

# Energetski profil stanica u sferoidima karcinoma pluća

---

Jančić, Sara

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:437225>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-20**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Sara Jančić**

**ENERGETSKI PROFIL STANICA U  
SFEROIDIMA KARCINOMA PLUĆA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2022.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Sara Jančić**

**ENERGETSKI PROFIL STANICA U  
SFEROIDIMA KARCINOMA PLUĆA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2022.**

Rad je ostvaren u Medicinskom fakultetu Osijek

Mentor rada: doc. dr. sc. Dario Mandić

Rad ima 33 lista, 1 tablicu i 10 slika.

*Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Dariju Mandiću na stručnom vodstvu, pomoći i pruženoj prilici za suradnju.*

*Veliko hvala doc. dr. sc. Marijani Leventić na ugodnoj surdanji, brojnim savjetima i razumijevanju. Hvala na pomoći pri izradi rada te jedinstvenoj prilici za rad u Laboratoriju za kulturu stanica.*

*Također zahvaljujem bacc. med. lab. diag. Ivani Jelavić na korisnim savjetima tijekom istraživanja.*

*Najveća zahvala ide mojoj obitelji, dečku i prijateljima jer su bili velika podrška tokom cijelog studija. Hvala na svakoj motivaciji i ohrabrenju, a najviše na razumijevanju. Nije bilo lako studirati u Osijeku i istovremeno stažirati u Zagrebu, no uz vaše savjete i potporu i to sam uspješno odradila.*

*Zahvaljujem i kolegama iz Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb koji su me podupirali i izlazili ususret kad god je trebalo.*

*Hvala vam svima!*

Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Karcinom pluća</b> .....	1
<b>1.2. Trodimenzionalna kultura stanica</b> .....	2
1.2.1. Sferoidi .....	3
<b>1.3. Kultura tumorskih stanica</b> .....	4
1.3.1. Karakteristike .....	4
1.3.2. Prednosti 3D kultivacije .....	5
1.3.3. Stanična linija NCI-H358.....	6
<b>1.4. Energetska opskrba tumora</b> .....	6
1.4.1. Važnost ATP-a i LDH.....	7
1.4.2. Mitohondrijska aktivnost.....	8
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	9
<b>3. CILJEVI</b> .....	10
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	11
<b>4.1. Ustroj</b> .....	11
<b>4.2. Materijali</b> .....	11
4.2.1. Stanična linija .....	11
4.2.2. Kemikalije .....	11
4.2.3. Oprema .....	11
<b>4.3. Metode</b> .....	12
4.3.1. Kultivacija stanica <i>in vitro</i> .....	12
4.3.2. Određivanje broja živih stanica.....	12
4.3.3. Uzgoj sfera .....	13
4.3.4. Detekcija LDH .....	14
4.3.5. Određivanje mitohondrijskog potencijala .....	16
4.3.6. Određivanje ATP statusa.....	17
4.3.7. Statističke metode .....	18
<b>5. REZULTATI</b> .....	19
<b>5.1. Detekcija LDH</b> .....	19
<b>5.2. Određivanje mitohondrijskog potencijala</b> .....	21
<b>5.3. Određivanje ATP statusa</b> .....	22
<b>6. RASPRAVA</b> .....	23
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	26
<b>8. SAŽETAK</b> .....	27

<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>28</b>
<b>10. LITERATURA .....</b>	<b>29</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>33</b>

## POPIS KRATICA

ALK	kinaza anaplastičnog limfoma (engl. <i>anaplastic lymphoma kinase</i> )
ATP	adenozin trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i> )
BRAF	produkt B-raf protoonkogeno (engl. <i>B-raf proto-oncogene</i> )
CT	kompjutorizirana tomografija (engl. <i>computed tomography</i> )
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta (engl. <i>epidermal growth factor receptor</i> )
FBS	fetalni goveđi serum (engl. <i>fetal bovine serum</i> )
FCCP	karbonil cijanid 4-(trifluorometoksi) fenilhidrazol (engl. <i>trifluoromethoxy carbonylcyanide phenylhydrazone</i> )
HEPES	2-hidroksietilpiperazin-2-etan sulfonska kiselina (engl. <i>2-hydroxyethylpiperazine-2-ethane sulfonic acid</i> )
INT	jodonitrotetrazol klorid (engl. <i>iodonitrotetrazolium chloride</i> )
KOPB	kronična opstruktivna plućna bolest
KRAS	produkt homologa onkogeno Kirstenova virusa sarkoma (engl. <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i> )
LDH	laktat dehidrogenaza
M	mol / dm <sup>3</sup>
mtDNK	mitohondrijska deoksiribonukleinska kiselina
NCI	Nacionalni institut za rak (engl. <i>National Cancer Institute</i> )
NSCLC	karcinom pluća nemalih stanica (engl. <i>non- small cell lung carcinoma</i> )
ROS	reaktivne vrste kisika (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
RTG	uređaj za rendgensko snimanje
RPMI	Memorijalni institut Roswell Park (engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
SCLC	karcinom pluća malih stanica (engl. <i>small cell lung carcinoma</i> )
SP-A	površinski protein A (engl. <i>surfactant protein A</i> )
TMRE	tetrametilrodamin etil ester (engl. <i>tetramethylrhodamine ethyl ester</i> )
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i> )



# 1. UVOD

## 1.1. Karcinom pluća

Karcinom pluća je maligni tumor pluća epitelnog podrijetla. Histološki razlikujemo karcinome pluća malih stanica (engl. *small cell lung carcinoma*, SCLC) i karcinome pluća nemalih stanica (engl. *non-small cell lung carcinoma*, NSCLC) (1). Karcinom nemalih stanica javlja se u 80 – 90 % slučajeva i slabije je kemo- i radiosenzibilan u odnosu na SCLC (2). TNM klasifikacijom određuje se klinički stadij nemikrocelularnog karcinoma s obzirom na veličinu i širenje u okolno tkivo (T), širenje u limfne čvorove (N) i metastaze (M) (3). Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) objavila je 2021. godine nadopunu Klasifikacije tumora pluća iz 2015. te stavila naglasak na prednosti molekularne dijagnostike svih tipova tumora. Prema Klasifikaciji, tri su glavna podtipa karcinoma nemalih stanica: karcinom pločastih stanica, adenokarcinom i karcinom velikih stanica (4, 5). Na globalnoj razini se opaža porast dominacije adenokarcinoma nad ostalim podtipovima NSCLC-a u oba spola (2).

U etiologiji bolesti i dalje postoje nepoznanice, no sa sigurnošću se zna da na razvoj karcinoma pluća utječu brojni čimbenici. Faktori rizika uključuju pušenje duhanskih proizvoda, izloženost azbestu i drugim kancerogenima pluća, kroničnu opstruktivnu bolest pluća (KOPB), muški spol, stariju dob, genetsku predispoziciju i pozitivnu obiteljsku anamnezu te zagađenje zraka. Pušenje je najvažniji faktor rizika, a u prilog tome ide činjenica da je relativni rizik mortaliteta 15 puta veći u pušača nego u nepušača. Unatoč tome, 10 – 15 % oboljelih pripada skupini nepušača. Nadalje, bilježi se porast rizika od oboljenja za 20 – 25 % kod pasivnih pušača. Genetska predispozicija ima veliku ulogu, naime, u pacijenata bivših pušača ili pušača otkrivene su mutacije gena KRAS (engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) i BRAF (engl. *B-raf proto-oncogene*), a kod nepušača EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) i ALK (engl. *anaplastic lymphoma kinase*) mutacije. Pored toga, izloženost azbestu, teškim metalima, radonu i policikličkim aromatskim ugljikovodicima izravno se povezuje s razvojem karcinoma pluća. U zapadnoeuropskim zemljama 13 % karcinoma pluća pripisuje se profesionalnoj izloženosti (1, 6).

Kliničke manifestacije bolesti ovise morfoloiji, veličini i lokalizaciji primarnog tumora, stvaranju metastaza, općem stanju pacijenta itd. S obzirom na to, javljaju se brojni opći i nespecifični simptomi koji nisu karakteristični za karcinom pluća pa se bolesnici s karcinomom pluća često javljaju liječniku u već uznapredovalom stadiju. S druge strane, simptomi koji

pobuđuju sumnju su: kašalj koji dugo traje, hemoptiza, zaduha, stalne ili recidivirajuće infekcije istog lokaliteta, umor, bol u prsištu, gubitak apetita i gubitak na težini.

Dijagnostika započinje kliničkim pregledom i radiološkim metodama (RTG, CT), dok potvrdnu i diferencijalnu dijagnozu daje citološki ili patohistološki laboratorij na temelju uzorka uzetom prilikom bronhoskopije (6, 7).

U liječenju je, ukoliko je primjenjiv, kirurški zahvat metoda izbora. Kao druge opcije liječenja primjenjuju se kemoterapija, radioterapija i ciljana terapija tzv. pametnim lijekovima (7). U novije vrijeme razvijaju se različiti tipovi imunoterapije čime se nastoji direktno utjecati na inhibiciju rasta tumora i stimulaciju protutumorskog imunološkog odgovora (8). Razvoj tehnologije i molekularne dijagnostike omogućio je detekciju mutacija odgovornih za karcinom pluća čime se omogućuje odabir ciljane terapije i naposljetku osigurava bolji ishod za pacijenta (9).

Unatoč preciznoj patohistološkoj analizi, napretku molekularne dijagnostike te razvoju imunoterapije, karcinom pluća vodeći je uzrok smrti u svijetu (10). Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, karcinom pluća je vodeći uzrok smrti od malignih bolesti te drugi najčešći novodijagnosticirani rak u Hrvatskoj 2020. godine (11). Zbog velike zabrinutosti za zdravlje svjetskog stanovništva, istraživanja mehanizama karcinogeneze, tkivnog odgovora i staničnih interakcija su imperativ.

## 1.2. Trodimenzionalna kultura stanica

Tradicionalno dvodimenzionalno (2D) kultiviranje stanica u monosloju pokazalo se kao korisna metoda u istraživanjima stanica. Uzimajući u obzir da su gotovo sve stanice *in vivo* okružene drugim stanicama i izvanstaničnim matriksom u trodimenzionalnom (3D) rasporedu, 2D stanične kulture ne oponašaju stvarno 3D okruženje stanica. Stanice se razlikuju fiziološki i morfološki te se u 3D kulturi uspostavlja drugačija prostorna organizacija. Dolazi do reorganizacije površinskih staničnih receptora koji dolaze u interakciju sa susjednim stanicama što utječe na stanično ponašanje, međustaničnu signalizaciju i gensku ekspresiju. Stoga se kultivacijom u monosloju mogu dobiti podatci koji ne odgovaraju stvarnom stanju staničnog funkcioniranja *in vivo*. Uspostavom 3D sustava *in vitro* postižu se rezultati koji su vjerodostojni odraz stanja *in vivo* pa takva kultura pruža fiziološki relevantne informacije i omogućava bolje predviđanje rezultata testiranja *in vivo*. Zbog toga predstavljaju dobre modele za istraživanje

lijekova i mehanizama bolesti, proučavanje tumorskog mikrookoliša, genske i proteinske ekspresije (12).

Ovisno o ciljevima istraživanja razlikujemo osnovne tipove trodimenzionalne kulture stanica: histotipska kultura, organotipska kultura i kultura organa. Kulturom organa nastoji se očuvati heterogena struktura i interakcija među različitim vrstama stanica kako bi se moglo proučavati ponašanje integriranih tkiva. Cijeli organ ili njegovi reprezentativni dijelovi se održavaju kao mali fragmenti u kulturi. Odsutnost krvožilnog sustava direktno limitira veličinu organa i dovodi do nepravilnog rasporeda stanica. Kultivacija organa zbog izostanka vaskularizacije zahtjeva smještaj tkiva na medij i potporu koji će omogućiti optimalnu izmjenu plinova i nutrijenata. Ima određena ograničenja, zahtjeva je za pripremu i održavanje, no predstavlja kvalitetan i neophodan pristup u istraživanjima na razini organa.

Organotipska kultura uključuje rekombinaciju različitih staničnih linija kako bi se stvorila komponenta organa. Promjenom prostornih odnosa postiže se određena razina međustanične interakcije koja se analizira s obzirom na vanjske podražaje (13). Obično se koriste dijelovi organa debljine 100- 400  $\mu\text{m}$  s dobro očuvanim tkivnim svojstvima, a kao mehanička potpora služi porozna membrana (14, 15).

Histotipska kultura označava staničnu kulturu visoke gustoće pri čemu je gustoća stanica gotovo identična onoj *in vivo*. Kako stanice dostižu sve veći stupanj gustoće, nutrijenti iz medija postaju limitirajući faktor. Omjer volumena medija i broja stanica treba ostati podjednak onom u kulturi niske gustoće stanica. To se može ostvariti primjenom tehnika gela i spužve, korištenjem perfuzijske komore sa šupljikavim vlaknima te formiranjem sferoida (13).

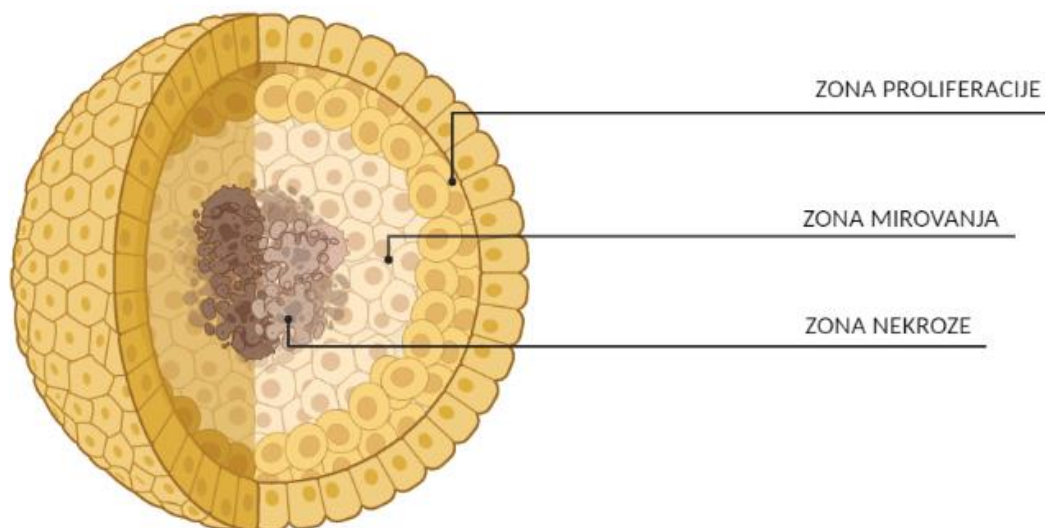
### 1.2.1. Sferoidi

Sferoidi predstavljaju okruglaste nakupine (agregate) stanica u 3D mikrookolišu čime se nadmašuju ograničenja kulture u monosloju. Dolazi do rekonstrukcije signalnih puteva, potiče se proliferacija i vijabilnost stanica. Formiranje sferoida može se postići nosačima s 3D matricama, bioreaktorima, centrifugiranjem, metodom viseće kapi, mikročipovima i magnetskim česticama (12, 16). Morfološki stanice mogu formirati okrugle, zvjezdaste sfere sfere nalik na masu, grozd i slično, ovisno o staničnoj liniji (12).

U mehanizam formiranja sferoida direktno su uključeni kadherini i integrini koji pospješuju adheziju stanica. Sve započinje od nakupine slabo povezanih stanica gdje se integrini komplementarno vežu za staničnu površinu. Adhezija se osnažuje pomoću kadherina pri čemu

aktin i kompleks  $\beta$ -katenina olakšavaju prijenos signala i kontakt među stanicama što rezultira stvaranjem sferoida sadržanog od snažno povezanih stanica (16).

Kao i u kulturi organa, veći sferoidi nailaze na ograničenja zbog izostanka vaskularizacije, dok za one manje to ne predstavlja problem. Medij prodire u unutrašnjost sferoida putem difuzije. Gradijent difuzije induciran je povećanjem veličine sferoida tijekom kultivacije: što je veći, medij teže dopiyeva do središta sfere. Naposljetku, oksigenacija, uklanjanje CO<sub>2</sub> i distribucija hranjivih tvari odvijaju se putem difuzije što utječe na proliferaciju stanica. Shodno tomu, stanice se na različitim dubinama sfere razlikuju u nutritivnom statusu, a posljedično i u stadiju staničnog ciklusa. Naime, vanjski sloj stanica je najizloženiji mediju i sadži vijabilne, proliferirajuće stanice. Stanice dublje u sferoidu nisu u direktnom kontaktu s medijem, kisik i hranjive tvari teže difuzijom dopiru do njih, a metaboliti se teže uklanjaju pa su one uglavnom u fazi mirovanja ili hipoksije. Centralni dio sfere sadži nekrotične stanice (12) (Slika 1).



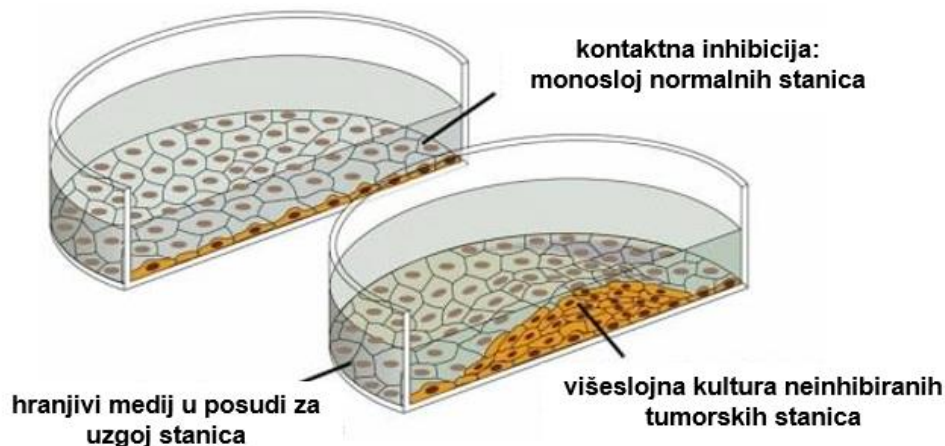
*Slika 1. Građa sferoida. Izvor: izradila autorica rada.*

### 1.3. Kultura tumorskih stanica

#### 1.3.1. Karakteristike

Tumorsko tkivo je morfološki uglavnom heterogeno i sadržano od stanica različitih fenotipova. Za razliku od normalnih stanica, zbog svoje autonomije tumorske stanice stvaraju sebi pogodne uvjete rasta (17). Karakterizira ih sposobnost angiogeneze te rast u uvjetima hipoksije i acidoze koji doprinose mutagenezi. Promijenjena ekspresija gena potiče stanični

rast, invazivnost i metastaziranje. Progresijom tumora, stanice pokazuju sve veću gensku nestabilnost. Smatra se da je mutageneza posljedica kompenzacije metaboličke i energetske neravnoteže tumora (18, 19). Osnovno obilježje kulture tumorskih stanica je stvaranje kontinuirane stanične linije, točnije neprestan rast i nakon stvaranja konfluentnog sloja stanica u primarnoj kulturi (Slika 2).



**Slika 2.** Usporedba rasta normalnih stanica do kontaktne inhibicije s prerastom tumorskih stanica (20).

Tumorske stanice pokazuju odstupanja u kontroli rasta zbog čega su sklone ubrzanom rastu i stvaranju kulture visoke gustoće. Zbog svojstvene varijabilnosti i heterogenosti zahtijevaju medij obogaćen tvarima koje omogućuju selektivan rast. Primjer selektivnog medija je RPMI 1640 na temelju kojeg je Nacionalni institut za rak proizveo selektivan medij za adenokarcinom. Medij je obogaćen određenim suplementima te je prigodan, između ostalih, i za karcinom pluća.

### 1.3.2. Prednosti 3D kultivacije

Tumori nisu dvodimenzionalni, već stvaraju svoj vlastiti mikrookoliš i ulaze u interakcije s tkivima kojima su okruženi. Upravo zbog toga često ih je teško uzgojiti *in vitro*, a da se postigne model identičan tumoru *in vivo* (13). 2D kulturom ne može se predočiti autentična međustanična komunikacija niti formiranje tumor specifične arhitekture. Trodimenzionalnom kultivacijom, posebice tehnikom stvaranja sferoida omogućuje se replikacija stvarne arhitekture tumora gdje se razlikuju vanjska proliferacijska zona, unutrašnja mirna zona s manjom količinom kisika te nekrotično i hipoksično središte (21). Sferoide je relativno jednostavno uzgojiti i održavati, ovisno o staničnoj liniji. Moguće ih je prilagoditi i daju reproducibilne rezultate (17). Nadalje, kulture neoplastičnih stanica predstavljaju vrijedan izvor

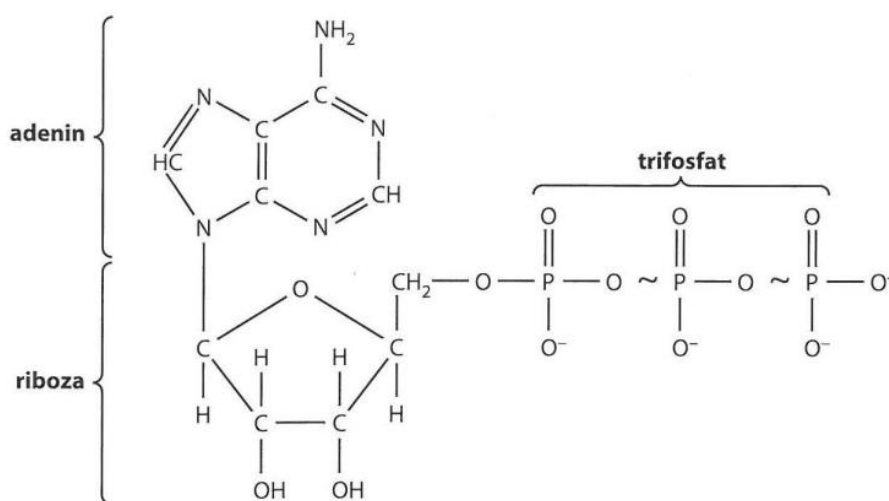
stanica za molekularna i farmakološka istraživanja gdje su 3D modeli pogodniji za ispitivanja lijekova uzimajući u obzir interakcije tumora i strome, zasićenost kisikom i pH gradijent. Dodatne prednosti nad kulturom u monosloju su bolja genska i proteinska ekspresija koje pridonose identifikaciji novih biomarkera bolesti (21).

### 1.3.3. Stanična linija NCI-H358

Nacionalni institut za rak je prikupio brojne stanične linije te su one komercijalno dostupne u istraživačke svrhe (13). Stanična linija NCI-H358 predstavlja epitelu slične stanice izolirane iz bronhiola muškog pacijenta s bronhoalveolarnim karcinomom (podvrsta adenokarcinoma, NSCLC). Linija je prikupljena 1981. godine prije primjene kemoterapije. Pokazuje svojstva adherentnog rasta i metastaziranja u alveole. Proučavanjem stanične linije primjećena je prisutnost citoplazmatskih struktura karakterističnih za Clara stanice. Također, izražena je ekspresija surfaktantog proteina A (SP-A) koji ima važnu ulogu u imunološkom odgovoru, a luče ga alveolarne stanice tipa II (22, 23). NCI-H358 namijenjena je formiranju 3D stanične kulture i istraživanjima raka (22).

## 1.4. Energetska opskrba tumora

Normalne stanice koriste ugljikohidrate, proteine i masti kao izvore energije za svoje funkcije. Energija u obliku adenzin trifosfata (ATP) stvara se procesima razgradnje navedenih spojeva kroz glikolizu, ciklus limunske kiseline, beta-oksidaciju te hidrolizu. ATP je nukleotid građen od dušične baze adenina, šećera riboze i tri fosfatne skupine vezane visokoenergijskim vezama (Slika 3).



**Slika 3.** Građa adenzin trifosfata. Visokoenergijske veze označene su znakom ~ (24).

Iskorištava se za mnoge energetske ovisne stanične aktivnosti: sintezu biološki važnih spojeva, mišićnu kontrakciju, pokretanje cilija i ameboidno gibanje stanica, rad žlijezda, prijenos elektrolita i nutrijenata kroz staničnu membranu i živčanu provodljivost (24). Pored toga, važan je u signalizaciji metaboličkih reakcija i sudjeluje kao donor fosfatne ili adenilne skupine u posttranslacijskim modifikacijama proteina. Zbog iznimne važnosti u brojnim biološkim funkcijama, njegova dinamika snažno utječe na intracelularne i ekstracelularne procese koji definiraju normalnu fiziologiju, ali i patološka stanja (25).

#### 1.4.1. Važnost ATP-a i LDH

Tumorske stanice zahtijevaju više energije pa stoga preživljavanje tumora izravno ovisi o proizvodnji ATP-a kako bi se zadovoljili svi bioenergetski zahtjevi. Unatoč genetskoj, biokemijskoj i morfološkoj heterogenosti, za opskrbu ATP-om svi tumori ovise o glikolizi i oksidativnoj fosforilaciji (19). U tumorima dolazi do pomaka u metabolizmu glukoze, fenomen poznat kao Warburgov efekt ili aerobna glikoliza, gdje se piruvat pretvara u laktat pomoću laktat dehidrogenaze (LDH). Tumorske stanice u normalnim uvjetima pretvaraju 60 – 80 % piruvata u laktat, u hipoksiji je to 90 %. Laktat iz stanice izlazi u obliku laktične kiseline te dovodi do acidifikacije tumorskog mikrookoliša. Uz to, hipoksija i manjak nutrijenata rezultiraju nekrozom tumora koja može biti i posljedica brzog rasta tumora. Nekroza je češća u većim tumorima te korelira s većom aktivnošću LDH i lošijom prognozom. Zaključno, povišena razina LDH u onkoloških pacijenata rezultat je povećane glikolitičke aktivnosti i tumorske nekroze uzrokovane hipoksijom (26). Rast u hipoksičnom i acidičnom mikrookolišu pogoduje kemorezistenciji, dok istovremeno prisiljava na povećanje glikolize kao kompenzacija za oslabljenu oksidativnu fosforilaciju (27).

Poznato je da ATP utječe na rast tumora kao i na interakciju tumora i domaćina na više načina. Izvanstanični ATP otpušten iz nekrotičkih stanica predstavlja signal za upalu pri čemu se stvara proupalni mikrookoliš koji privlači i aktivira imunosne stanice. S druge strane, svojom razgradnjom ATP postiže imunosupresivni učinak (28). Nadalje, onkogeni signalni putevi doprinose metaboličkim i energetske procesima podupirući povećanu biosintezu i staničnu proliferaciju. Zaključno, ATP je kao energetska valuta stanice nezamjenjiv za opstanak, rast i ekspanziju tumora zbog čega je okosnica brojnih istraživanja (19).

#### 1.4.2. Mitohondrijska aktivnost

Neke tumorske stanične linije pokazuju smanjenu količinu mitohondrija u stanici ili smanjenu mitohondrijsku funkciju (26). Dodatno, stanice raka stvaraju reaktivne vrste kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) što dovodi do povećanog broja mutacija mitohondrijske DNK (mtDNK) koje se povezuju s onkogenom transformacijom i tumorskom progresijom. Mutacije mitohondrijskog genoma tiču se, između ostalog, gena koji utječu na transportni lanac elektrona što dovodi do povećanja mitohondrijskog membranskog potencijala ( $\Delta\Psi_m$ ) (29).

Stvaranje i održavanje  $\Delta\Psi_m$  u stanicama raka ovisi o nekoliko faktora: ulasku respiratornih supstrata (piruvat, acetil-CoA, aminokiseline) u mitohondrij, aktivnosti transportnog lanca elektrona, potrebama za ATP-om i ravnoteži mitohondrijske sinteze ATP-a i glikolize. Dokazano je da stupanj proliferacije, dostupnost nutrijenata i metaboličko reprogramiranje utječu na heterogenost tumora, no pokazalo se da doprinose i heterogenosti mitohondrijskog membranskog potencijala u tumorskim stanicama. (30).



## **2. HIPOTEZA**

Reducirana dostupnost hranjivih tvari iz medija i rast sfera karcinoma pluća dovode do smanjenja energetskeg statusa.

### 3. CILJEVI

Ciljevi istraživanja:

1. Odrediti energetske status staničnih sferoida formiranih od stanica karcinoma pluća *in vitro*.
2. Usporediti rezultate sfera kultiviranih u istom vremenskom periodu te one uzgajane 8 dana s onima uzgajanih 13 dana.
3. Definirati povezanost veličine sferoida te dostupnosti hranjivog medija s energetske statusom.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ustroj

Ovo istraživanje je dizajnirano kao *in vitro* studija - kontrolirani pokus. U pokusu su korištene komercijalno dostupne stanice. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku Medicinskog fakulteta Osijek (KLASA: 602-04/22-08/02; URBROJ: 2158-61-46-22-152).

### 4.2. Materijali

#### 4.2.1. Stanična linija

Energetski status analiziran je na sferoidima formiranim od humanih stanica bronhoalveolarnog karcinoma pluća NCI-H358 (ATCC® CRL-5807™).

#### 4.2.2. Kemikalije

- RPMI medij s 10 % FBS-om, 2 mM glutaminom, 1 mM natrijevim piruvatom, 10 mM HEPES-om (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- 0,25 % tripsin-EDTA (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka)
- FBS (GIBCO Invitrogen; Paisley, Velika Britanija)
- Glutamin (GIBCO Invitrogen; Paisley, Velika Britanija)
- Eritrozin B (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, SAD)
- Kit za detekciju LDH (LDH Cytotoxicity Detection Kit, TAKARA BIO INC., Shiga, Japan)
- Kit za određivanje mitohondrijskog potencijala (TMRE Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit, Abcam, Cambridge, UK)
- Kit za određivanje ATP statusa (ATP Assay Kit, Abcam, Cambridge, UK)

#### 4.2.3. Oprema

- CO<sub>2</sub> inkubator (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Invertni mikroskop (Zeiss Axiovert 25, Jena, Njemačka)
- Mikrotitarske ploče od 96 jažica s V-dnom (BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Njemačka)
- Centrifuga (Centrifuge 5804 R, Eppendorf SE, Hamburg, Njemačka)

- Čitač apsorbancije mikroploča (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, SAD)
- Čitač fluorescencije mikroploča (Spark, Tecan Trading AG, Männedorf, Švicarska)

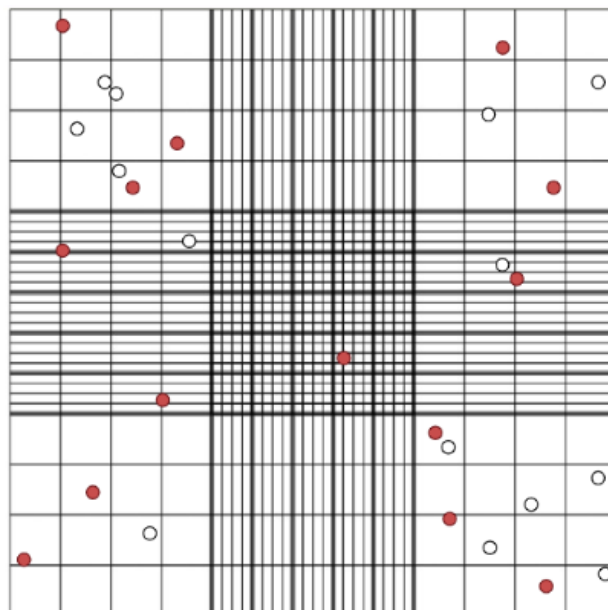
### 4.3. Metode

#### 4.3.1. Kultivacija stanica *in vitro*

NCI-H358 stanična linija uzgajana je u bočicama za kultivaciju u RPMI mediju obogaćenom s 10 % FBS-om, 2 mM glutaminom, 1 mM natrijevim piruvatom i 10 mM HEPES-om. Stanice se inkubiraju u CO<sub>2</sub> inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific) pri 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> uz visoku vlažnost.

#### 4.3.2. Određivanje broja živih stanica

Kako bismo prebrojili stanice, s obzirom da su adherirane na dno bočice, potrebno je ukloniti medij te inkubirati stanice šest minuta s tripsinom. Nakon tripsinizacije, stanice se resuspendiraju u svježem mediju za uzgoj. Vijabilnost i broj stanica određeni su bojanjem eritrozinom B. U 50 µL stanične suspenzije dodaje se 100 µL eritrozina B te se resuspendirani sadržaj nanosi na Bürker-Türkovu komoricu i broji pod mikroskopom. Žive stanice imaju održan sustav izbacivanja boje pa ostaju prozirne, dok se one mrtve obojaju crveno (Slika 4).



**Slika 4.** Brojanje stanica u Bürker-Türkovoj komorici uz dodatak eritrozina B. Stanice se broje u četiri vanjska kvadrata te na gornjem i desnom bridu. Žive stanice su neobojane.

Izvor: izradila autorica rada.

## 4.3.3. Uzgoj sfera

Na temelju prebrojanih stanica, potrebno je prema formuli odrediti koncentraciju stanica po mL stanične suspenzije kako bismo izračunali volumen medija i stanične suspenzije potrebnih za postizanje željene koncentracije za kultivaciju.

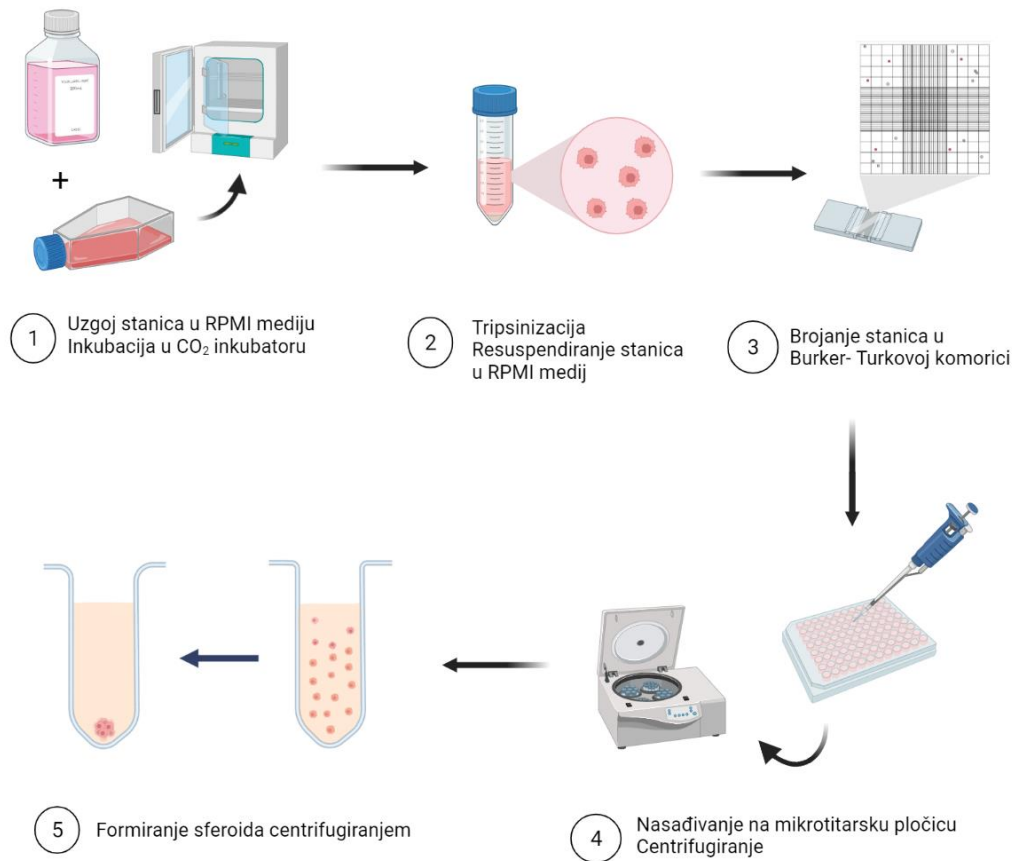
$$\frac{\text{broj izbrojenih stanica} \times 3}{4} = X \times 10^4 \text{ stanica/mL}$$

Pri čemu je:

3 - faktor razrjeđenja

4 - broj izbrojanih kvadrata u komorici

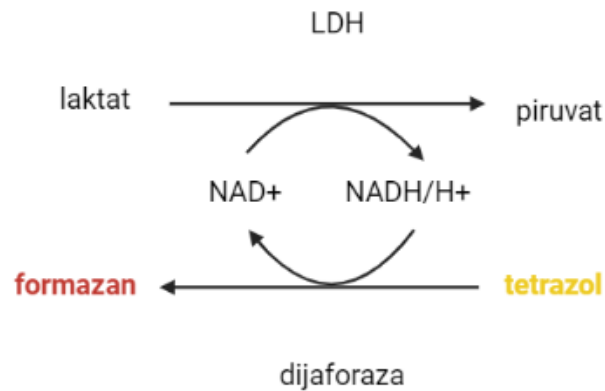
Nakon toga, stanice su nasađene na mikrotitarske ploče s V-dnom u koncentraciji  $1 \times 10^4$  stanica/mL u volumenu od 200  $\mu$ L. Ploče su centrifugirane na 1100 rpm/10 min/RT nakon čega su stavljene u inkubator na 37°C i 5 % CO<sub>2</sub> radi formiranja sferoida. Sažeti prikaz pripreme i uzgoja sferoida prikazan je shematski (Slika 5). Sfere su uzgajane u dva vremena: 8 i 13 dana te je jednom setu sfera mijenjan medij svakih nekoliko dana, dok je drugom setu uzgoj bio bez izmjene medija. Kako bismo izmijenili medij, potrebno je u svaku jažicu ulaziti polako uz rub prema dnu i aspirirati medij pazeći da se ne povuku i sfere. Stari medij se odbacuje, a u jažice se unosi po 200  $\mu$ L svježeg medija. Po završetku uzgoja, sfere su prikupljene za analizu laktat dehidrogenaze, zastupljenosti ATP-a i promjenu mitohondrijskog potencijala.



**Slika 5.** Sažeti shematski prikaz pripreme i formiranja sferoida. Izvor: izradila autorica rada.

#### 4.3.4. Detekcija LDH

Aktivnost laktat dehidrogenate (LDH) mjerena je u staničnom supernatantu gdje on predstavlja medij prikupljen sa sfera. Analiza je izvedena na tri skupine od 32 sfere za svako vremensko razdoblje i uvjete uzgoja pomoću kita prema uputama proizvođača (LDH Cytotoxicity Detection Kit, TAKARA BIO INC.). Kit omogućuje kolorimetrijsko mjerenje stanične citotoksičnosti/citolize na temelju aktivnosti LDH. Točnije, povećan broj mrtvih stanica ili stanica oštećene membrane rezultira povećanom ukupnom enzimskom aktivnošću u supernatantu. U reakciji koju katalizira dijaforaza dolazi do redukcije žutog tetrazola u crveni formazan (Slika 6) čija se apsorbancija mjeri spektrometrijski. Izmjerena apsorbancija je proporcionalna aktivnosti LDH (31).



*Slika 6. Princip mjerenja LDH uz naglasak na redukciju tetrazola u formazan uz promjenu boje (31).*

Prema uputama, miješanjem otopine A (katalizator dijaforaza / NAD<sup>+</sup>) i otopine B (INT boja) pripremljena je otopina C. Na dan mjerenja 100  $\mu$ L supernatanta preneseno je na mikrotitarsku ploču s 96 jažica s ravnim dnom gdje je dodano 100  $\mu$ L otopine C. Slijedi inkubacija u CO<sub>2</sub> inkubatoru u trajanju od 4 sata. Po završetku inkubacije očitana je apsorbancija na valnoj duljini od 515 nm na čitaču apsorbancije mikroploča (iMark, BIO RAD).

Zastupljenost LDH izračunata je prema formuli:

$$\% \text{ otpuštenog LDH u mediju} = \frac{A_{\text{stanični supernatant}} - A_{\text{niska kontrola}}}{A_{\text{visoka kontrola}} - A_{\text{niska kontrola}}} \times 100$$

Pri čemu je:

visoka kontrola - medij sa sferama koje su tretirane s 1 % Triton X

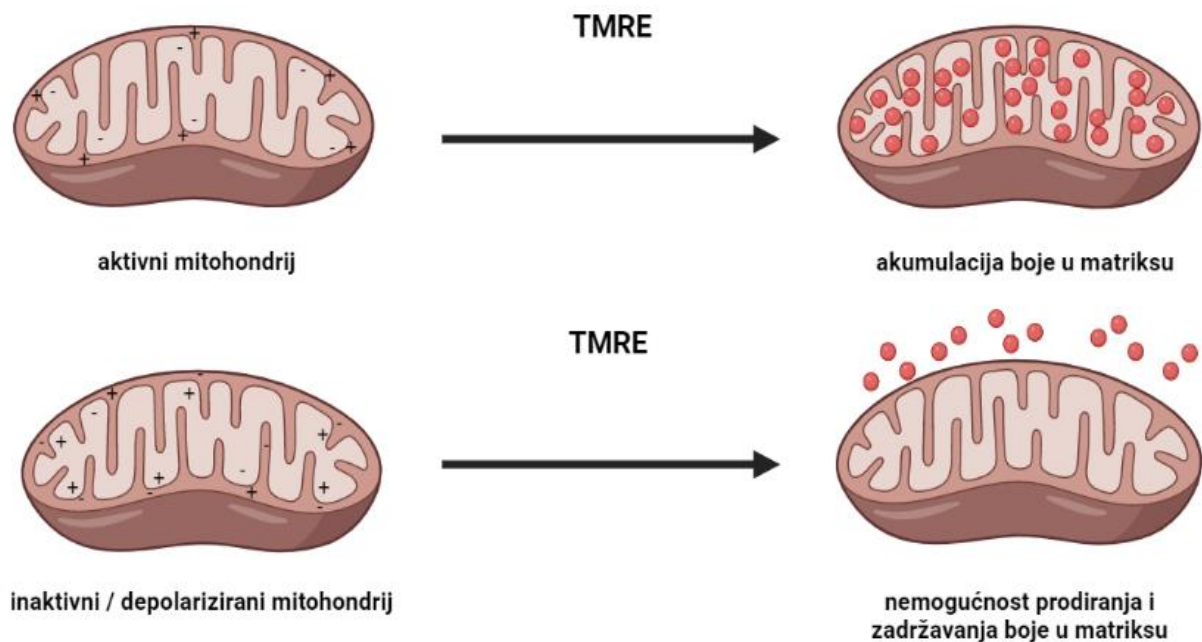
niska kontrola - svježi medij

Reagens Triton X razara stanice i tako potpomaže dostizanje maksimalne aktivnosti LDH (31).

#### 4.3.5. Određivanje mitohondrijskog potencijala

Prikupljene su sfere iz 28 jažica koje su inkubirane u različitim vremenskim intervalima s izmjenom i bez izmjene medija. Mjerenje mitohondrijskog potencijala temelji se na dodavanju TMRE boje. Sfere su prvo isprane PBS-om te inkubirane s tripsinom tri minute kako bi se razdvojile na pojedinačne stanice. Tripsin je inaktiviran svježim medijem te nakon centrifugiranja uklonjen sa stanica. U jažice sa stanicama iz sfera dodaje se TMRE boja (TMRE Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit, Abcam) u koncentraciji od 200 nM te se inkubira kroz 30 min u CO<sub>2</sub> inkubatoru. Važno je ploču s nanesenom bojom inkubirati u mraku tj. zaštititi boju od direktne svjetlosti kako bismo spriječili lažno snižene rezultate uzrokovane degradacijom boje. Po završetku inkubacije, medij se odbacuje, a stanice se resuspendiraju 3 do 4 puta u PBS-u u volumenu od 100 µL po jažici kako bi se isprala nevezana boja. Intenzitet fluorescencije izmjeren je na čitaču mikroploča (Spark, Tecan) pri Ex/Em = 530/580.

TMRE boja sadrži pozitivno nabijen spoj koji se akumulira u aktivnim mitohondrijima koji su negativno nabijeni zbog stvaranja membranskog potencijala. S druge strane, oni inaktivni/depolarizirani imaju smanjen membranski potencijal pa su stoga nepropusni za TMRE boju (32). Dakle, količina fluorescence proporcionalna je mitohondrijskoj aktivnosti i membranskom potencijalu (Slika 7).



*Slika 7. Princip vezanja TMRE boje. Izvor: izradila autorica rada.*



## 4.3.6. Određivanje ATP statusa

Analiza ATP statusa u sferoidima je provedena kolorimetrijskom metodom prema uputama proizvođača ATP Assay Kit (Abcam). Princip mjerenja zasniva se na fosforilaciji glicerola pri čemu nastaje kolorimetrijski mjerljiv produkt.

Sfere su prikupljene iz 32 jažice i grupirane metodom koncentriranja tzv. „pooliranjem“ posebno za svako vremensko razdoblje i uvjete kultivacije. Sferama je dodan ATP pufer za lizu stanica te je supernatant nakon centrifugiranja 6 min/1500 rpm/4 °C pokupljen u novu tubicu za svaku sferu. Radi uklanjanja enzima koji interferiraju s mjerenim analitom nužno je provesti deproteinizaciju (33). Uzorak je deproteiniziran perklornom kiselinom u konačnoj koncentraciji od 1 M te neutraliziran kalijevim hidroksidom koncentracije 2 M u volumenu od 30 % ukupnog volumena supernatanta. Nakon centrifugiranja supernatant je prenesen u novu tubicu i pripremljen za analizu na ploči od 96 jažica. Također, u nekoliko jažica stavljen je ATP standard u koncentracijama 0 – 10 nmol po jažici na temelju čega je izrađen ATP standardni pravac. Na standarde i uzorke je dodano po 50 µL reakcijskog miksa koji se sastoji od 44 µL ATP pufera, 2 µL ATP probe, 2 µL ATP pretvarača i 2 µL razvijaača boje. Na isti način pripremljena je pozadinska reakcija, no bez ATP pretvarača. Slijedi inkubacija 30 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi te mjerenje absorbance na čitaču mikroploča (iMark, BIO RAD) na 515 nm.

ATP koncentracija izračunata je prema formuli:

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

Pri čemu je:

B - količina ATP-a u uzorku prema standardnoj krivulji

V - volumen uzorka (µL)

D - faktor razrjeđenja

DDF - deproteinizacijski faktor razrjeđenja (izračunat prema uputama proizvođača)

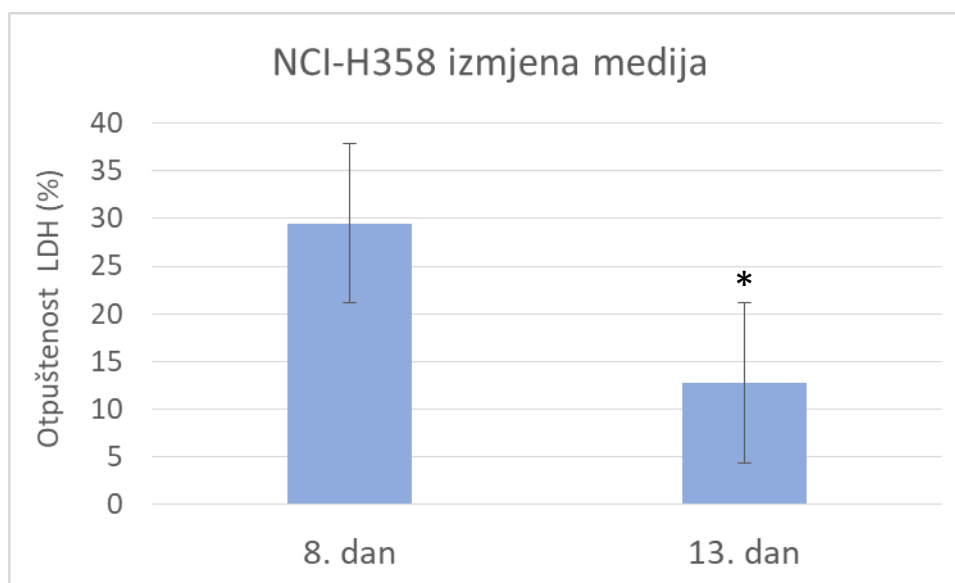
#### 4.3.7. Statističke metode

Statistička analiza podataka napravljena je pomoću programa Microsoft Excel i statističkog programa MedCalc Statistical Software verzija 20.112 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2022). Numerički podaci su prikazani kao srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD). Testiranje hipoteze usporedbom dvije skupine nezavisnih podataka učinjeno je neparametrijskim Mann – Whitney testom. Normalnost razdiobe dobivenih podataka ispitana je Kolmogorov – Smirnova testom. Varijacija podataka analizirana je korištenjem ANOVA testa uz statističku značajnost  $P < 0,05$ . Usporedba više skupina podataka napravljena je post-hoc Scheffe metodom, studentovim Newman – Keuls i Tukey – Kramer testovima uz  $P < 0,05$ .

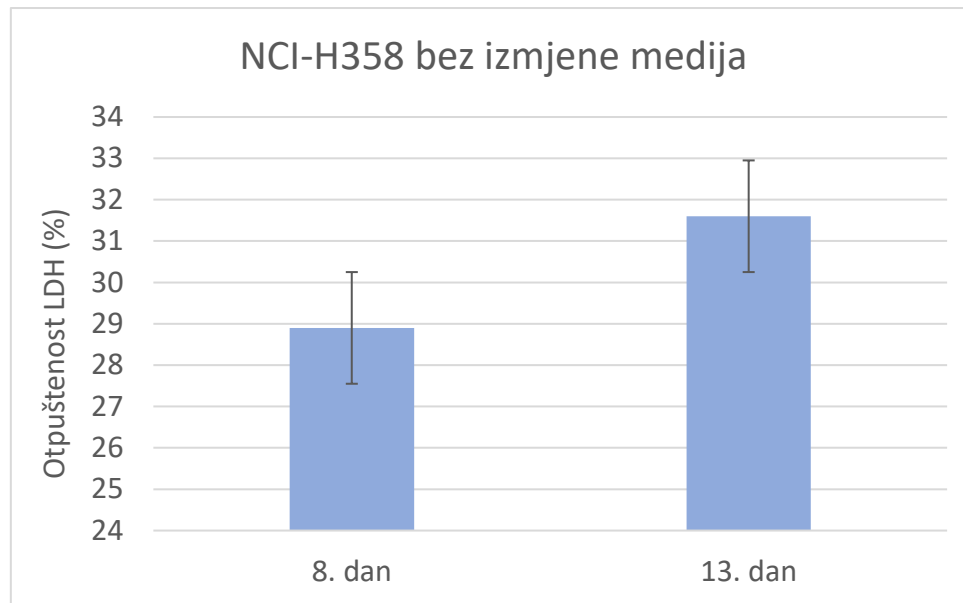
## 5. REZULTATI

### 5.1. Detekcija LDH

Aktivnost laktat dehidrogenaze mjerena je spektrometrijski, a konačan rezultat izražen je u obliku postotka (%). Srednje vrijednosti rezultata sfera uzgajanih u istim uvjetima dostupnosti medija uspoređene su grafički (Slika 8, Slika 9).



*Slika 8. Mjerenje aktivnosti LDH u mediju prikupljenog sa sferoida (supernatantu) formiranih od stanične linije NCI-H358. Sferoidi su se uzgajali u dva vremenska perioda: 8 i 13 dana u uvjetima s izmjenom medija svakih nekoliko dana. Srednja vrijednost LDH kod sfera uzgajanih 8 dana iznosi 29,5 %, dok u sfera uzgajanih 13 dana iznosi 12,7 %. Okomite linije s graničnikom prikazuju raspon standardne pogreške. Statistički značajno niže vrijednosti izmjerene su kod sfera uzgajanih 13 dana i označene zvjezdicom (\*).*

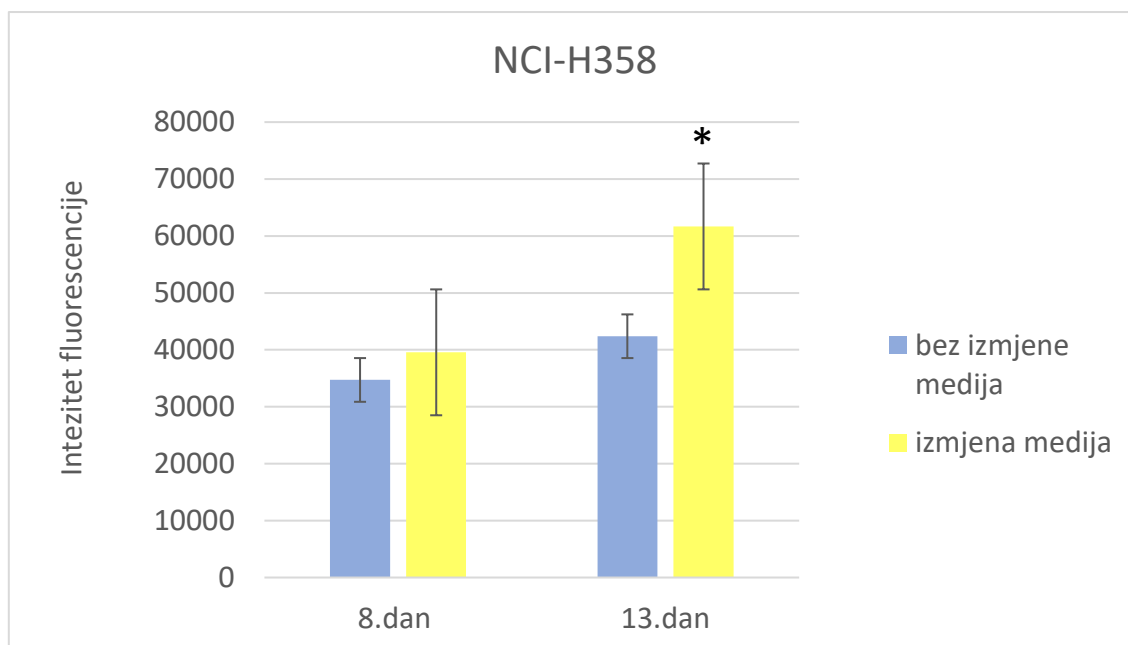


**Slika 9.** Mjerenje aktivnosti LDH u mediju prikupljenog sa sferoida (supernatantu) formiranih od stanične linije NCI-H358. Sferoidi su se uzgajali u dva vremenska perioda: 8 i 13 dana bez izmjene medija. Srednja vrijednost LDH kod sfera uzgajanih 8 dana iznosi 28,9 %, dok u sfera uzgajanih 13 dana iznosi 31,6 %. Okomite linije s graničnikom prikazuju raspon standardne pogreške.

Srednja vrijednost LDH u sferoida uzgajanih bez izmjene medija iznosi 28,9 %, a onih s izmjenom medija 29,5 %. Najviša izmjerena prosječna aktivnost LDH je kod uzgoja bez izmjene medija kod kultivacije 13 dana te iznosi 31,6 %. Nasuprot tome, u istom vremenskom periodu uzgoja, no kod izmjene medija je izmjerena najniža aktivnost LDH. Ondje prosječna vrijednost iznosi tek 12,7 %. Gotovo podjednaki rezultati dobiveni su kod kultivacije bez izmjene medija, neovisno o trajanju kultivacije. Dvostruko niža aktivnost LDH zabilježena je kod sferoida uzgajanih s izmjenom medija 13 dana u odnosu na one uzgajane 8 dana u istim uvjetima. Prema statističkoj analizi *post hoc* testovima, sferoidi uzgajani 13 dana s izmjenom medija pokazuju statistički značajnu razliku ( $P < 0,05$ ) u izmjerenoj aktivnosti LDH u odnosu na sferoide uzgajane 13 dana bez izmjene medija i one uzgajane 8 dana u svim uvjetima kultivacije.

## 5.2. Određivanje mitohondrijskog potencijala

Membranski potencijal proporcionalan je intenzitetu fluorescencije. Usporedba srednjih vrijednosti fluorescencije, tj. mitohondrijskog membranskog potencijala prikazana je u grafičkom prikazu (Slika 10).



**Slika 10.** Mjerenje mitohondrijskog potencijala u sferoidima formiranih od stanične linije NCI-H358. Sferoidi su se uzgajali u dva vremenska perioda: 8 i 13 dana te u uvjetima bez (plavo) i s izmjenom medija (žuto) svakih nekoliko dana. Srednja vrijednost mitohondrijskog potencijala kod sfera uzgajanih 8 dana bez izmjene medija iznosi 34708, a u sfera uzgajanih 13 dana u istim uvjetima iznosi 42387. Kod sfera uzgajanih 8 dana s izmjenom medija mitohondrijski potencijal iznosi 39557,5, a u sfera uzgajanih 13 dana u istim uvjetima iznosi 61672,5. Okomite linije s graničnikom prikazuju raspon standardne pogreške. Statistički značajna razlika je uočena kod sferoida uzgajanih 13 dana s izmjenom medija u odnosu na sve ostale skupine uzoraka(\*).

Mitohondrijski potencijal kod sferoida uzgajanih bez izmjene medija kroz 8 dana je otprilike podjednak, a srednja vrijednost je 34708. To je ujedno i najmanja prosječna vrijednost membranskog potencijala koja je izmjerena u sve četiri skupine uzoraka. U sferoida uzgajanih u tom vremenskom periodu uz izmjenu medija izmjerena je veća aktivnost mitohondrija, ali također podjednaka te prosječno iznosi 39557,5. Gledajući sferoide kultivirane 13 dana, možemo primijetiti poveću razliku između dva mjerenja kada je riječ o kultivaciji bez izmjene

medija, a srednja vrijednost mjerenja je 42387. Suprotno tome, sferoidi kojima smo mijenjali medij pokazuju podjednaku mitohondrijsku aktivnost uz prosječnu vrijednost od 61672,5 zbog čega se ovoj skupini može pridodati karakteristika najveće mitohondrijske aktivnosti. Uspoređujući mitohondrijski potencijal u sferoidima kojima nismo mijenjali medij, primjećujemo veće vrijednosti kod sfera uzgajanih 13 dana u odnosu na one uzgajane 8 dana. Nadalje, statistički značajna razlika uočena je *post hoc* testovima među sferoidima uzgajanih s izmjenom medija pri čemu je potencijal značajno veći kod sfera kultiviranih 13 dana. Nastavno na to, sferoidi kultivirani 13 dana uz izmjenu medija pokazuju statistički značajnu razliku u membranskom potencijalu u odnosu na sfere uzgajane bez izmjene medija u oba vremenska razdoblja (Slika 10).

### 5.3. Određivanje ATP statusa

Izračunata koncentracija ATP-a izražena je u nmol/ $\mu$ L, a rezultati su tablično prikazani (Tablica 1).

**Tablica 1.** Prikaz rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije adenozin trifosfata.

	Kultivacija 8 dana	Kultivacija 13 dana
<b>Bez izmjene medija</b>	0,015	0,083
<b>Izmjena medija</b>	0,081	0,029

Izmjerena koncentracija ATP-a za sferoide uzgajane 8 dana veća je u onih uzgajanih uz izmjenu medija, dok je za sferoide uzgajane 13 dana veća u onih kojima nije mijenjan medij. Unatoč malom broju mjerenja i tome što su sve izmjerene koncentracije izrazito niske (manje od 1 nmol/ $\mu$ L), ipak kod sfera koje su kultivirane bez izmjene medija bilježimo porast koncentracije adenozin trifosfata nakon 13 dana kultivacije u usporedbi s 8 dana kultivacije. U sferoida kultiviranih 8 dana bez izmjene medija je izmjerena najniža koncentracija ATP-a. Proučavajući dobivene rezultate mjerenja u sfera kultiviranih uz izmjenu medija, uočava se niža koncentracija ATP-a kod sferoida uzgajanih 13 dana za razliku od onih uzgajanih 8 dana. Najveća koncentracija ATP-a dobivena je kod sferoida kultiviranih 13 dana bez izmjene medija.

## 6. RASPRAVA

Unatoč napretku u laboratorijskoj dijagnostici i novim metodama terapije, karcinom pluća zadržava visoko mjesto na svjetskoj ljestvici morbiditeta i mortaliteta što upozorava na potrebu za daljnja istraživanja (9, 10). Trodimenzionalna kultura ne samo zdravih stanica, već i onih malignih unijela je nove mogućnosti u istraživanjima međustaničnih interakcija i testiranjima antitumorske terapije oponašajući uvjete *in vivo* (12, 21). NSCLC kao najčešće dijagnosticirana skupina karcinoma pluća predmet je mnogih istraživanja. Naime, kultivacijom sferoida i usporedbom s tumorskim tkivom pacijenata dokazano su očuvana morfološka obilježja stanica NSCLC nakon 120 dana kultivacije (34).

Ovim istraživanjem uspješno je metodom centrifugiranja provedeno formiranje i kultivacija sferoida od NCI-H358 stanične linije pri čemu je jedan set sfera uzgajan 8 dana, a drugi 13 dana te u uvjetima s izmjenom medija svakih nekoliko dana i bez izmjene medija. Uspješnost kultivacije sferoida karcinoma pluća nemalih stanica potvrdili su Amann A i sur. koristeći stanične linije A549 i Colo699. Promatrana je vijabilnost stanica i struktura sfera u monokulturi te u kokulturi s plućnim fibroblastima. Za formiranje sferoida izabrali su metodu viseće kapi, no također su uzgajali dva seta sfera kroz 5 i 10 dana uz izmjenu medija (35). Prema istraživanju Meenach SA i sur., NCI-H358 stanična linija predstavlja bolji model sferoida za procjenu antitumorske terapije u vidu brzine formacije i čvrstoće formiranih sfera (36).

U ovoj studiji promatran je energetski status sfera s obzirom na distribuciju i dostupnost hranjivih tvari iz medija, rast sfera i nekrotično središte. U okviru energetskog statusa mjerena je aktivnost laktat dehidrogenaze, mitohondrijski membranski potencijal i koncentracija adenozin trifosfata. Za svaku analizu odrađeno je grupiranje određenog broja sfera tzv. metodom „pooliranja“ radi postizanja mjerljive količine analita i prelaženja limita detekcije.

Izmjerene vrijednosti LDH među sferama uzgajane 8 dana ne pokazuju značajnu razliku neovisno o izmjeni medija što ukazuje na to da dostupnost nutrijenata unutar 8 dana nije utjecala na aktivnost LDH. Značajno niže vrijednosti u odnosu na druge analizirane sfere pokazale su one uzgajane 13 dana uz izmjenu medija (Slika 8). Izmjenom medija osiguran je stalni dotok hranjivih tvari što je pogodilo rastu sfera. Porastom sfera posljedično dolazi do sve većih zona mirovanja i nekroze, ali i zone proliferacije (37). Pretpostavlja se da su nutrijenti održali proliferacijsku aktivnost stanica i spriječili njihovu degradaciju. S obzirom na to da je značajno veća aktivnost LDH izmjerena u sferoidima uzgajanih u istom vremenskom intervalu, no bez izmjene medija, možemo zaključiti da je ondje prisutan veći broj nekrotičnih i hipoksičnih

stanica uslijed deficita hranjivih tvari što je dovelo do viših rezultata mjerenja (26, 38). Zanimljivo, veća razina LDH izmjerena je u sfera kultiviranih 8 dana uz izmjenu medija u odnosu na sfere kultivirane 13 dana u istim uvjetima. Moguće da je ovdje veća metabolička aktivnost tumorskih stanica u odnosu na 13. dan kultivacije što možemo povezati s rezultatima studije gdje je zabilježena veća metabolička aktivnost i razina laktične kiseline u 2D kulturi nego u 3D sustavu (39). S obzirom da se tim sferama mijenjao medij, a LDH je mjerena u mediju prikupljenom sa sfera, postoji mogućnost da su ove niže vrijednosti zapravo posljedica izmjene medija gdje se uz stari medij odbacio i dio već otpuštene LDH. Međutim, moguće da je snižena razina aktivnosti LDH posljedica metaboličkog prijelaza vijabilnih tumorskih stanica s glikolize na oksidativnu fosforilaciju kao glavnog izvora energije (40).

Tome u prilog govori i činjenica da je u toj skupini sfera izmjeren značajno veći mitohondrijski potencijal u odnosu na ostale (Slika 10). Naime, ovim sferama omogućen je pristup hranjivim tvarima putem svježeg medija kontinuirano kroz 13 dana kultivacije. Zona hipoksije povećavala se sukladno rastu sfera što je, pored prijelaza na oksidativnu fosforilaciju, potaknulo veću mitohondrijsku aktivnost. Stanje hipoksije u malignim stanicama stimulira mitohondrije na energetske sintezu čime ih štite od oštećenja i osiguravaju preživljenje stanica (41). Ostali dobiveni rezultati nisu pokazali statistički značajne razlike. Točnije, podjednake razine membranskog potencijala ukazuju na neovisnost o izmjeni medija za sferoide uzgajane 8 dana. Također, približno istim vrijednostima potencijala rezultirali su veći stupanj nekroze i inaktivni mitohondriji u sfera kultiviranih 13 dana bez izmjene medija. S druge strane, u usporedbi sa sferama kultiviranih u istom vremenskom periodu uz izmjenu medija uočavamo znatno niži  $\Delta\Psi_m$ .

Nadalje, pokazalo se da metaboličko reprogramiranje mitohondrija i regulacijskih proteina utječu na njihovu disfunkciju u karcinomu pluća nemalih stanica i kroničnoj opstruktivnoj bolesti pluća, a posljedično i na njihovu patogenezu (42). Upravo se disfunkcija mitohondrija uzrokovana reaktivnim vrstama kisika (ROS) i defekti membranske permeabilnosti razmatraju kao slabe točke u stanicama raka kao mete ciljane terapije čime bi se djelovalo isključivo na maligne stanice, isključujući one zdrave (43, 44). Dodatno, razvoj ciljane terapije za NSCLC na osnovi mitohondrijske proteinske regulacije predložili su Parma B i sur. (45).

Kod mjerenja koncentracije adenozin trifosfata nastojali smo grupiranjem sfera iz 32 jažice za svaku skupinu uzoraka dobiti adekvatan signal prilikom analize i posljedično komparativne rezultate. Dobiveni rezultati su izrazito niski ( $< 1 \text{ nmol}/\mu\text{L}$ ) i s blagim varijacijama među skupinama uzoraka. Rezultati su pokazali različitu koncentraciju ATP-a neovisno o



vremenskom periodu i uvjetima kultivacije. Prethodnom studijom Bertuzzi A i sur. ustanovljen je pad prosječne stope produkcije ATP-a po stanici porastom radijusa sferoida (46) što smo potvrdili usporedbom sfera kultiviranih 8 i 13 dana uz izmjenu medija. Naime, niže vrijednosti ATP-a izmjerene su u sferoidima uzgajanih 13 dana. Zanimljivo, sferoidi kultivirani u tom vremenskom razdoblju bez izmjene medija imaju višu izmjerenu koncentraciju ATP-a, približno onoj kod sfera uzgajanih 8 dana uz izmjenu medija. Ove vrijednosti koreliraju s aktivnošću LDH što ide u prilog spomenutoj pretpostavci da se vijabilne stanice do 8 dana oslanjaju na glikolizu, a kasnije potiču mitohondrijsku aktivnost na oksidativnu fosforilaciju (40). Ovdje se predlažu kolorimetrijska mjerenja koncentracije ATP-a na većem broju uzoraka i na većem broju grupiranih sfera čime bi se dobila adekvatna količina podataka za usporedbu i statističku analizu.

Ovim istraživanjem smo pokazali kako su sferoidi reprezentativan *in vitro* model u istraživanjima raka jer vjerno odražavaju strukturu, interakciju stanica i metaboličke promjene stanju *in vivo*. Također, zbog svoje arhitekture središte im postaje nekrotično što odgovara u studijama tumora s obzirom da su *in vivo* često praćeni nekrozom tkiva, posebice u uznapređovalom stadiju. Takvi tumori, među njima i karcinom pluća, imaju lošiju prognozu i veću sklonost metastaziranju čime kultivacija sferoida postaje još značajnija. Zbog prethodno navedene strukturne jedinstvenosti, sferoidi istovremeno omogućuju praćenje stanica u proliferaciji, mirovanju i nekrozi što takva istraživanja čini financijski pristupačnijima, a znanstveno vrednijima. Nadalje, energetski profil stanica u sferoidima može koristiti u daljnjim istraživanjima metaboličkog reprogramiranja tumora, a sfere formirane od stanične linije NCI-H358 mogu poslužiti kao modeli za ispitivanja karcinogeneze i protutumorskih lijekova.

## 7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Kultivacija sfera 8 dana nije pokazala razlike u energetsom profilu neovisno o dostupnosti medija.
2. Sferoidi uzgajani 13 dana osjetljiviji su na reduciranu dostupnost medija što se očituje u energetsom statusu.
3. Uzgoj sferoida bez izmjene medija dovodi do nekroze stanica u proliferacijskoj zoni, dok izmjena medija omogućava rast i proliferaciju.
4. Sferoidi uzgajani 13 dana uz izmjenu medija imaju najveći mitohondrijski potencijal i najnižu aktivnost LDH.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Odrediti energetske status sferoida formiranih od NCI-H358 stanične linije u ovisnosti o dostupnosti medija i rasta sfera.

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

**Materijal i metode:** NCI-H358 stanična linija uzgajana je u RPMI mediju i inkubirana u CO<sub>2</sub> inkubatoru nakon čega je broj vijabilnih stanica određen eritrozinskim bojom. Stanice su nasadene na mikrotitarske ploče, centrifugirane te stavljene u inkubator radi formiranja sferoida. Sferoidi su uzgajani u dva vremenska intervala: 8 i 13 dana gdje se jednom setu sfera mijenjao medij svakih nekoliko dana, dok je drugi bio uzgajan bez izmjene medija. Mjerenje laktat dehidrogenaze učinjeno je mjerenjem apsorbancije na 515 nm iz koje se preračunala zastupljenost LDH. Za određivanje mitohondrijskog potencijala sfere su tripsinizirane te su stanice inkubirane s TMRE bojom. Intenzitet fluorescencije izmjeren je pri Ex/Em = 530/580. Kolorimetrijska analiza zastupljenosti adenozin trifosfata napravljena je mjerenjem apsorbance pri 515 nm iz koje je preračunata koncentracija ATP-a.

**Rezultati:** Sfere kultivirane 8 dana pokazuju podjednaku aktivnost mitohondrija i LDH. Najniža aktivnost LDH izmjerena je u sferama kultiviranih 13 dana uz izmjenu medija, a najviša kod onih bez izmjene medija gdje ključnu ulogu ima nekroza. Visok membranski potencijal pokazuju sferoidi kultivirani 13 dana uz izmjenu medija uslijed aktivnosti vijabilnih stanica i hipoksije kao stimulansa. Izmjerene koncentracije ATP-a su vrlo niske.

**Zaključak:** Dostupnost medija utječe na energetske status sfere kultiviranih 13 dana. Hipoksija i nekroza stimuliraju aktivnost laktat dehidrogenaze i mitohondrija, a membranski potencijal raste s porastom broja vijabilnih stanica.

**Ključne riječi:** 3D kultura stanica; adenozin trifosfat; karcinom pluća; laktat dehidrogenaza; mitohondrijski membranski potencijal; sferoidi

## 9. SUMMARY

### Energy profile of cells in lung cancer spheroids

**Objectives:** To determine energy status of spheroids formed of NCI-H358 cell line in dependence of medium availability and sphere growth.

**Study Design:** *In vitro* controlled trial.

**Material and Methods:** NCI-H358 cell line was grown in RPMI medium and incubated in CO<sub>2</sub> incubator after which the number of living cells was determined by erythrosin B staining. Cells were seeded on microtiter plates, centrifuged and incubated to form spheroids. Spheroids were cultivated in two time periods: 8 and 13 days where to one set of spheres medium exchange was performed every few days, while other set was cultivated without medium exchange. Measurement of lactate dehydrogenase was performed by measuring absorbance at 515 nm which was used to calculate LDH quantity. To determine mitochondrial potential, spheres were trypsinized and cells were incubated with TMRE stain. The fluorescence intensity was measured at Ex/Em = 530/580. Colorimetric analysis of adenosine triphosphate was done by measuring absorbance at 515 nm which was used to calculate ATP concentration.

**Results:** Spheres cultivated for 8 days show similar mitochondrial and LDH activity. The lowest LDH activity was measured in spheres cultivated 13 days with medium exchange, but the highest value was in spheroids cultivated in same time period without medium exchange due to necrosis. Significantly high membrane potential was shown in spheroids cultivated for 13 days with medium exchange due to viable cells activity and hypoxia stimulation. Measured ATP concentrations were extremely low.

**Conclusion:** Medium availability affects on energy status of spheres cultivated 13 days. Hypoxia and necrosis stimulate activity of LDH and mitochondria, while membrane potential grows with the number of viable cells.

**Key words:** 3D cell culture; adenosine triphosphate; lactate dehydrogenase; mitochondrial membrane potential; spheroids

## 10. LITERATURA

1. Grbac I, Bašić-Grbac M, Ostojić J. Rak pluća. *Medicus*. 2001;10:179-190.
2. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, i sur. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018;29:192-237.
3. Cancer Research UK. TNM staging. Dostupno na adresi: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/lung-cancer/stages-types-grades/tnm-staging>. Datum pristupa: 12.07.2022.
4. Nicholson AG, Tsao MT, Beasley MB, Yatabe Y, Yoshida A, Travis WD, i sur. The 2021 WHO classification of lung tumors: Impact of advances since 2015. *J Thorac Oncol*. 2022;17:362-387.
5. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JH, Beasley MB. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors. Impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10:1243-60.
6. Bradley SH, Kennedy MPT, Neal RD. Recognising lung cancer in primary care. *Adv Ther*. 2019;36:19-30.
7. Samaržija M, Jakopović M. Tumori traheje, bronha i pluća. U: Vrhovac B, urednik. *Interna medicina*. Zagreb: Naklada ljevak; 2008. str. 706-715.
8. Mayor M, Yang N, Stermán D, Jones DR, Adusumilli PS. Immunotherapy for non-small cell lung cancer: current concepts and clinical trials. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2016;49:1324-33.
9. Gregg JP, Li T, Yoneda KY. Molecular testing strategies in non-small cell lung cancer: optimizing the diagnostic journey. *Transl Lung Cancer Res*. 2019;8:286-301.
10. Boehringer Ingelheim. Advanced/Metastatic non-small cell lung cancer in focus. Dostupno na adresi: <https://pro.boehringer-ingelheim.com/inoncology/tumor-types/nsclc>. Datum pristupa: 13.07.2022.
11. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija i mortalitet od raka u EU-27 zemljama za 2020. godinu. Dostupno na adresi: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/incidencija-i-mortalitet-od-raka-u-eu-27-zemljama-za-2020-godinu/>. Datum pristupa: 13.07.2022.
12. Edmondson R, Jenkins Broglie J, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12:207-218.

13. Freshney RI. Culture of animal cells. 6. izd. University of Glasgow: Willey-Blackwell; 2007.
14. Brulin B, Nolac JC, Marangon T, Kovacevic M, Chatelais M, Meheust P, i sur. Evaluation of the chemotherapy drug response using organotypic cultures of osteosarcoma tumours from mice models and canine patients. *Cancers (Basel)*. 2021;13:4890:1-20.
15. Salas A, Lopez J, Reyes R, Evora C, Montes de Oca F, Baez D, i sur. Organotypic culture as a research and preclinical model to study uterine leiomyomas. *Sci Rep*. 2020;10:5212:1-12.
16. Ryu NE, Lee SH, Park H. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells. *Cells*. 2019;8:1620:1-13.
17. Pomeranke A. Organotypic models of lung cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2021;430:161-181.
18. Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem*. 2007;101:805-15
19. Oronsky BT, Oronsky N, Fanger GR, Parker CW, Caroen SZ, Lybeck M, i sur. Follow the ATP: Tumor energy production: A perspective. *Anticancer Agents Med Chem*. 2014;14:1187-98.
20. Creative Bioarray. Tumor Cell Culture Guide. Dostupno na adresi: <https://www.creative-bioarray.com/tumor-cell-culture-guide.htm>. Datum pristupa: 20.7.2022.
21. Barbosa MAG, Xavier CPR, Pereira R, Petrikaite V, Vasconcelos MH. 3D cell culture models as recapitulators of the tumor microenvironment for the screening of anti-cancer drugs. *Cancers (Basel)*. 2021;14:1-30.
22. ATCC. NCI-H358 [H-358, H358]. Dostupno na: <https://www.atcc.org/products/crl-5807#detailed-product-information>. Datum pristupa: 20.7.2022.
23. Francisco D, Wang Y, Conway M, Hurbon A, Dy ABC, Addinson KJ, i sur. Surfactant Protein-A protects against IL-13-induced inflammation in asthma. *J Immunol*. 2020;204:2829-39.
24. Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija*. 13. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017.
25. Rajendran M, Dane E, Conely J, Tantama M. Imaging adenosine triphosphate (ATP). *Biol Bull*. 2016;231:73-84.
26. Van Wilpe S, Koornstra R, Den Brok M, De Groot JW, Blank C, De Vries J, i sur. Lactate dehydrogenase: a marker of diminished antitumor immunity. *Oncoimmunology*. 2020;9:1-11.

27. Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 2007;274:1393-418.
28. Vultaggio-Poma V, Sarti AC, Di Virgilio F. Extracellular ATP: A feasible target for cancer therapy. *Cells.* 2020;9:1-22.
29. Klein K, He K, Younes AI, Barsoumian HB, Chen D, Ozgen T, i sur. Role of mitochondria in cancer immune evasion and potential therapeutic approaches. *Front Immunol.* 2020;16:1-11.
30. Rovini A, Heslop K, Hunt EG, Morris ME, Fang D, Gooz M, i sur. Quantitative analysis of mitochondrial membrane potential heterogeneity in unsynchronized and synchronized cancer cells. *FASEB J.* 2021;35:1-14.
31. Takara Bio Inc. LDH Cytotoxicity Detection Kit. Product manual. 3-16.
32. Abcam. TMRE-Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (ab113852). Dostupno na adresi: <https://www.abcam.com/tmre-mitochondrial-membrane-potential-assay-kit-ab113852.html>. Datum pristupa: 23.7.2022.
33. Abcam. ATP Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric). 2022;2-21.
34. Zhang Z, Wang H, Ding Q, Xing Y, Xu Z, Lu C, i sur. Establishment of patient-derived tumor spheroids for non-small cell lung cancer. *PloS One.* 2018;13:1-8.
35. Amann A, Zwierzina M, Gamerith G, Bitsche M, Huber JM, Vogel GF, i sur. Development of an innovative 3D cell culture system to study tumour - stroma interactions in non-small cell lung cancer cells. *PloS One.* 2014;9:1-13.
36. Meenach SA, Tsoras AN, McGarry RC, Mansour HM, Hilt JZ, Anderson KW. Development of three-dimensional lung multicellular spheroids in air- and liquid-interface culture for the evaluation of anticancer therapeutics. *Int J Oncol.* 2016;48:1701-9.
37. Browning AP, Sharp JA, Murphy RJ, Gunasingh G, Lawson B, Burrage K, i sur. Quantitative analysis of tumour spheroid structure. *eLife.* 2021;10:1-25.
38. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Bougioukas G, Didilis V, Gattwe KC, i sur. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer.* 2003;89:877-85.
39. Lagies S, Schlimpert M, Neumann S, Wäldin A, Kammerer B, Borner C, i sur. Cells grown in three-dimensional spheroids mirror in vivo metabolic response of epithelial cells. *Commun Biol.* 2020;3:1-10.

40. Gandhi Torizal F, Kimura K, Horiguchi I, Sakai Y. Size-dependent hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells spheroid in suspension culture. *Regen Ther.* 2019;12:66-73.
41. Tohme S, Yazdani HO, Liu Y, Loughran P, van der Windt DJ, Huang H, i sur. Hypoxia mediates mitochondrial biogenesis in hepatocellular carcinoma to promote tumor growth through HMGB1 and TLR9 interaction. *Hepatology.* 2017;66:182-197.
42. Nam HS, Izumchenko E, Dasgupta S, Hoque MO. Mitochondria in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: where are we now?. *Biomark Med.* 2017;11:475-489.
43. Nguyen C, Pandey S. Exploiting mitochondrial vulnerabilities to trigger apoptosis selectively in cancer cells. *Cancers (Basel).* 2019;11:1-20.
44. Badrinath N, Yoo SY. Mitochondria in cancer: in the aspects of tumorigenesis and targeted therapy. *Carcinogenesis.* 2018;39:1419-30.
45. Parma B, Ramesh V, Gollavilli PN, Siddiqui A, Pinna L, Schwab A, i sur. Metabolic impairment of non-small cell lung cancers by mitochondrial HSPD1 targeting. *J Exp Clin Cancer Resp.* 2021;40:248.
46. Bertuzzi A, Fasano A, Gandolfi A, Sinisgalli C. Necrotic core in EMT6/Ro tumour spheroids: Is it caused by an ATP deficit?. *J Theor Biol.* 2010;262:142-50.



## **11. ŽIVOTOPIS**

### **OSOBNI PODACI**

Ime i prezime: Sara Jančić

Datum i mjesto rođenja: 2.11.1998., Zagreb, Republika Hrvatska

Adresa: Ulica Franje Vidovića 33, 43240 Čazma

E-mail: sara.jancic0211@gmail.com

### **OBRAZOVANJE**

2020. – 2022. Medicinski fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, diplomski studij medicinsko laboratorijska dijagnostika

2017. – 2020. Zdravstveno veleučilište u Zagrebu, preddiplomski stručni studij medicinsko laboratorijska dijagnostika

2013. – 2017. Srednja škola Čazma, opća gimnazija

### **RADNO ISKUSTVO**

lipanj 2021. – lipanj 2022. Klinički bolnički centar Zagreb, pripravništvo za prvostupnicu medicinsko laboratorijske dijagnostike