Carcinog.* 2013. 52, 167–182.
20. Lee J., Lilly G.D., Doty R.C., Podsiadlo P., Kotov N.A. In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture. *Small.* 2009;5:1213–1221.
21. Moshksayan K., Kashaninejad N., Warkiani M.E., Lock J.G., Moghadas H., Firoozabadi B., Saidi M.S., Nguyen N.T. Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture. *Sens. Actuators B Chem.* 2018;263:151–176.
22. Edmondson R., Broglie J.J., Adcock A.F., Yang L.J. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev. Technol.* 2014;12:207–218.
23. Centeno E.G.Z., Cimarosti H., Bithell A. 2D versus 3D human induced pluripotent stem cell-derived cultures for neurodegenerative disease modeling. *Mol. Neurodegener.* 2018;13:27.
24. Wu F, Reddy K, Nadeau I, Gilly J, Terpening S i Clanton DJ. Optimization of a MRC-5 cell culture process for the production of a smallpox vaccine. 2005.
25. Zuchowska A, Jastrzebska E, Zukowski K, Chudy M, Dybko A i Brzozka Z. A549 and MRC-5 cell aggregation in a microfluidic Lab-on-a-chip system. *Biomicrofluidics.* 2017;11(2):024110.
26. Lazzari G, Nicolas V, Matsusaki M, Akashi M, Couvreur P, Mura S. Multicellular spheroid based on a triple co-culture: A novel 3D model to mimic pancreatic tumor complexity. 2018.
27. Madsen NH, Nielsen BS, Nhat SL, Skov S, Gad M, Larsen J. Monocyte Infiltration and Differentiation in 3D Multicellular Spheroid Cancer Models. *Pathogens.* 2021;10(8):969.

28. Kuen J, Darowski D, Kluge T, Majety M. Pancreatic cancer cell/fibroblast co-culture induces M2 like macrophages that influence therapeutic response in a 3D model. *PLoS One*. 2017;12(7):e0182039.
29. Liesa M, Shirihai OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab*. 2013;17(4):491-506.
30. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018.
31. Chen Y, Zhongyang Z i Wang M. Mitochondria, Oxidative Stress and Innate Immunity. 2018.
32. Horn A, Raavicharla A, Shah S, Cox D, Jaiswal JK. Mitochondrial fragmentation enables localized signaling required for cell repair. 2020.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ena Main

Datum i mjesto rođenja: 29. 10. 1998., Virovitica, Republika Hrvatska

Adresa stanovanja: Grofa Janka Draškovića 1, 33520 Slatina

E-mail adresa: ena.main@gmail.com

Obrazovanje:

2005. – 2009. Osnovna škola Eugena Kumičića, Slatina

2009. – 2013. Osnovna škola Josipa Kozarca, Slatina

2013. – 2017. Matematička gimnazija, Gimnazija Petra Preradovića Virovitica

2017. – 2020. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko – laboratorijska dijagnostika,
Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijek

2022. – 2022. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko – laboratorijska dijagnostika,
Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijek

Sudjelovanje na projektima

Sudjelovanje na Festivalu znanosti 2. – 7.5.2022., radionica pod nazivom "Kako živimo?"