

# Modeliranje staničnih sferoida različitim uzgojnim metodama in vitro

---

Janić, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:152:976941>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-02**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Ivana Janić**

**MODELIRANJE STANIČNIH SFEROIDA  
RAZLIČITIM METODAMA *IN VITRO***

**Završni rad**

**Osijek, 2019.**

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

**Ivana Janić**

**MODELIRANJE STANIČNIH SFEROIDA  
RAZLIČITIM METODAMA *IN VITRO***

**Završni rad**

**Osijek, 2019.**

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

Mentor rada: prof. dr. sc. Ljubica Glavaš-Obrovac

Rad ima 34 stranice i 15 slika.

*Zahvaljujem se ponajprije prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac na pruženoj prilici, predloženoj temi i stručnom vodstvu tijekom izrade završnog rada te prenesenom znanju tijekom preddiplomskog studija.*

*Veliko hvala dr.sc. Marijani Jukić na znanju koje je podijelila sa mnom, nesebičnoj pomoći i izdvojenom vremenu tijekom izrade rada.*

*Posebnu zahvalnost želim iskazati svojoj obitelji, prijateljima i dečku. Hvala Vam za svu brigu, strpljenje, podršku i motivaciju koju ste mi davali tijekom studiranja.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. <i>In vitro</i> kultivacija stanica .....	1
1.1.1. Prednosti kultura stanica.....	1
1.1.2. Principi <i>in vitro</i> kultivacije.....	1
1.2. Dvodimenzionalna (2D) kultura.....	3
1.3. Trodimenzionalna (3D) kultura.....	4
1.4. Metode uzgoja staničnih sferoida.....	5
1.4.1. Metode bez nosača .....	5
1.4.2. Metode s nosačem .....	7
1.4.3. Bioreaktori.....	8
2. CILJ .....	9
3. MATERIJALI I METODE.....	10
3.1. MATERIJALI .....	10
3.1.1. Stanične linije .....	10
3.1.2. Kemikalije .....	10
3.2. METODE .....	11
3.2.1. Kultura stanica <i>in vitro</i> .....	11
3.2.2. Uzgoj 2D kultura .....	12
3.2.3. Uzgoj 3D kultura .....	13
3.2.4. Određivanje staničnog ciklusa protočnim citometrom.....	13
3.2.5. Statistička obrada podataka .....	14
4. REZULTATI.....	15
4.1. Uspostavljanje 2D kulture stanica .....	15
4.2. Uspostavljanje 3D kulture stanica .....	17
4.3. Stanični ciklus .....	24
5. RASPRAVA.....	27
6. ZAKLJUČAK .....	29
7. SAŽETAK.....	30
8. SUMMARY .....	31
9. LITERATURA.....	32
10. ŽIVOTOPIS.....	34

## POPIS KRATICA

CaCo-2 (eng. *colon carcinoma*) karcinom debelog crijeva

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

DNA (eng. *deoxyribonucleic acid*) deoksiribonukleinska kiselina

ECM (eng. *extracellular matrix*) ekstracelularni matriks

FBS (eng. *fetal bovine serum*) fetalni goveđi serum

HeLa (eng. *cervical adenocarcinoma*) adenokarcinom vrata maternice

NCI-H358 (eng. *bronchioalveolar carcinoma*) bronhoalveolarni karcinom

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

RNA (eng. *ribonucleic acid*) ribonukleinska kiselina

RPMI 1640 (eng. *Roswell Park Memorial Institute*) medij

## 1. UVOD

### 1.1. *In vitro* kultivacija stanica

Metoda kulture stanica podrazumijeva laboratorijski uzgoj stanica, tkiva, organa i kompletnih organizama na umjetnim hranidbenim podlogama i u aseptičnim uvjetima. Ta je tehnika postala nezaobilazna u različitim granama biomedicinskih istraživanja. Izvrstan je model za proučavanje fiziologije i biokemije stanica, karcinogeneze i mutageneze te za ispitivanje utjecaja lijekova (1).

#### 1.1.1. Prednosti kultura stanica

Bitne karakteristike *in vitro* kultivacije stanica jesu mogućnost kontroliranja fizikalno-kemijskih uvjeta (temperatura, pH, osmotski tlak, tlak  $O_2$  i  $CO_2$ ) koji moraju biti precizno kontrolirani te fizioloških uvjeta (nutrijenti, hormoni) koji moraju biti relativno konstantni. Korištenje kulture stanica ekonomičnije je zbog manje uporabe reagensa u odnosu na *in vivo* metode te manji trošak probirnih testova. Nadalje, uporabom kultura stanica izbjegnuta su legalna, moralna i etička pitanja vezana uz korištenje životinja u istraživačke svrhe (2). Glavnim prednostima korištenja stanične kulture smatraju se konzistencija i ponovljivost rezultata koji se mogu dobiti iz serije klonalnih stanica (1).

#### 1.1.2. Principi *in vitro* kultivacije

Kulture stanica započinju usitnjavanjem tumorskog ili normalnog tkiva tako da se dobije suspenzija stanica koja se zatim stavlja u posudicu za kulturu koja sadrži hranjivi medij. Većina tipova stanica prihvaća se za dno posudice za kulturu te na njoj rastu sve dok ne prekriju cijelu površinu. Takvu kulturu nazivamo primarnom. Nakon što stanice prerastu dno, stanice se mogu izvaditi iz posudice i u razrijeđenoj koncentraciji ponovo nasaditi, što predstavlja sekundarnu kulturu. Taj se proces presađivanja može ponoviti nekoliko puta (3). Međutim, takve sekundarne kulture ne žive dugo jer im je broj dioba jednak onom u procesu



*in vivo*. Takve stanične linije s ograničenim brojem dioba nazivamo konačnim staničnim linijama. *In vitro* transformacijom konačnih stanica dobivaju se kontinuirane stanične linije. One predstavljaju biološki materijal za dugotrajnu upotrebu. Imaju neograničen broj dioba, veći stupanj rasta, veću sposobnost kloniranja te sposobnost, da osim u monosloju, rastu i u suspenziji (2).

Stanične linije koje se koriste u tehnologiji životinjskih stanica mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine: adherentne stanice, tj. stanice koje rastu jedino ako su pričvršćene za površinu i suspenzijske stanice koje mogu rasti neovisno o površini (4).

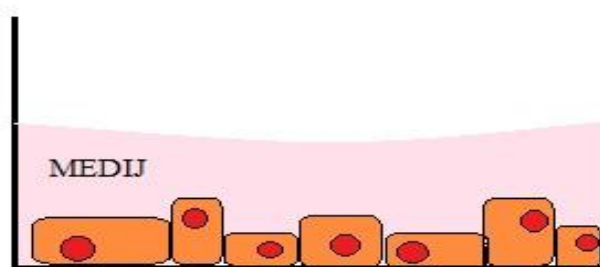
Bitan čimbenik u kultivaciji stanica jest medij za uzgoj koji se odabire na osnovi potreba stanica za određenim nutrijentima i faktorima rasta. U ranijim istraživanjima u staničnim kulturama koristili su se mediji s nedefiniranim sastojcima (plazma, serum ili ekstrakt embrija). Veliku prekretnicu donio je 1955. godine Harry Eagle provevši sustavnu analizu hranjivih sastojaka potrebnih za rast animalnih stanica u kulturi. Tako je odredio i definirao prvi točno definiran medij koji omogućuje rast stanica u kulturi. Uz sol i glukozu, hranjive tvari uključivale su 13 aminokiselina, nekoliko vitamina te malu količinu seruma. Medij koji je definirao Eagle i danas se koristi kao osnovni medij za kulturu stanica (3).

Serum životinjskog ili humanog porijekla uobičajen je dodatak mediju. Obično se dodaje u medij za kulturu u koncentraciji od 10% za poticanje staničnog rasta. Serum je supernatant zgrušane krvi koji sadrži sastojke neophodne za proliferaciju stanica. To je složena smjesa velikog broja sastojaka esencijalnih za rast i održavanje stanica u kulturi – faktora rasta, proteina, vitamina, elemenata u tragovima, hormona. Kravlji (goveđi) ili konjski serum koji se najčešće koristi s fetalnim telećim serumom (eng. *Foetal Calf Serum* - FCS) smatra se posebno djelotvornim zbog visokog sadržaja embrionalnih faktora rasta. Serum je ujedno i najskuplja komponenta medija za uzgoj životinjskih stanica, a s obzirom na svoj izvor postoji mogućnost od prijenosa bakterija, virusa i priona kao i mogućnost određenih razlika u sastavu koje ovise o seriji proizvodnje (4).

## 1.2. Dvodimenzionalna (2D) kultura

Standardna 2D kultura stanica temelji se na adheziji stanica na ravnu površinu, tipično Petrijeve zdjelice ili na staklo polistirena. Stanice rastu u monosloju zbog čega su jednako izložene mediju s hranjivim tvarima što rezultira homogenim rastom i proliferacijom (slika 1.) (5). 2D kultura je jednostavna, jeftina, laka za interpretaciju te je omogućila bolje razumijevanje mehanizama rasta tumorskih stanica. Međutim, ovakav način uzgoja stanica ima niz nedostataka. Stanice u 2D kulturi ne oponašaju strukture normalnih i tumorskih tkiva *in vivo*. Nadalje, interakcije između stanica te između stanica i ekstracelularnog matriksa, nisu jednake onima u tumorima, a upravo te interakcije odgovorne su za staničnu diferencijaciju, proliferaciju te ekspresiju gena i proteina. Zbog rasta u monosloju, sve stanice imaju neograničen pristup kisiku, nutrijentima, metabolitima i signalnim molekulama iz medija, što naravno nije slučaj s tkivima *in vivo* zbog njihove složenije građe (6).

Usprkos problematici koja dolazi uz ovakav način uzgoja stanica, primjena joj je i dalje vrlo široka te značajna upravo u prvim fazama istraživanja.



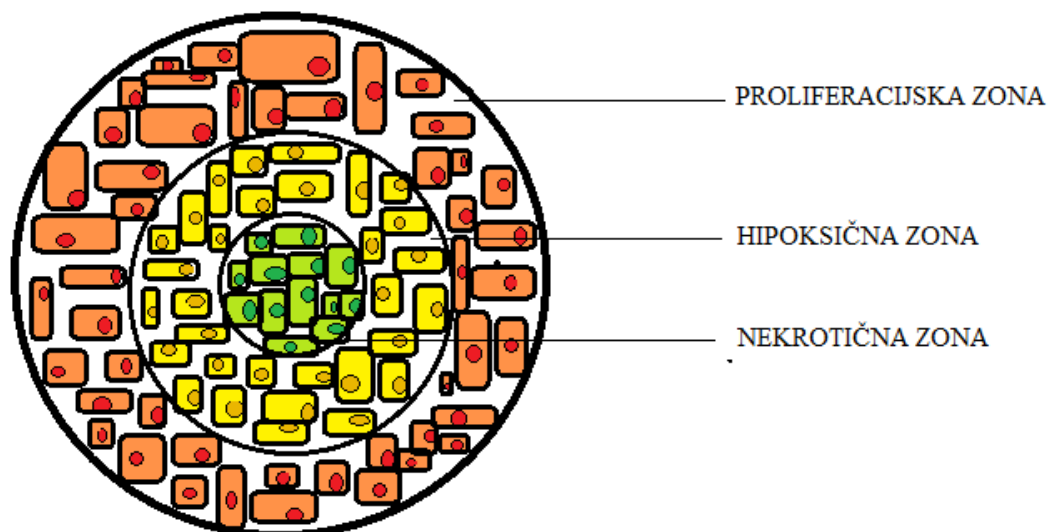
Slika 1. Prikaz rasta stanica u 2D kulturi

### 1.3. Trodimenzionalna (3D) kultura

Nedostatci 2D kulture doveli su do razvoja metoda za uzgoj stanica koje približnije oponašaju *in vivo* uvjete. Od 1970. godine kada je napravljena prva kultura u obliku tekućeg gela od kolagena, tehnike trodimenzionalne kulture razvijale su se te se i danas razvijaju i usavršavaju (7). Trodimenzionalni modeli kultura stanica podrazumijevaju cijele organizme (npr. životinje), organotipične eskplativne kulture (uključujući embrije), stanične sferoide te modele tkivnog inženjeringa (8).

Stanični sferoidi najčešće su korišteni modeli zato što su jednostavni te mogu biti generirani iz širokog raspona tipova i oblika stanica. Za razliku od 2D kulture u kojoj stanice adheriraju na površinu, formiranje sferoida temelji se na agregiranju stanica. Zbog agregacije, stanice unutar sferoida u bliskom su kontaktu čime se omogućuje fizički kontakt i stanična signalizacija kakva je prisutna u tumorima *in vivo*. Stanice su u različitim fazama rasta smještene u više slojeva. Vijabilne stanice koje su većinom u *S* fazi staničnog ciklusa smještene su u vanjskom sloju sferoida i izložene lako dostupnom izvoru hranjivih komponenti iz staničnog medija. Srž je sferoida hipoksična zona s nekrotičnim središtem, odnosno stanicama koje se pretežito nalaze u nekrozi ili apoptozi (slika 2). Izmjena plinova i hranjivih tvari između pojedinih zona sferoida nije konstantna što ujedno utječe na dobivanje kompleksnijih rezultata. Slično nativnom tumorskom tkivu, stanice uzgojene kao tumorski sferoidi pokazuju jaki proliferacijski gradijent koji odražava raspodjelu kisika, hranjivih tvari i energije, kao i nakupljanje metabolita od vanjske strane prema unutrašnjoj strani sferoida (9).

3D stanične kulture mogu biti uspostavljene od jedne kulture stanica ili kokulture nastale kultiviranjem različitih vrsta stanica u jednu kulturu. Formirani sferoidi mogu biti predloženi svjetlosnom, fluorescencijskom ili konfokalnom mikroskopijom. Koriste se u modeliranju rasta solidnih tumora i metastaza te u brojnim istraživanjima lijekova.



Slika 2. Prikaz strukture staničnog sferoida

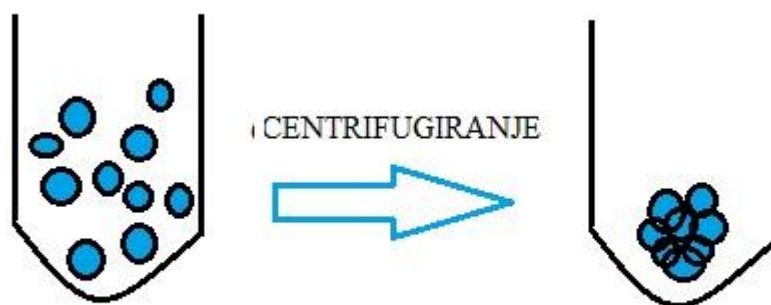
## 1.4. Metode uzgoja staničnih sferoida

Stanični sferoidi mogu se uzgajati s nosačem ili bez nosača, te u bioreaktorima.

### 1.4.1. Metode bez nosača

Formiranje sferoida bez nosača uključuje sakupljanje stanica u neadherentnim uvjetima. Razlikujemo dvije bitne metode: metodu plutajućih stanica i metodu viseće kapi (8).

Metoda plutajućih stanica (eng. *forced floating*) jednostavna je i jeftina metoda u kojoj koristimo mikrotitarske ploče sa slaboprianjajućim jažicama konusnog dna. Stijenke jažica obložene su najčešće 0,5% poli-HEM-om (poli-2-hidroksietil metakrilatom) čime je spriječeno prijanjanje stanica za stijenke (10). Nakon nasađivanja stanične suspenzije u jažice, ploču je potrebno centrifugirati kako bi stanice agregirale te formirale sferoid (slika 3.).



**Slika 3. Metoda plutajućih stanica**

Metoda viseće kapljice (eng. *hanging drop*) koristi male alikvote stanične suspenzije (maksimalno 50  $\mu\text{L}$ ) koji se pipetiraju na poklopac Petrijeve zdjelice čijim zatvaranjem nastaju viseće kapljice koje na mjestu drži površinska napetost (slika 4.). Petrijevku je potrebno napuniti PBS-om (fosfatni pufer) kako ne bi došlo do dehidracije kapljica. Osim Petrijevki, mogu se koristiti i jažice bez dna koje se nakon pipetiranja uzastopno okreću, a alikvoti stanične suspenzije tvore viseće kapi (10). Stanice akumuliraju na dnu kapi i tvore sferoide koji mogu biti održani u kulturi nekoliko tjedana, što omogućava njihovu primjenu u dugotrajnijim istraživanjima (11). Ova je metoda jednostavna, s gotovo 100%-tnom reproducibilnošću (12).



**Slika 4. Metoda viseće kapljice**

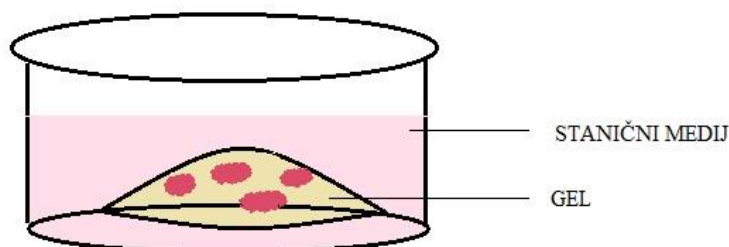
### 1.4.2. Metode s nosačem

Modeliranje 3D stanične kulture moguće je pomoću nosača različitih poroznosti i propusnosti s ciljem davanja potpore u formiranju 3D strukture te oponašanja izvanstaničnog prostora (10). Bitna karakteristika nosača jest porozna struktura koja olakšava infiltraciju stanica, stvaranje sferoida, transport hranjivih tvari i metabolita, izmjenu plinova, dotok lijekova do stanica te otklanjanje otpadnih molekula. Postoje dvije vrste nosača – prirodni i sintetički.

Prirodni nosači, dobiveni iz tkiva, su ekstracelularni matriks (ECM) i amnionska membrana. ECM potječe iz različitih tkiva poput krvnih žila, kože, živaca i tetiva te je bogat izvor proteina, proteoglikana i raznih faktora rasta. Amnionska membrana dobiva se iz placente tijekom poroda.

Sintetički nosači izgrađeni su od biomaterijala, najčešće polimera koji mogu biti prirodni (kolagen, fibrin) i sintetski (polistiren, polikaprolakton) (11).

Upravo zbog vjernog oponašanja izvanstaničnog prostora, građe od raznih prirodnih i sintetičkih polimera, često primjenjivani u tumorskim istraživanjima su hidrogelovi. Oni sadrže visoki postotak vode i križno povezane prirodne materijale kao što su agaroz, fibrin, kolagen i laminin (12). Postoje dva različita pristupa – raspršivanje u tekućem hidrogelu (slika 5.) i polimerizacija te nasađivanje stanica na acelularni 3D matriks. Jedan od najpoznatijih komercijalnih hidrogelova je Matrigel™.



**Slika 5. Rast sferoida u gelu**

### 1.4.3. Bioreaktori

Bioreaktori su kultivacijski sustavi čija uloga je osigurati uvjete za rast stanica. To se najbolje postiže osiguravanjem uvjeta za staničnu homeostazu što uključuje održavanje temperature, pH i osmotskih svojstava medija za uzgoj, kontroliranu dobavu hranjivih tvari i kisika te uklanjanje proizvoda metabolizma. Idealni su za masovnu staničnu proizvodnju te zbog mogućnosti čestog mijenjanja medija, mogu se koristiti za dugotrajnu kultivaciju (13).

Postoje i takozvane pokretne boce (eng. *spinner flask*) koje se sastoje od spremnika sa staničnom suspenzijom i miješalice. Ova jednostavna metoda stvara velike količine sferoida koji se mogu koristiti za dugotrajnu kultivaciju. Stalnim kretanjem stanične tekućine omogućuje se protok kisika i nutrijenata do sferoida te uklanjanje staničnog otpada (12).

## 2. CILJ

- Uzgojiti stanične sferoide različitim uzgojnim tehnikama te svakodnevnim praćenjem rasta sferoida proučiti postoji li razlika u organizaciji, odnosno morfologiji staničnih sferoida uzgojenih trima različitim uzgojnim metodama.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Stanične linije

U ovom radu korištene su tri komercijalno dostupne humane stanične linije:

- CaCo-2 (ATCC® HTB-37™) – epitelne stanice humanog karcinoma kolona.
- HeLa (ATCC® CCL-2™) – humane epitelne stanice adenokarcinoma cerviksa.
- NCI-H358 (ATCC® CRL-5807™) – epitelne stanice bronhoalveolarnog karcinoma

##### 3.1.2. Kemikalije

- DMEM, s visokim udjelom glukoze (4.5 g/L) i L-glutaminom, Capricorn Scientific GmbH
- Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640), sa stabilnim glutaminom, Capricorn Scientific GmbH
- Fetalni goveđi serum (FBS), Na-piruvat i antibiotik-antimikotik (penicilin/streptomycin) 100x, GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija)
- Tripan plavilo 0.4%, 0.8 % NaCl, sterilno filtriran, Lonza (Basel, Švicarska)
- Tripsin/EDTA, tripsin 0.25%, 1Mm EDTA-Na<sub>4</sub> u HBSS, s phenolred, Panbiotech GmbH (Aidenbach, Njemačka)
- Agarosa, visoke rezolucije, Sigma Aldrich (Missouri, USA)
- Propidij jodid, Invitrogen (Oregon, USA)
- RNase A, 50mg, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Njemačka)

## 3.2. METODE

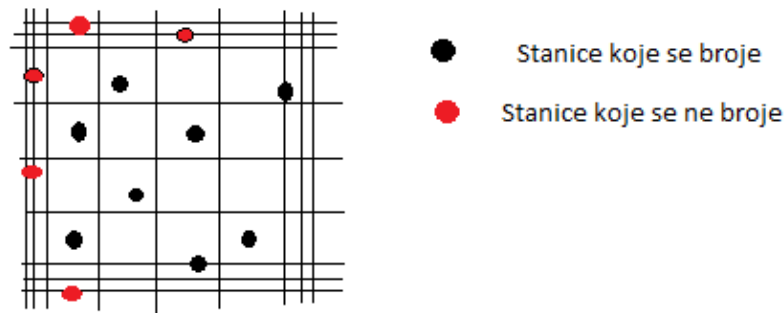
### 3.2.1. Kultura stanica *in vitro*

Kultivacija stanica koja se izvodi u laboratoriju za kulturu stanica, zahtijeva rad u sterilnim uvjetima u kabinetu s laminarnim protokom zraka. Stanice se uzgajaju u bocama za kultivaciju površine rasta 25 cm<sup>2</sup> i 75 cm<sup>2</sup> (BD Falcon, Njemačka) u inkubatoru (IGO 150 CELLlifeTM, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) s kontroliranom atmosferom uz 5% CO<sub>2</sub> i temperaturu od 37 °C.

Za održavanje staničnih linija HeLa i CaCo-2 koristi se DMEM medij uz dodatak 10% FBS-a, 2 mM L-glutamina i 100 U/0,1 mg penicilin/streptomycin antibiotika, dok se NCI-H358 stanična linija uzgaja u RPMI 1640 mediju.

Konfluentnost poraslih stanica provjerava se svakodnevno invertnim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka) te se prema potrebi stanice odljepljuju s površine i prenose u svježi medij. Enzimatsko odvajanje stanica obavlja se tripsinom uz prethodno ispiranje PBS-om. Nakon dodatka tripsina, stanice se inkubiraju 6 minuta nakon čega se dodaje svježi medij kojim se tripsin inaktivira. Nakon odvajanja stanica od podloge, stanice se pakupe svježim medijem za održavanje i stave u novu posudicu.

Bitan faktor uspješne stanične kulture je vijabilnosti stanica koja određuje kvalitetu i reproducibilnost rezultata. Za određivanje broja stanica korišten je test Tripan plavilom. Iz prethodno resuspendiranih stanica uzima se 50 µL suspenzije i prenosi u jažicu te se dodaje boja Tripan plavilo. Stanična suspenzija s bojom nanosi se na Bürker-Türkovu komoricu. Zatim se pomoću invertnog mikroskopa odredi broj živih stanica. Mrtve stanice su obojene jer se u njima boja nakuplja, dok su žive neobojene zbog intaktne stanične membrane koja ne propušta boju. Brojimo samo žive stanice unutar 4 kvadrata te one u gornjem i jednom od postraničnih bridova kvadrata.



**Slika 6. Mikroskopski prikaz Bürker-Türk komorice**

Broj živućih stanica određen je formulom:

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

Gdje je:

N – broj stanica

4 – broj polja u komorici

3 – faktor razrjeđenja

### 3.2.2. Uzgoj 2D kultura

Stanične linije uzgojene u monosloju (HeLa, CaCo-2, NCI-H358) odvojili smo od podloge tripsinom te ih prenijeli sa svježim medijem u nove falkonice, posebne za svaku staničnu liniju. Zatim smo stanične linije iz falkonica nasađivali pipetom u jažice u koncentraciji  $1 \times 10^4$  st/mL u volumenu od 200  $\mu$ L na mikrotitarskoj ploči od ukupno 96 jažica.

Nasađenu ploču držali smo u  $CO_2$  inkubatoru na 37°C, porasle stanične kulture svakodnevno slikali invertnim mikroskopom (Zeiss, AxioVision, Njemačka) i pratili njihov razvoj u deset dana.

### 3.2.3. Uzgoj 3D kultura

Svaku staničnu liniju nasadili smo i u trodimenzionalnom obliku koristeći tri različite metode: metodu viseće kapljice, metodu plutajućih stanica te uzgoj stanica na podlozi od gela i unutar gela. Sve kulture nakon nasađivanja kultivirali smo u inkubatoru na 37 °C i 5%  $CO_2$ . Primjenom svjetlosnog mikroskopa (Zeiss, AxioVision, Njemačka) pratili smo i slikali formiranje sferoida nastalih različitim uzgojnim metodama u periodu od deset dana.

U prvoj metodi koristili smo po jednu Petrijevu zdjelicu za određenu staničnu liniju. Svaku zdjelicu napunili smo s 20 mL PBS-a, a na poklopcu zdjelice pipetom nanosili staničnu suspenziju u koncentraciji  $1 \times 10^4$  st/mL u volumenu od 20  $\mu$ L u obliku kapljice. Polaganim zatvaranjem zdjelice poklopcem, pod djelovanjem slobodnog pada, formirale su se kapljice.

U idućoj metodi koristila se ploča s 96 jažica slaboprianjajućeg konusnog dna u koje smo nanosili stanične linije u koncentraciji  $1 \times 10^4$  st/mL u volumenu od 200  $\mu$ L u svaku jažicu. Zatim smo nasađenu ploču centrifugirali na 1100 rpm 10 minuta pri 25 °C (Jouan BR4, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) kako bi se stanice nakupile u konusno dno.

U posljednjoj metodi napravili smo gel s različitim postotcima agaroze (0,7%, 1% i 2%). Gel smo pripremili tako što smo izvagali agarozu, dodali PBS, promiješali te stavili u mikrovalnu pećnicu na nekoliko minuta kako bi se agarozu rastopila, nakon čega smo tako pripremljen gel nanosili na mikrotitarsku ploču u jažice u volumenu od 50  $\mu$ L te pričekali da se ohladi. Nakon polimerizacije, nanosili smo stanice na gel u koncentraciji od  $1 \times 10^4$  st/mL u volumenu od 200  $\mu$ L. Jedan dio stanica, iste koncentracije, pomiješali smo sa 60  $\mu$ L gela te ih tako nanosili u jažice kako bi dio stanica rastao unutar gela.

### 3.2.4. Određivanje staničnog ciklusa protočnim citometrom

Metoda određivanja staničnog ciklusa protočnom citometrijom zasniva se na sposobnosti vezanja fluorescentne boje propidij jodid na molekulu DNA. Razlikovanje faza staničnog ciklusa omogućeno je upravo mjerenjem intenziteta fluorescencije koja je izravno proporcionalna količini DNA u stanici. Kako se količina DNA udvostručava između G1 i G2 faze staničnog ciklusa, tako se i jačina fluorescencije udvostručava. Prvi pik na histogramu prikazuje stanice u G1 fazi s normalnom količinom DNA ( $2n$  kromosoma). Drugi pik

označava udvostručenu količinu DNA u G2 i M fazi ciklusa i stanice u S fazi ciklusa čija količina DNA varira ovisno o stupnju replikacije.

Za proučavanje staničnog ciklusa koristili smo stanične linije uzgojene u 3D kulturi metodom plutajućih stanica u koncentraciji  $1 \times 10^4$  st/mL, starosti od četiri, sedam i deset dana. Stanične sferoide prethodno smo prenijeli iz jažica u falkonice te ih tripsinizirali kako bismo dobili pojedinačne stanice iz sferoida. Zatim smo stanice centrifugirali, isprali PBS-om te fiksirali sa 70%-tnim etanolom (3mL). Fiksirane stanice čuvali smo na  $-20^{\circ}\text{C}$  do dana analize.

Na dan izvođenja analize stanice smo pripremili za postupak tako da smo svaku epruvetu nekoliko sekundi vorteksirali te nakon centrifugiranja (1100 rpm, 6 minuta,  $25^{\circ}\text{C}$ ) (Jouan BR4, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) odlili etanol. Dodali smo u epruvetu 1 mL PBS-a te ponovo centrifugirali. Nakon centrifugiranja odlili smo dodan PBS, stanice smo resuspendirali s 350  $\mu\text{L}$  PBS-a i prenijeli u epruvete namijenjene za protočnu citometriju. Kako bi se razgradile sve molekule RNA i u suspenziji ostale molekule DNA, korištena je RNAza koju smo dodali u koncentraciji od 1 mg/mL. Nakon 5 minuta dodali smo fluorescentnu boju propidij jodid u koncentraciji od 15  $\mu\text{g/mL}$  te epruvete ostavili inkubirati na sobnoj temperaturi prekrivene folijom. Nakon pola sata inkubiranja započeli smo rad na protočnom citometru (BD FACSCanto, BD Biosciences, Češka).

### 3.2.5. Statistička obrada podataka

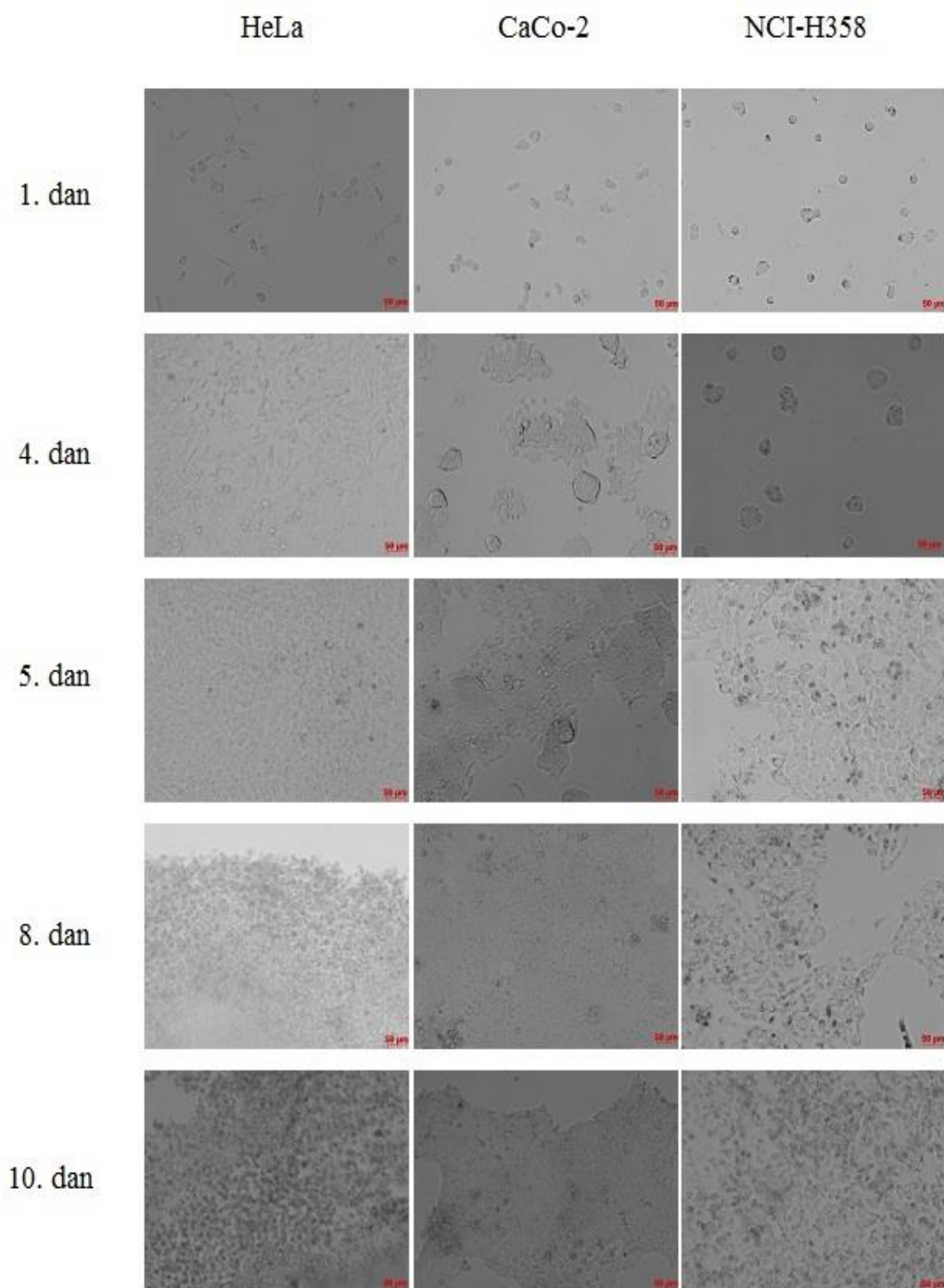
Protočnom citometrijom analizirali smo stanične linije u duplikatu. Podatci su prikazani kao postotak populacije i koeficijent varijacija (CV) pomoću statističke funkcije za analizu podataka i obrade rezultata s protočne citometrije FlowJo verzija 10.2. Rezultati staničnog ciklusa statistički su obrađeni u XLSTAT-ANOVA programu korištenjem Tukey i Bonferroni testa. Statistička značajnost određena je kao  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Uspostavljanje 2D kulture stanica

Stanične linije, HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 uzgojili smo u 2D kulturi stanica. Pratili smo svakodnevno stanični rast te slikali porasle stanice tijekom deset dana. Slikajući porasle stanice mogli smo vidjeti razliku među staničnim linijama što se tiče brzine njihova rasta, brzine raspadanja, razliku u morfologiji.

HeLa stanična linija pokazala je najbrži rast stanica dok su CaCo-2 i NCI-H358 stanične linije pokazale sporiji rast. Progresivnim su rastom HeLa stanice već unutar pet dana dostigle konfluentnost, za razliku od CaCo-2 i NCI-H358 linija kod kojih je još preostalo prostora za rast. Nakon osmog dana vidljivo je odljepljivanje i propadanje HeLa stanica od podloge uslijed iskorištenja cijelog hranjivog medija. Produženim vremenom uzgoja NCI-H358 stanice dostižu konfluentnost, dok CaCo-2 još uvijek ima prostora za rast. Također je vidljivo da CaCo-2 i NCI-H358 stanice imaju tendenciju rasta u nakupinama, takozvanim klasterima.



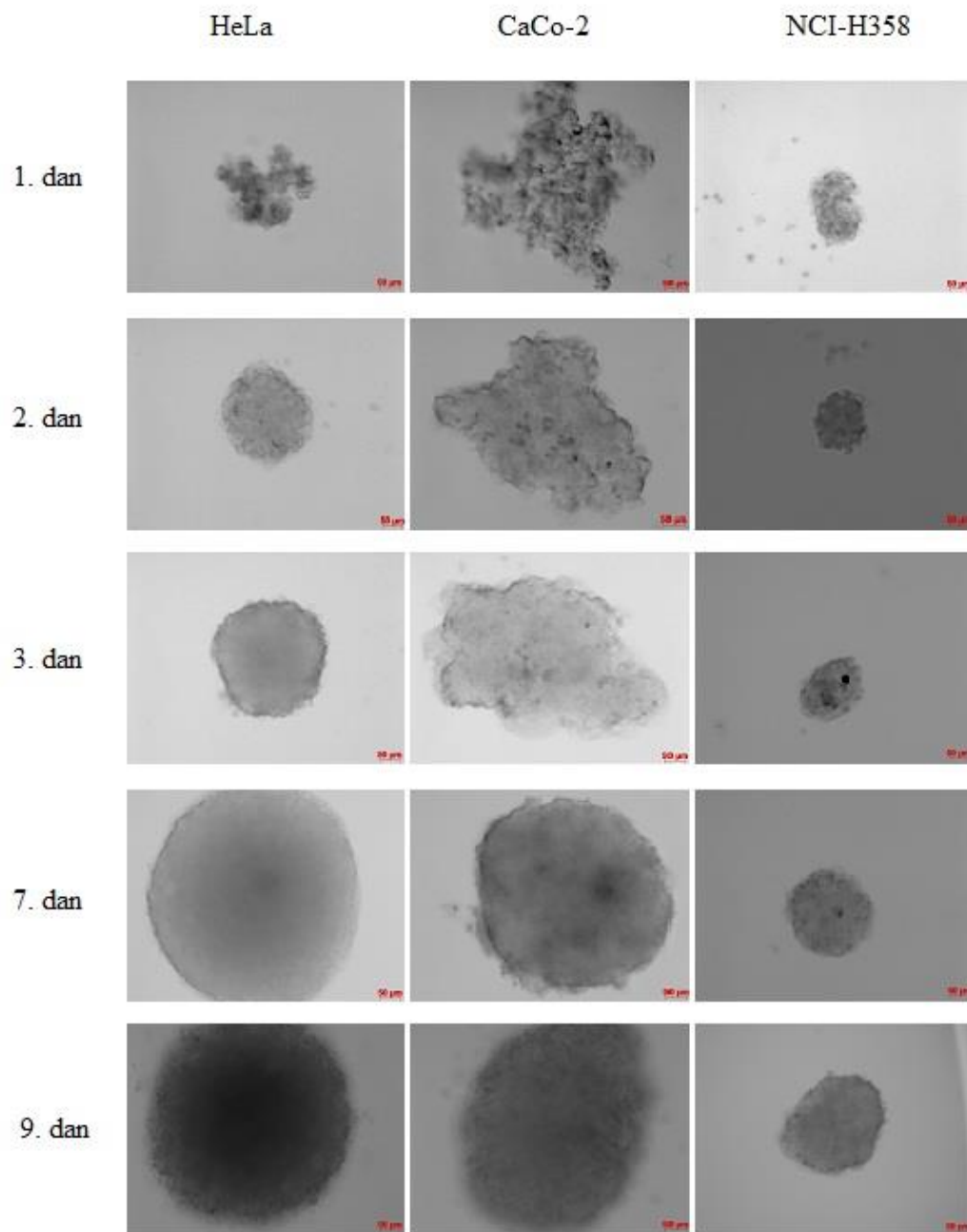
**Slika 6. Formiranje 2D kulture.** Stanice su slikane pod povećanjem od 20x na mikroskopu (Zeiss, AxioVision, Njemačka). Skala predstavlja 50  $\mu\text{m}$ .

## 4.2. Uspostavljanje 3D kulture stanica

Rast i razvoj uzgojenih sferoida staničnih linija HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 pratili smo u devet dana. Formiranje sferoida u svim metodama zabilježeno je već nakon prvog dana.

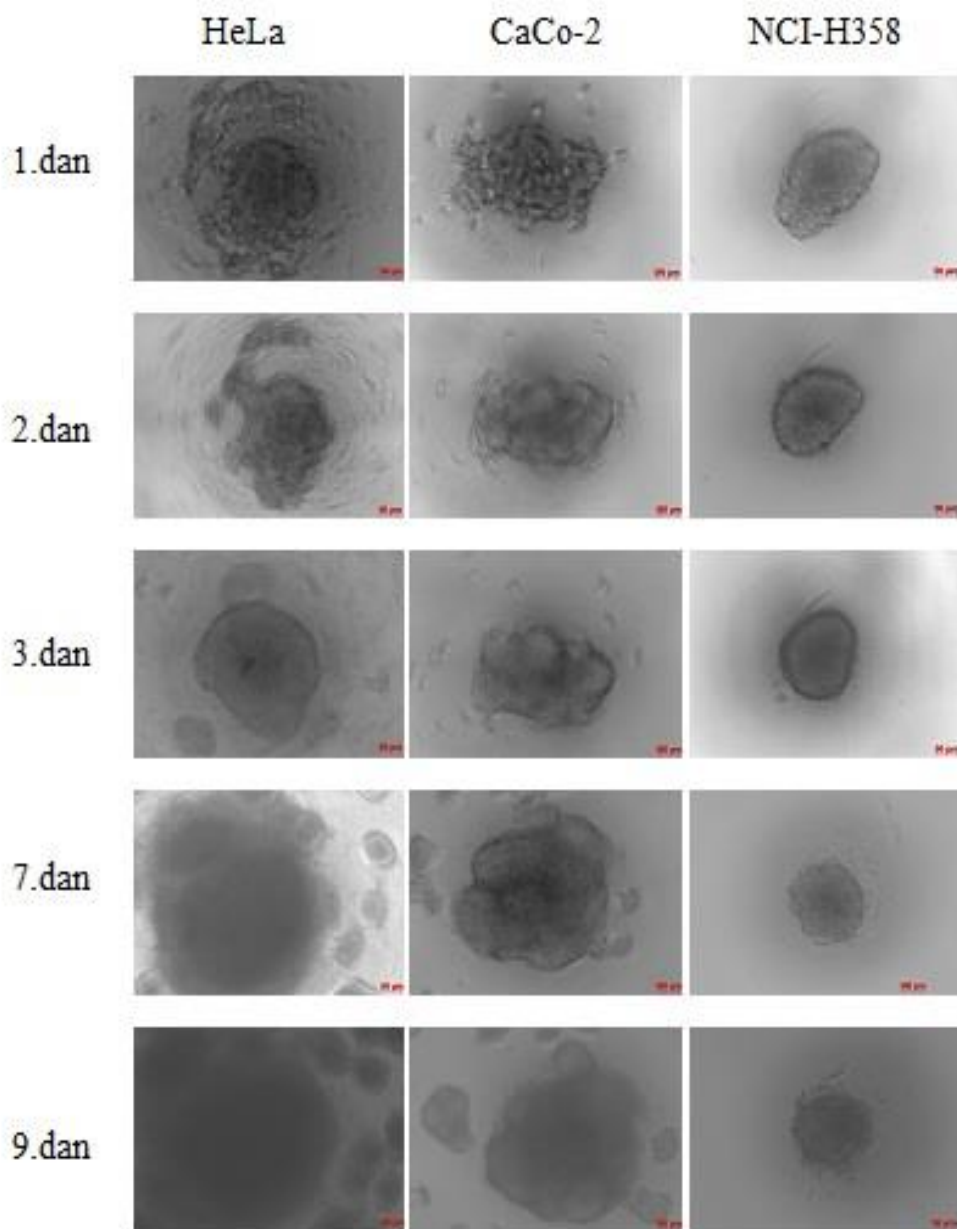
Uzgojem staničnih sferoida metodom viseće kapljice, uočeno je spontano agregiranje stanica u nepravilne nakupine već prvi dan kultivacije. Unutar takvih ranih sferoida mogu se vidjeti pojedinačne stanice. Drugi i treći dan uzgoja, stanične linije HeLa i NCI-H358 poprimaju okrugle stanične forme, za razliku od CaCo-2 stanica koje i dalje rastu nakupljene u nepravilnom obliku. Sedmog dana sferoid od CaCo-2 stanica također poprima pravilan okrugli oblik. Zadnji dan promatranja razvoja sferoida, vidljivo je da su stanice HeLa i CaCo-2 linije stvorile podjednako velike sferoide unutar kapljice, dok NCI-H358 stanice najsporije rastu, tako tvoreći najmanje sferoide (slika 7.).





**Slika 7. Formiranje sferoida metodom viseće kapljice.** Sferoidi su slikani pod povećanjem od 20x na mikroskopu (Zeiss, AxioVision, Njemačka). Skala predstavlja 50  $\mu\text{m}$ .

U idućoj metodi, u kojoj smo stanice uzgojili u jažicama s konusnim dnom, dobili smo podjednake rezultate što se tiče brzine rasta pojedinih staničnih linija te veličine sferoida koje formiraju. HeLa i CaCo-2 stanice u prvim danima formiraju nepravilne nakupine stanica koje iza trećeg dana kultiviranja poprimaju pravilniji i okrugli oblik. Za razliku od njih, NCI-H358 stanice od prvog dana u kulturi rastu kompaktno u pravilnom okruglom obliku te zadržavaju takvu formaciju tijekom cijelog perioda kultiviranja. Nakon sedmog dana na HeLa stanicama vidljiva je djelomična degradacija sfere koja se pojačava u produženom periodu kultivacije. Desetog je dana isto prisutno i kod sferoida od CaCo-2 stanica, ali u manjoj mjeri (slika 8.).

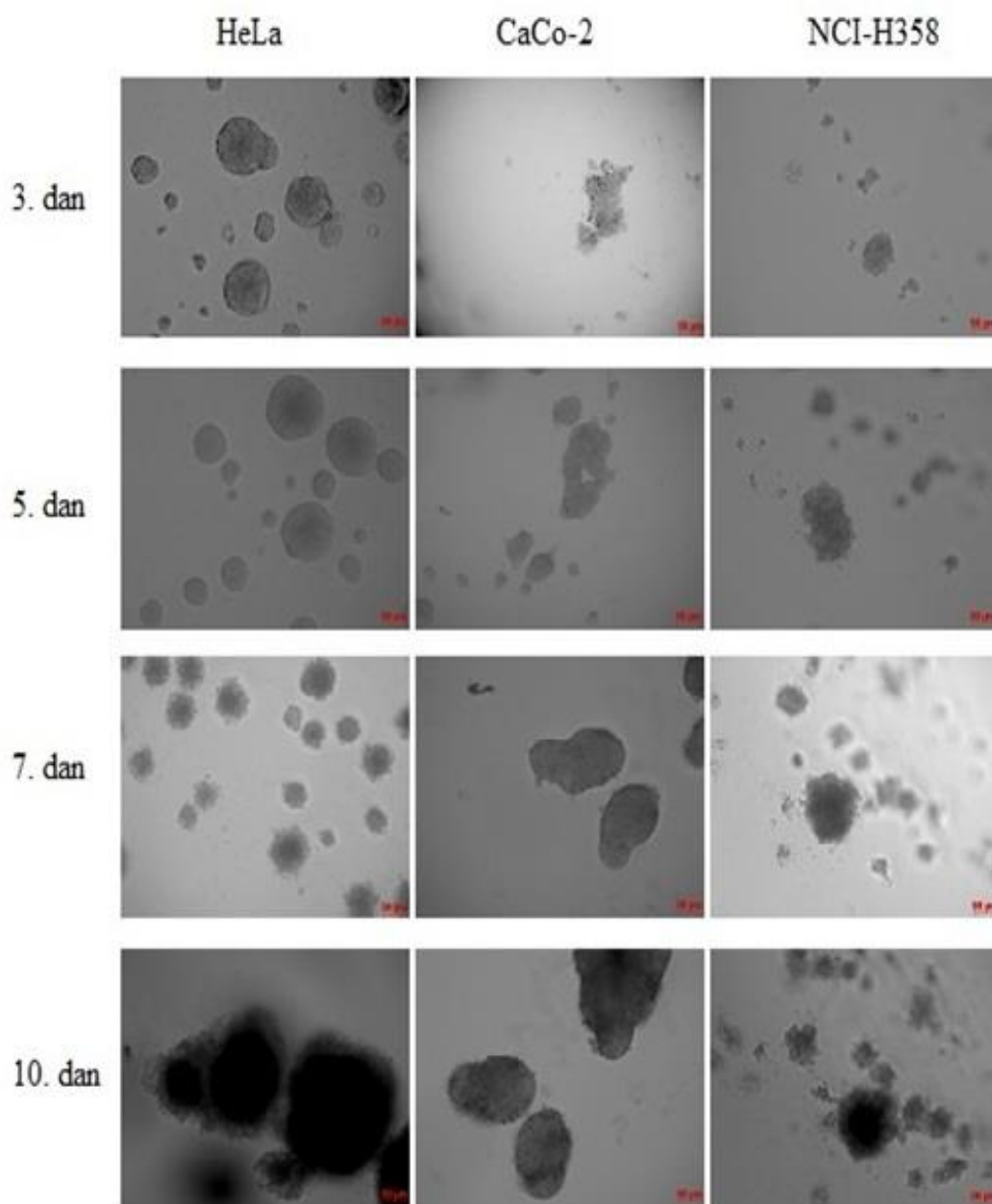


**Slika 8. Formiranje sferoida u slaboprianjajućim jažicama kosnusnog dna.** Sferoidi su slikani pod povećanjem od 10x na mikroskopu (Zeiss, AxioVision, Njemačka). Skala predstavlja 50  $\mu\text{m}$ .

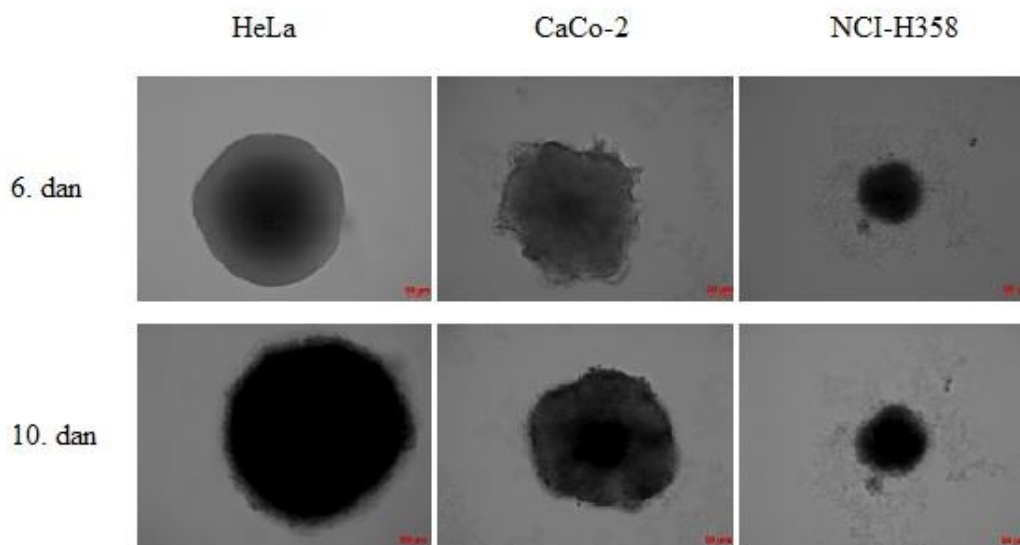
U trećoj smo metodi pratili rast sferoida na podlozi od gela s različitim postotkom agaroze te unutar gela. Stanice su pokazale jednak rast na podlozi od gela bez obzira na postotak agaroze. Primijećeno je da su stanice u pojedinim jažicama stvarale više manjih sfera (slika 9.) ili jedan samostalni sferoid (slika 10.). Stanice HeLa i NCI-H358 kao i u ostalim metodama veoma brzo formiraju pravilne i okrugle sferoide (unutar tri dana), dok sferoidi CaCo-2 stanica tek poslije petog dana poprimaju pravilnu sferoidnu strukturu.

Promatranjem pojedinačnih sferoida vidljivo je da HeLa stanice stvaraju velike okrugle sferoide ravne i glatke površine, CaCo-2 tvori sferoide nepravilnijih rubova te NCI-H358 volumenom male sferoide u usporedbi s ostalim promatranim staničnim linijama.

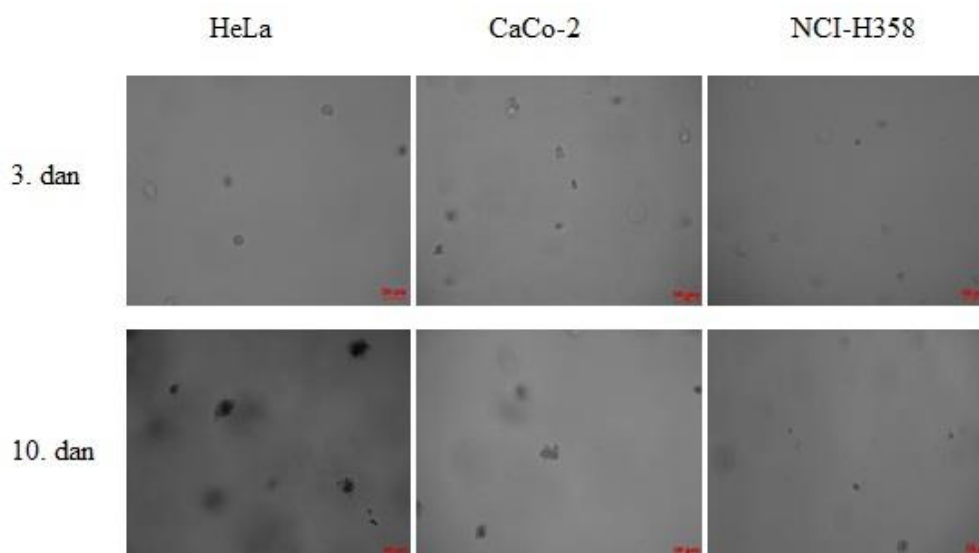
Stanične linije nasadene unutar gela formirale su više sfera unutar jažica koje su mnogo manje od onih raslih na podlozi od gela (slika 11.).



**Slika 9.** Formiranje više sfera na 0,7% gelu od agaroze. Slikano pod povećanjem od 10x na mikroskopu (Zeiss, AxioVision, Njemačka). Skala predstavlja 50 μm.



**Slika 10. Formiranje pojedinačnih sferoida na 0,7% gelu od agaroze.** Slikano pod povećanjem od 10x na mikroskopu (Zeiss, AxioVision, Njemačka). Skala predstavlja 50  $\mu\text{m}$ .



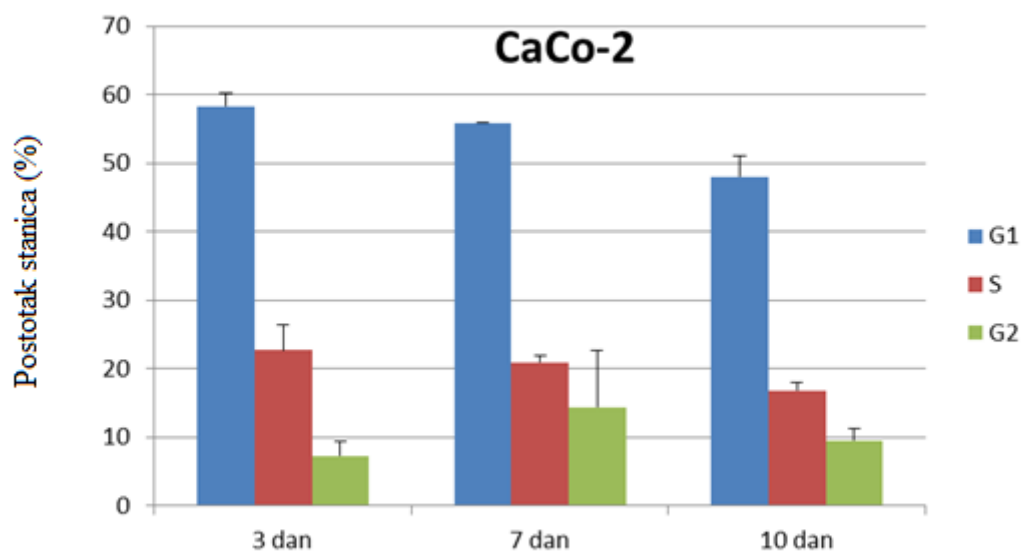
**Slika 11. Formiranje sferoida unutar gela.** Slikano pod povećanjem od 10x na mikroskopu (Zeiss, AxioVision, Njemačka). Skala predstavlja 50  $\mu\text{m}$

### 4.3. Stanični ciklus

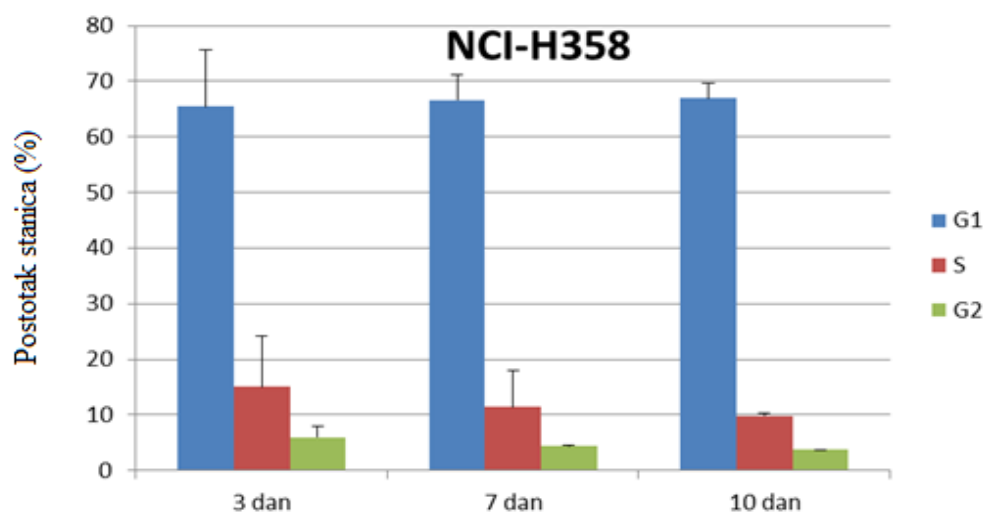
Stanični ciklus ispitan je na staničnim linijama CaCo-2 i NCI-H358 uzgojenih u 3D kulturi metodom plutajućih stanica u starosti od tri, sedam i deset dana. Analizirane stanice obojene su PI bojom koja fluorescira kada se veže za DNA, tako da je količina fluorescencije proporcionalna količini DNA. Na osnovi fluorescentnog signala stanice su podijeljene u 3 faze: G1, S i G2/M. Prvi pik na histogramu označava G1 fazu ciklusa, u kojoj je količina DNA normalna ( $2n$ ). Drugi pik označava G2/M fazu u kojoj stanice imaju dvostruki sadržaj DNA ( $4n$ ). U S fazi staničnog ciklusa količina DNA varira.

Analizom staničnog ciklusa uočeno je da se CaCo-2 stanice starosti od tri, sedam i deset dana najvećim udjelom nalaze u G1 fazi (58,3%, 55,9%, 48,05%). Također se i najveći udio NCI-H358 stanica nalazi unutar G1 faze ciklusa (65,5%, 66,6%, 66,9%). Distribucija stanica tijekom inkubacije ne mijenja se značajno. Histogrami prikazuju udio CaCo-2 i NCI-H358 stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa (slika 12. i 13.).

Turkey i Bonferroni test koji rade međusobnu usporedbu pojedinog staničnog ciklusa, u različitim su vremenskim intervalima pokazali da ne postoji statistička značajnost među fazama pojedinačnih staničnih ciklusa u različito vrijeme kako su se sferoidi formirali (slika 14. i 15.).

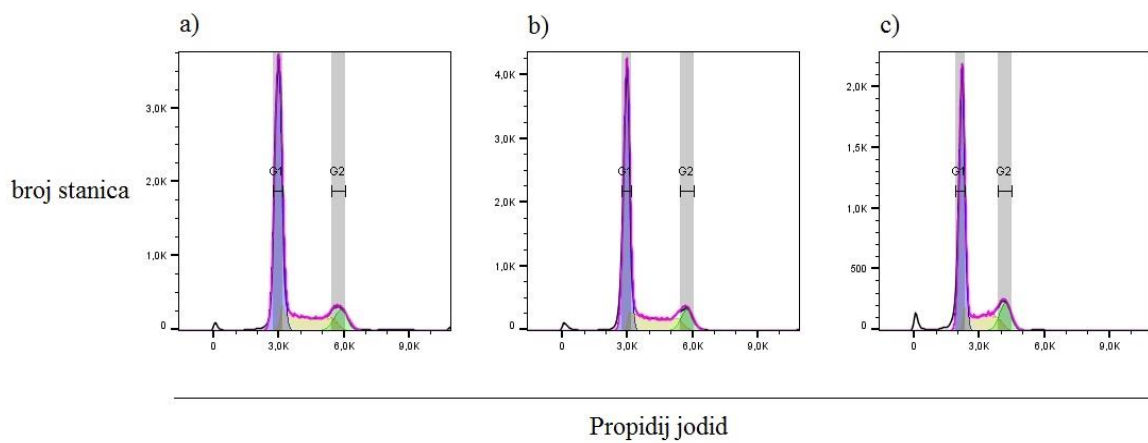


Slika 12. Grafički prikaz 3D CaCo-2 kulture stanica u fazama staničnog ciklusa

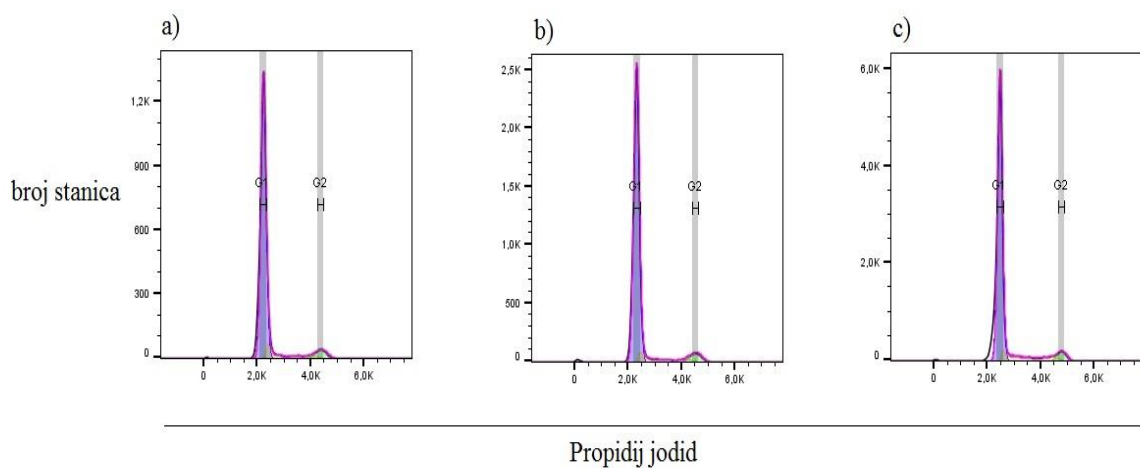


Slika 13. Grafički prikaz 3D NCI-H358 kulture stanica u fazama staničnog ciklusa





**Slika 14. Stanični ciklus 3D CaCo-2 stanica.** CaCo-2 stanice uzgojene bez nosača u pločama s konusnim dnom tijekom a) 3 dana, b) 7 dana i c) 10 dana.



**Slika 15. Stanični ciklus 3D NCI-H358 stanica.** NCI-H358 stanice uzgojene bez nosača u pločama s konusnim dnom tijekom a) 3 dana, b) 7 dana i c) 10 dana.

## 5. RASPRAVA

Kultura stanica nezaobilazna je tehnika u različitim granama biomedicinskih istraživanja koja je izvrstan model za proučavanje fiziologije i biokemije stanica, karcinogeneze i mutageneze te za ispitivanje utjecaja lijekova. Od početka korištenja kulture eukariotskih stanica u rutinske svrhe, podloge su građene od polistirena ili stakla u dvodimenzionalnom (2D) obliku. Kulture stanica značajne su upravo u probirnim istraživanjima gdje se tako smanjuje upotreba animalnih modela. Međutim, zbog raznih nedostataka koje rast stanica u monosloju pokazuje, znanstvenici su tijekom godina razvijali nove metode uzgoja stanica koje bi vjernije oponašale uvjete rasta normalnog i tumorskog tkiva *in vivo*. Tako su nastale trodimenzionalne (3D) kulture. Cilj ovakvih kultura jest premostiti jaz između uporabe životinjskih organizama s jedne strane i uporabe staničnih monoslojeva s druge (8).

Stanični sferoidi zbog svoje su jednostavnosti najčešći modeli trodimenzionalne kulture. Široko se koriste u istraživanjima u području onkologije zbog svojih histoloških i fizioloških značajka koje su slične onima solidnih tumora u tijelu. Kinetika rasta volumena i prostorna varijacija bolje su reproducirane u 3D nego u 2D kulturi (14). Danas su razvijene mnoge tehnike za uspostavljanje sferoidnih 3D kultura u kojima stanice rastu agregiranjem u neadherentnim uvjetima rastu uz pomoć nosača ili su ugrađene u gel (15).

U ovom radu proučavan je razvoj sferoida uzgojenih trima različitim tehnikama, kao i njihov razvoj u dvodimenzionalnom obliku. U našem istraživanju svakodnevim praćenjem poraslih kultura, kako u 2D tako i u 3D kulturi, utvrđeno je da HeLa stanična linija pokazuje najbržu kinetiku rasta. Njene stanice prve su prerasle površinu rastući u monosloju, dostigle su konfluentnost, počele se odljepljivati te zbog najbržeg trošenja hranjivih tvari iz medija, prve počele odumirati. CaCo-2 i NCI-H358 stanične linije rastu sporije te imaju vidljivu tendenciju rasta stanica u nakupinama (klasterima), što je kasnije vidljivo u 3D prikazu stvaranja sferoidnih oblika. Stanične linije, uzgojene trima različitim 3D metodama koje smo koristili, daju morfološki slične sferoide. Sve su linije pokazale tendenciju agregacije stanica i stvaranju okruglih oblika.

Što se tiče uzgoja sferoida na podlozi od gela, ovisno kako se gel polimerizirao u jažici tako su se i formirali sferoidi. Odnosno, tamo gdje se gel ravnomjerno rasporedio i

polimerizirao dobili smo pravilno formirane sferoide, a tamo gdje se gel neravnomjerno rasporedio dobili smo više manjih sfera. Također vidljiv je nedostatak kultiviranja sferoida unutar gela gdje je otežana vizualizacija i preglednost sferoida.

Analizom staničnog ciklusa uočeno je da se CaCo-2 stanice starosti od tri, sedam i deset dana najvećim udjelom nalaze u G1 fazi. Također se i najveći udio NCI-H358 stanica nalazi unutar G1 faze ciklusa. Distribucija stanica sferoida tijekom vremenskog perioda nije se značajno mijenjala unutar faza staničnog ciklusa. Veći udio stanica unutar G0/G1 faze sugerira da je u sferoidima prisutno više stanica u fazi mirovanja, dok manji udio stanica u S i G2/M fazi govori da stanice unutar sferoida proliferiraju sporije. Ova obilježja rasta sferoida mogu biti rezultat njihove prostorne organizacije, heterogene građe te dostupnosti hranjivih tvari stanicama koje se nalaze unutar sferoida.

Da su trodimenzionalni stanični sferoidi pogodniji modeli za onkološka i terapijska istraživanja od stanica u monosloju, dokazano je u mnogim istraživanjima u kojima je utvrđeno da su uzgojeni stanični sferoidi rezistentniji na citotoksičnu terapiju. To se objašnjava postojanjem interakcija između stanica i visokog tlaka intersticijske tekućine koja daje fizičku barijeru, a čime je otežana difuzija lijekova u stanice. S obzirom na to da stanice u 2D kulturi ne posjeduju takve interakcije koje su prisutne u *in vivo* tumorima, rezultati ispitivanja djelotvornosti tumorske terapije realniji su na 3D staničnim modelima (17).

Dulje je vrijeme dominirala 2D kultura u ispitivanjima *in vitro*, ali jasno je da su se istraživanja usmjerila kulturama stanica u 3D obliku s realnijim biokemijskim i biomehaničkim obilježjima (12). Zbog još uvijek prisutnih određenih ograničenja metoda 3D kulture koja ne uspijevaju dati relevantne, validirane i standardizirane stanične modele (16), sada se u istraživanjima kombiniraju klasične 2D kulture kao temeljni stanični model koji se nadopunjuje 3D kulturom.

## 6. ZAKLJUČAK

- Primjenom različitih metoda uzgoja staničnih sferoida ne postoji velika razlika u morfologiji pojedinih staničnih linija; svim metodama dobili smo okrugle sferoidne strukture.
- Najpravičnije sferoide dobili smo metodom viseće kapljice.
- Rast sferoida na podlozi od gela značajno ovisi o načinu rasporeda gela unutar jažice; što se pravičnije gel rasporedi dobit će se pravičniji sferoidi.
- Stanice unutar sferoida najvećim se dijelom nalaze u G1 fazi staničnog ciklusa; distribucija stanica tijekom inkubacije ne mijenja se značajno.

## 7. SAŽETAK

**Uvod:** Trodimenzionalni stanični sferoidi uzgojeni u *in vivo* uvjetima pokazuju složenu arhitektonsku strukturu, dinamičke interakcije među stanicama kao i visoki potencijal oponašanja složene trodimenzionalne organizacije tkiva *in vivo*. Stanični sferoidi predstavljaju moćno sredstvo za sužavanje jaza između *in vitro* i *in vivo* modela. Različitim uzgojnim tehnikama moguće je uzgojiti stanične sferoide, koje u ovisnosti o staničnoj liniji i potrebama istraživanja, daju različitu formaciju sferoida.

**Cilj istraživanja:** Cilj rada je proučiti moguće morfološke razlike među staničnim sferoidima uzgojenih različitim uzgojnim metodama.

**Materijali i metode:** Stanične linije HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 nasadili smo u 2D i 3D obliku koristeći tri različite metode: metodu viseće kapljice, metodu plutajućih stanica, uzgoj stanica na podlozi od agaroznog gela te uzgoj stanica u gelu. Primjenom svjetlosnog mikroskopa pratili smo i slikali formiranje sferoida unutar deset dana. Protočnom citrometrijom analizirali smo stanični ciklus poraslih stanica.

**Rezultati:** Najbrži rast u svim metodama pokazala je HeLa stanična linija, dok najsporiji NCI-H358. Metodom viseće kapi formirali su se najpravilniji sferoidi kod svih staničnih linija. Analiza staničnog ciklusa pokazala je da se najveći udio stanica nalazi unutar G1 faze.

**Zaključak:** Primjenom različitih metoda uzgoja staničnih sferoida ne postoji velika razlika u morfologiji pojedinih staničnih linija; svim metodama dobili smo okrugle sferoidne strukture. Najpravilnije sferoide dobili smo metodom viseće kapljice. Distribucija stanica unutar staničnog ciklusa tijekom inkubacije ne mijenja se značajno, najveći udio stanica je u G1 fazi.

**Ključne riječi:** 3D kultura stanica, metode kultura stanica, stanični sferoidi

## 8. SUMMARY

### **Modeling of cell spheroids by different breeding methods *in vitro***

**Introduction:** Three-dimensional cell spheroids bred under *in vivo* conditions exhibit a complex architectural structure, dynamic cell interactions as well as a high potential of mimicking complex three-dimensional tissue organization *in vivo*. Cellular spheroids are powerful means of narrowing the gap between *in vitro* and *in vivo* models. It is possible to grow cellular spheroids with different breeding techniques which, depending on the cell line and research needs, give a different spheroid formation.

**Research objectives:** The aim was to study possible morphological differences between cellular spheroids cultivated by different breeding methods.

**Materials and methods:** . We planted the HeLa, CaCo-2, and NCI-H358 cell lines in 2D and 3D formats using three different methods - the hanging drop method, the forced floating method and the gel cell cultivation. We monitored and imaged spheroid formation within ten days using a light microscope. We used flow cytometry to analyse the cell cycle of grown cells.

**Results:** HeLa cell line showed the fastest growth in all three methods, while the slowest was the NCI-H358. The most proper spheroids were formed in all cell lines using the hanging drop method. The cell cycle analysis showed that the largest proportion of cells lies within the G1 phase.

**Conclusion:** By applying different methods of breeding cell spheroids there is no major difference in the morphology of the individual cell lines; all methods yielded round spheroidal structures. However, the most proper spheroids were obtained by the hanging drop method. The distribution of cells within the cell cycle during the incubation does not change significantly; the largest proportion of cells is in the G1 phase.

**Keywords:** 3D cell culture, cell culture techniques, cell spheroids

## 9. LITERATURA

1. Cell culture basics handbook. 2016. Dostupno na adresi:  
<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/CellCultureandTransfection/pdfs/Gibco-Cell-Culture-Basics-Handbook-Global.pdf>. Datum pristupa 26.6.2019.
2. Freshny RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. New York, 5. izd. Alan R. Liss Inc., 2005.
3. Cooper GM, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
4. Butler M. Animal Cell Culture and Technology. 2. izd. New York: Taylor & Francis; 2005.
5. Duval K, i sur. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)* 2017; 32(4): 266 – 277.
6. Kapałczyńska M, i sur. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci.* 2018; 14(4): 910 – 919.
7. Koledova Z. 3D Cell Culture: An Introduction. *Methods Mol Biol.* 2017; 1612: 1 - 11.
8. Haycock JW. 3D Cell Culture: a review of current approaches and techniques. *Methods Mol Biol.* 2011; 695: 1 - 15.
9. 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.
10. Breslin S, O’Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today Technol.* 2013; 18: 240 - 249.
11. Pandey A. Biological and synthetic scaffold: An extra cellular matrix for constructive tissue engineering. *International Journal of Medical Research & Review.* 2016; 4: 1882 - 1896.
12. Hoarau-Véhot J, Rafii A, Touboul C, and Pasquier J. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions?. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(1): 181.
13. Gaurina Srček V, Radošević K, Jukić S, Slivac I. Bioreaktori za uzgoj kultura životinjskih stanica. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i*

---

nutricionizam.2016 (pristupljeno 15.7.2019.); 11 (1 - 2): 18 - 27. Dostupno na:  
<https://hrcak.srce.hr/166768>

14. 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.
15. Cezars Z, Tamama K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2016; 2016: 9176357
16. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol.* 2013; 31(2): 108 - 115.
17. Gong X, Lin C, Cheng J, Su J, Zhao H, Liu T, Wen X, Zhao P. Generation of Multicellular Tumor Spheroids with Microwell-Based Agarose Scaffolds for Drug Testing. *PLoS One.* 2015 Jun 19; 10(6): e0130348.



## 10. ŽIVOTOPIS

Ivana Janić rođena je 15.6.1997. godine u Zagrebu. Nakon završenog osnovnog obrazovanja u OŠ Antun Nemčić Gostovinski, godine 2012. upisuje smjer Opće gimnazije Fran Galović u Koprivnici. Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike upisuje 2016. godine na Medicinskom fakultetu u Osijeku.