

Zadržavanje magnetskih čestica u sferoidima glioblastoma

Imeri, Aida

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:945228>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

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



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

Aida Imeri

**ZADRŽAVANJE MAGNETSKIH
ČESTICA U SFEROIDIMA
GLIOBLASTOMA**

Završni rad

Osijek, 2022.

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

Aida Imeri

**ZADRŽAVANJE MAGNETSKIH
ČESTICA U SFEROIDIMA
GLIOBLASTOMA**

Završni rad

Osijek, 2022.

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

Mentor rada: doc. dr. sc. Barbara Vilječić

Rad ima 26 listova, 4 tablice i 4 slike.

Zahvale

Ponajprije zahvaljujem mojoj mentorici doc. dr. sc. Barbari Viljetić na predloženoj temi te odličnom mentorstvu i pristupačnosti.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Teuti Opačak-Bernardi te ostalima u Laboratoriju za stanične kulture na pomoći oko kultivacije stanica te pristupačnosti tijekom pisanja samog rada.

Zahvaljujem svojim najbližim ljudima, obitelji i prijateljima na izuzetnoj podršci i pomoći oko svega. Posebno hvala mom I. na najvećoj podršci i mojoj M. na zajedničkom radu kroz sve ove 3 godine.

SADRŽAJ

| | |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Glioblastom | 1 |
| 1.2. Kultura stanica | 2 |
| 1.2.1. 2D kultura stanica..... | 2 |
| 1.2.2. 3D kultura stanica..... | 3 |
| 1.3. Sferoidi | 4 |
| 1.3.1. Sferoidi u onkologiji..... | 5 |
| 1.3.2. Metode formiranja sferoida | 5 |
| 1.3.2.1. Metoda viseće kapljice..... | 5 |
| 1.3.2.2. Metoda neadherentne kulture..... | 6 |
| 1.3.2.3. Metoda magnetske levitacije..... | 6 |
| 2. CILJEVI..... | 8 |
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 9 |
| 3.1. Ustroj studije..... | 9 |
| 3.2. Materijali | 9 |
| 3.2.1. Stanične linije | 9 |
| 3.2.2. Kemikalije | 9 |
| 3.3. Metode | 10 |
| 3.3.1. Kultivacija i održavanje stanica <i>in vitro</i> | 10 |
| 3.3.2. Određivanje vijabilnosti stanica u kulturi | 11 |
| 3.3.3. Formiranje sferoida metodom magnetske levitacije | 11 |
| 3.3.4. Rezanje sferoida na kriostatu | 12 |
| 3.3.5. Bojenje sferoida..... | 12 |
| 3.3.6. Mikroskopiranje i slikanje preparata | 13 |
| 3.4. Statističke metode..... | 13 |
| 4. REZULTATI..... | 15 |

| | |
|-------------------------------------------------|-----------|
| 4.1. Određivanje broja magnetskih čestica | 15 |
| 5. RASPRAVA..... | 18 |
| 6. ZAKLJUČAK | 20 |
| 7. SAŽETAK | 21 |
| 8. SUMMARY | 22 |
| 9. LITERATURA..... | 23 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 26 |

POPIS KRATICA

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

CT - temperatura komore (eng. *chamber temperature*)

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

D54 - stanična linija glioblastoma (eng. *glioblastoma cell line*)

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

OT - temperatura objekta (eng. *object temperature*)

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

1. UVOD

Tumori su jedna od najzastupljenijih bolesti novog doba te kao takvi, vodeći su uzrok smrti u svijetu. Brojnim svojstvima kao što su nepostojanje dodirne inhibicije, smanjena potreba za faktorima rasta, angiogeneza i dr. imaju mogućnost proliferacije. U mnogim tumorima poremećena je i diferencijacija stoga oni mogu kontinuirano proliferirati *in vivo*. Također, imaju mogućnost izbjegavanja apoptoze što dodatno utječe na njihovo preživljavanje (1). Sva ova svojstva, uključujući i brojna druga, otežavaju liječenje samih tumora. Kako bi se pronašla što učinkovitija terapija te liječenje bilo što uspješnije, koriste se i kulture stanica.

1.1. Glioblastom

Glioblastom je najagresivniji i najčešći primarni maligni tumor mozga u odraslih (2). Čini 45,2% malignih primarnih tumora mozga i CNS-a, 54% svih glioma i 16% svih primarnih tumora mozga i CNS-a. Prosječna stopa pojavnosti u SAD-u je 3,19/100 000 stanovnika, a srednja dob dijagnoze je 64 godine. Pojavnost glioblastoma veća je kod muškaraca i pojedinaca bijele rase (3). Čimbenici rizika za nastanak glioblastoma su razni. Genetička predispozicija, terapijsko zračenje te brojni imunološki čimbenici smatraju se čestim uzročnicima glioblastoma (3). Glioblastom ima tešku kliničku sliku te je liječenje ove bolesti vrlo kompleksno. Najčešće se primjenjuje kirurški postupak nakon čega slijedi radioterapija te istodobna primjena temozolomidne kemoterapije narednih 6 mjeseci (3). Temozolomid je citotoksični lijek koji funkcionira na način da inhibira replikaciju DNA metilacijom nukleotidnih baza (4). Unatoč liječenju, stopa preživljenja je vrlo niska. Kod bolesnika kod kojih se primijenio samo kirurški postupak, srednja stopa preživljenja je 20 tjedana, kod bolesnika koji nakon operacije primaju i zračenje, 36 tjedana, a kod bolesnika koji su dodatno tretirani novijim biokemoterapijama kao što su temozolomid i bevacizumab, više od 14 mjeseci (5). Tijekom svog razvoja, glioblastom privlači i integrira i netumorske stanice koje štite stanice tumora od imunološkog odgovora i terapije. Također, otpušta i brojne imunomodulirajuće čimbenike te na taj način izbjegava imunološki odgovor organizma (6). Zbog toga kao i zbog brojnih drugih svojstava samih tumorskih stanica, glioblastom postaje otporan na kemoterapije, a liječenje neučinkovito. Cilj brojnih istraživačkih centara u novije doba jest pronaći što učinkovitiji lijek za liječenje

glioblastoma. U tu svrhu, između ostalih metoda koriste se i kulture stanica kako bi se proučile interakcije stanica u glioblastomu te pronašla učinkovita terapija.

1.2. Kultura stanica

Kultura stanica je često korištena *in vitro* metoda u molekularnom i biokemijskom istraživanju tumora. Mnoge tehnike koje su omogućile rast stanica izvan živog organizma proučavane su tijekom 20. stoljeća (7). Svrha toga bila je poboljšati razumijevanje stanične biologije, morfologije tkiva i mehanizma bolesti te pronaći lijek koji će biti učinkovit (8). Otkrivene su brojne stanične linije na kojima su proučavana svojstva stanica i njihove interakcije. Prva otkrivena takva stanična linija bila je HeLa stanična linija tumora koja je omogućila naprednije istraživanje stanica tumora (7).

U novije doba za istraživanje se koriste dvodimenzionalne (2D) kulture stanica kao temeljni stanični model, zatim se nadopunjava trodimenzionalnom (3D) kulturom stanica koja točnije predstavlja stvarno mikrookruženje u kojem se stanice nalaze u tkivima (8), a i znatno su sličnije tumorima što je velika prednost za njihova proučavanja.

1.2.1. 2D kultura stanica

Većina istraživanja u biologiji tumora izvedena je iz eksperimenata provedenih na dvodimenzionalnim (2D) kulturama stanica *in vitro*. U ovim kulturama stanice rastu kao monosloj na krutim materijalima kao što su polistiren i staklo, najčešće u ravnoj Petrijevoj zdjelici, pričvršćene na plastičnu ili staklenu površinu. Prednosti ove metode su jednostavnost i jeftino održavanje stanične kulture. Međutim, 2D kulture imaju brojne nedostatke jer su uzgojene u pojednostavljenim i nerealnim uvjetima, pa ne odražavaju u potpunosti stvarnu fiziologiju tkiva. Zbog toga, dolazi do promjene mikrookoline, odnosno poremećaja interakcija između stanične i izvanstanične okoline, načina stanične diobe, promjena u samoj morfologiji stanica, polarnosti, mehaničkih i biokemijskih signala te komunikaciji između stanica. Također, stanice u monosloju imaju neograničen pristup sastojcima medija kao što su kisik, hranjive tvari

i metaboliti što predstavlja još jedan nedostatak ovakve kulture stanica. Ovi nedostaci doveli su do stvaranja 3D modela koji su više sposobni oponašati uvjete *in vivo* (9,10).

1.2.2. 3D kultura stanica

Napretkom tehnologije proizvodnje, obrade i kemije materijala, počele su se sve više koristiti 3D stanične kulture (11). Jednu od prvih trodimenzionalnih kultura napravili su Hamburg i Salmon 1970-ih u otopini mekog agara (9). Nakon toga, ove stanične kulture stekle su sve veći interes za korištenjem, posebice u svrhu otkrivanja lijekova i inženjering tkiva. Upravo je dodatna dimenzionalnost 3D kultura ključna značajka koja utječe na prostornu organizaciju samih stanica i stvara među njima fizička ograničenja. Ova prostorna i fizička svojstva utječu na prijenos signala među stanicama, ekspresiju gena te u konačnici ponašanje stanica. Različite stanične linije tumora uzgojene u 2D i 3D kulturi često pokazuju različite profile ekspresije gena, posebice onih koji sudjeluju u proliferaciji, migraciji, invaziji i angiogenezi. Stoga, stanice uzgajane u 3D kulturama preciznije imitiraju uvjete *in vivo* od 2D kultura stanica (8) (Tablica 1).

Upravo zbog svojih brojnih prednosti, u posljednjih nekoliko godina došlo je do povećanog korištenja 3D kultura stanica u otkrivanju lijekova, biologiji stanice raka, proučavanju matičnih stanica, stvaranju funkcionalnih tkiva za implantaciju i dr. Kako bi se metoda poboljšala, razvijene su različite tehnike i sustavi 3D kultura (8).

Tablica 1. Usporedba 2D i 3D stanične kulture (prilagođeno prema shematskom prikazu iz reference 9.)

| Vrsta kulture | 2D | 3D |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Vrijeme potrebno za nastanak kulture | Nekoliko minuta do nekoliko sati | Od nekoliko sati do nekoliko dana |
| Kvaliteta kulture | Dobre performanse, ponovljivost, laka interpretacija, jednostavnost održavanja kulture | Lošije performanse i ponovljivost, teška interpretacija, kulture teže za održavanje |
| <i>In vivo</i> imitacija | Ne oponaša prirodnu strukturu tkiva ili tumorske mase | Oponaša prirodnu strukturu tkiva ili tumorske mase |
| Interakcije stanica | Loše interakcije stanica-stanica i stanica-izvanstanično okruženje, mikrookoliš nije kao <i>in vivo</i> | Stvaraju se pravilne interakcije stanica-stanica i stanica-izvanstanično okruženje |
| Karakteristike stanica | Promijenjena morfologija i način diobe; gubitak raznolikog fenotipa i polariteta | Očuvana morfologija i način diobe, raznolik fenotip i polaritet |
| Pristup esencijalnim spojevima | Neograničen pristup kisiku, hranjivim tvarima, metabolitima i signalnim molekulama (za razliku od <i>in vivo</i>) | Promjenjiv pristup kisiku, hranjivim tvarima, metabolitima i signalnim molekulama (kao i <i>in vivo</i>) |
| Molekularni mehanizmi | Promjene u ekspresiji gena, mRNA i biokemiji stanica | Ekspresija gena i biokemija stanica kao <i>in vivo</i> |
| Trošak održavanja kulture | Jeftini, komercijalno dostupni testovi i mediji | Skuplji, dugotrajniji, manje komercijalno dostupni testovi |

1.3. Sferoidi

Koncept stvaranja 3D kultura stanica temelji se na jednostavnom formiranju sferoidnih struktura koji imaju mogućnost samoorganiziranja (9). Formiranje sferoida temelji se na agregiranju stanica te su zbog tog stanice unutar sferoida u bliskom kontaktu čime se postiže njihov međusobni fizički kontakt i stanična signalizacija. To je omogućilo proučavanje temeljnih biokemijskih i biomehaničkih signala zbog dobro dizajniranog mikrookruženja koji

oponaša slične uvjete kao što su *in vivo*. Na primjer, stanice na površini agregiranih sferoida, imaju najviše razine proliferacije, dok unutrašnjost 3D staničnih tijela ima najveći broj mirujućih ili nekrotičnih stanica (12). Upravo zbog svojih sličnosti s *in vivo* modelom, sferoidi su često korišteni na području onkologije, biologije matičnih stanica i tkivnog inženjerstva (13).

1.3.1. Sferoidi u onkologiji

Kultura sferoida učestalo se koristi u području onkologije (13). Za razliku od 2D kulture stanice koja sadržava monosloj, heterogena arhitektura sferoida više nalikuje tumorima *in vivo*. Analogno tumorima, u sferoidima postoje interakcije stanica-stanica i stanica-ekstracelularni matriks što utječe na samu funkciju i strukturu tkiva (14). Također, kinetika prostornog i volumnog rasta bolje se reproducira u 3D nego u 2D kulturi (13). Stoga su sferoidi precizniji model u istraživanju lijekova za liječenje tumora nego 2D kulture stanica (14). Osim za istraživanje lijekova, oni se koristi za praćenje terapije, procjenu učinkovitosti terapije te praćenje biologije samog tumora (13).

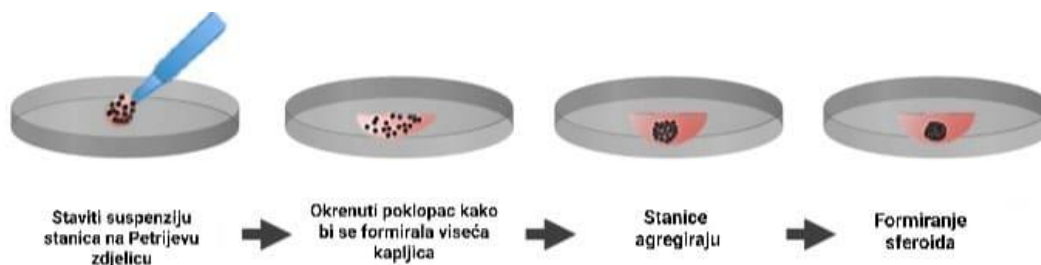
1.3.2. Metode formiranja sferoida

Za formiranje sferoida koriste se sljedeće metode: metoda viseće kapljice, neadherentne kulture te metoda magnetske levitacije. U ovom istraživanju koristila se metoda magnetske levitacije.

1.3.2.1. Metoda viseće kapljice

Metoda viseće kapljice prilično je jednostavna i pouzdana metoda (10) (Slika 1). Može se izvesti pomoću posebno dizajniranih ploča ili Petrijeve zdjelice (15). Izvodi se tako da se kapi stanične suspenzije stavljaju na donju stranu poklopca Petrijeve zdjelice gdje one, zbog

površinske napetosti, vise. Zatim se poklopac stavlja na Petrijevu zdjelicu koja sadrži PBS kako bi se spriječila dehidracija (10). Zahvaljujući gravitaciji, stanice se akumuliraju na vrhu kapi te se spontano vežu jedna na drugu i tvore sferoide (13). Glavne prednosti ove metode su jednostavnost, stvaranje sferoida ujednačene veličine, potreban je mali broj stanica te se stanice mogu održavati u kulturi nekoliko tjedana što je korisno kod složenih eksperimenata (10).



Slika 1. Metoda viseće kapljice (prilagođeno prema shematskom prikazu iz reference 10.)

1.3.2.2. Metoda neadherentne kulture

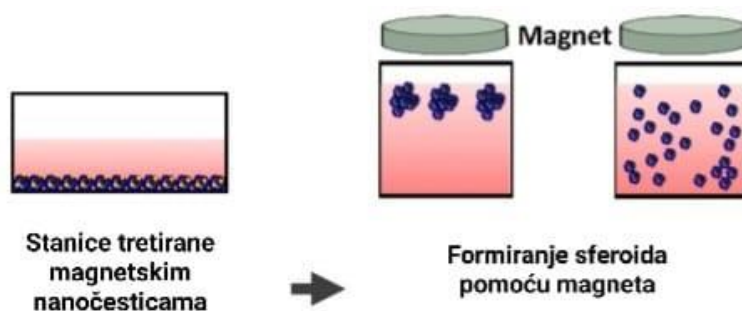
Ova metoda uključuje agregaciju stanica u neadherentim uvjetima u kojima nema dodanih susprata koji će poticati stvaranje staničnih veza, poput proteina ekstracelularnog matriksa (16). Izvodi se u pločama niske adhezivnosti s U ili V oblikom dna ili na površinama obloženim na primjer s poli-hidroksietil metakrilatom (poli-HEMA) ili agarozom (15). Također, postoje komercijalno obložene ploče s neutralno nabijenom površinom dna koje sprječavaju prijanjanje stanica na površinu te potiču stvaranje sferoida (10).

1.3.2.3. Metoda magnetske levitacije

Jedna od najnovijih metoda za formiranje sferoida je metoda magnetske levitacije (15) (Slika 2). Ovu metodu je prvi put 2010. godine koristio Souza sa sur. (10). Ova metoda uključuje korištenje magnetskih nanočestica (17). Nakon tretiranja stanica s magnetskim nanočesticama, one se inkubiraju te se kasnije tripsiniziraju kako bi se odvojile od površine te stavljaju na ploču s jažicama. Zatim se na ploču stavlja poklopac s magnetima koji omogućuje

stanicama njihovo međusobno agregiranje (10). Upravo zbog korištenja magnetske sile, stanice imaju mogućnost levitirati između medija i zraka što mijenja geometriju stanične mase i potiče njihovo zbližavanje te, na koncu, formiranje sferoida (10, 17). Levitacija se događa zato što magnetska sila nadjača gravitacijsku silu (18). Sferoidi se formiraju u roku od nekoliko sati, no kako bi se postigla željena veličina sferoida, oni se mogu inkubirati nekoliko dana ili duže (10,18). Tijekom levitacije stanice proizvode vlastiti ekstracelularni matriks (15). Stvaraju proteine poput kolagena, fibronektina i laminina (10).

Metoda magnetske levitacije prikladna je za sve tipove stanica te je zbog toga često korištena metoda u istraživanjima. Ima brojne prednosti, a neke od njih su: rast sferoida u relativno kratkom vremenu, mogućnost lake manipulacije sferoidima, ne zahtijeva specifičan medij te su sve komponentne biokompatibilne (10,15). Međutim, neka istraživanja su pokazala da ovakav način formiranja sferoida može dovesti do promjena u staničnim strukturama i rezultirati apoptozom (17).



Slika 2. Metoda magnetske levitacije (prilagođeno prema shematskom prikazu iz reference 10.)

2. CILJEVI

- Ciljevi ovog istraživanja bili su formirati sferoide metodom magnetske levitacije te nakon toga odrediti vrijeme zadržavanja i količinu magnetskih čestica u sferoidima glioblastoma u različitim vremenskim razmacima, odnosno nakon 7, 14 i 21 dan.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj studije

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

3.2. Materijali

3.2.1. Stanične linije

Korištene su dvije komercijalno dostupne humane stanične linije:

- BJ (ATCC® CRL-2522™) stanice normalnih humanih fibroblasta
- D54 (ATCC® CVCL-7185™) humani glioblastom

3.2.2. Kemikalije

- Fosfatni pufer (PBS):
 - NaCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
 - KCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
 - Na₂HPO₄·7H₂O (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 - KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- DMEM, s visokim udjelom glukoze (4.5 g/L) uz dodatak glutamin-S (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)
- Fetalni goveđi serum (FBS), dodatak antibiotik-antimikotik (penicilin/streptomycin) 100x (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)
- Erythrosin B, sterilno filtriran (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)

- Tripsin/EDTA, tripsin 0.25%, 1Mm EDTA-Na₄ u HBSS (Panbiotech GmbH, Aidenbach, Germany)
- Magnetske nanočestice (NanoShuttle-PL, Greiner, Frickenhausen, Germany)
- Aceton (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Alkoholi - histanol (Biognost, Zagreb, Hrvatska)
- Boje: fuksin, ksilidin, fosfomolibden i anilin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)
- Ksilol (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)
- Kanada balzam (Carlo Erba Reagents, Emmendingen, Germany)

3.3. Metode

3.3.1. Kultivacija i održavanje stanica *in vitro*

Kultivacija stanica obavlja se u za to predviđenom laboratoriju koji sadrži kabinet s laminarnim protokom. Rad u kabinetu zahtjeva sterilne uvjete te stoga, sve što se unosi u kabinet mora biti prethodno sterilizirano.

Za kultivaciju stanica koriste se posebne boce za kulturu stanica površine rasta 25 cm² (BD, Falcon, Germany). Zatim se tako kultivirane stanice u bocama inkubiraju na 37°C u inkubatoru (IGO 150 CELLlifeTM, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) s kontroliranom atmosferom, visokom vlažnošću zraka i 5% CO₂. Također je bitno da boca ne bude potpuno popunjena.

U ovom eksperimentu su se kokultivirale dvije stanične linije: stanice normalnih humanih fibroblasta i stanice humanih glioblastoma.

Kako bi se stanice održale živima, mora se svakih nekoliko dana, odnosno po potrebi, mijenjati medij u bočicama za kulturu stanica. Kao medij za održavanje glioblastoma koristi se DMEM uz dodatak 10% FBS-a, 200 mM glutamina-S i 100 U/0,1 mg penicilin/streptomycin antibiotika. Stanice je potrebno održavati kako bi se održala i njihova konfluentnost. Konfluentnost se redovno provjerava pod invertnim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Germany) te se, ako je potrebno, stanicama mijenja medij. Prvo se radi ispiranje PBS-om, zatim je potrebno odlijepiti stanice sa površine bočice, a to se postiže korištenjem proteolitičkog enzima tripsina, nakon čega slijedi inkubacija. Inkubacija se provodi također u inkubatoru s

kontroliranom uvjetima, 6 minuta na 37°C. Nakon inkubacije, dodaje se svježi medij te se na taj način inaktivira tripsin. Tako odlijepljene stanice se pakuju pomoću svježeg medija te se stavljaju u novu bočicu. Zaključno, stanice se mogu ponovo mikroskopirati na kraju rada te na taj način im još jednom provjeriti konfluentnost.

3.3.2. Određivanje vijabilnosti stanica u kulturi

Kako bi kultura stanica bila što kvalitetnija, a time i pokus uspješniji, ispituje se vijabilnost stanica. Nakon resuspendiranja stanica, ispipetira se 50 µL stanične suspenzije i 100 µL eritrozina B te se zajedno nanosi na Bürker-Türkovu komoricu koja služi za brojanje stanica. Bürker-Türkova komorica se stavlja pod mikroskop i broje se stanice. Žive od mrtvih stanica možemo razlikovati po njihovoj obojenosti: zbog oštećene membrane mrtvih stanica, eritrozina B lako ulazi te ih boja ružičasto, za razliku od živih stanica koje ostaju neobojene.

Broj živih stanica određuje se formulom:

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

Značenje oznaka:

N – broj stanica

4 – broj polja u komorici

3 – faktor razrjeđenja

3.3.3. Formiranje sferoida metodom magnetske levitacije

Za formiranje sferoida metodom magnetske levitacije, potrebne su magnetske nanočestice. U medij gdje su stanice glioblastoma dodaje se 30 µL nanočestica koje onda postupno ulaze u staničnu citoplazmu. Stanice moraju biti između 70-80% konfluentnosti kako bi stvaranje sferoida bilo učinkovito. Zatim se boca u kojoj se nalaze stanice i nanočestice stavlja na inkubaciju 6-8 sati na 37°C. Nakon inkubacije, stanice se odljepljuju pomoću tripsina

te se izbroji 5000 stanica koje se zatim stavljaju u ploču s 24 jažice (Greiner, Frickenhausen, Germany) na koju se stavlja poklopac s magnetima (Greiner, Monroe, USA). Stvara se magnetsko polje koje omogućava međusobno agregiranje stanica te formiranje sferoida. Tako formirani sferoidi, zbog djelovanja magnetske sile, plutaju na granici između medija i zraka što dodatno potiče njihovo formiranje. Zatim se sferoidi stave natrag u inkubator te prate kroz period od 21 dan.

3.3.4. Rezanje sferoida na kriostatu

Sferoidi su bez posebne obrade, direktno iz medija uklopljeni u medij za kriostatsko rezanje (Tissue Freezing Medium; Leica, Nussloch, Germany), pa su zatim rezani na kriostatu (Cryostat CM3050S, Leica, Nussloch, Germany). Rezanje je u koronarnom smjeru na temperaturama CT (eng. *chamber temperature*) -25°C i OT (engl. *object temperature*) -22°C , a debljina rezova je $10\ \mu\text{m}$.

3.3.5. Bojenje sferoida

Nakon rezanja na kriostatu, rezovi su stavljani na polilizirana stakalca (Menzel-Glaser, Thermo Scientific, Braunschweig, Germany). Rezovi sferoida su u ovom eksperimentu bojani po Massonu. Stanice se prije bojenja moraju fiksirati hladnim acetonom. Bojenje se provodi po idućim koracima:

1. Uroniti u ksilol
2. Rehidrirati alkoholima sljedećim redoslijedom: 100%-tni alkohol, 95%-tni alkohol, 70%-tni alkohol
3. Staviti kiseli fuksin i ksilidin te ostaviti 10 minuta
4. Isprati destiliranom vodom
5. Staviti 1%-tni fosfomolibden te ostaviti 5 minuta
6. Isprati destiliranom vodom
7. Staviti 2%-tni anilin te ostaviti 10 minuta

8. Isprati destiliranom vodom
9. Dehidrirati alkoholom sljedećim redoslijedom: 70%-tni alkohol, 95%-tni alkohol, 100%-tni alkohol
10. Dehidrirati u ksilolu

Nakon bojenja, na stakalce se nanese kanada-balzam te se prekrije pokrovnicom. Makne se višak mjehurića zraka, obriše se višak pokrivala te je tako pripremljen rez sferoida spreman za mikroskopiranje.

3.3.6. Mikroskopiranje i slikanje preparata

Nakon bojenja rezova metodom po Massonu, preparati su mikroskopirani svjetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss, Axioskop 2 MOT, Jena, Germany). Zatim su fotografirani kamerom koja je postavljena na svjetlosnom mikroskopu (Carl Zeiss, Axioskop 2 MOT, Jena, Germany). Za fotografiranje i mikroskopiranje korišteno je povećanje od 100x.

3.4. Statističke metode

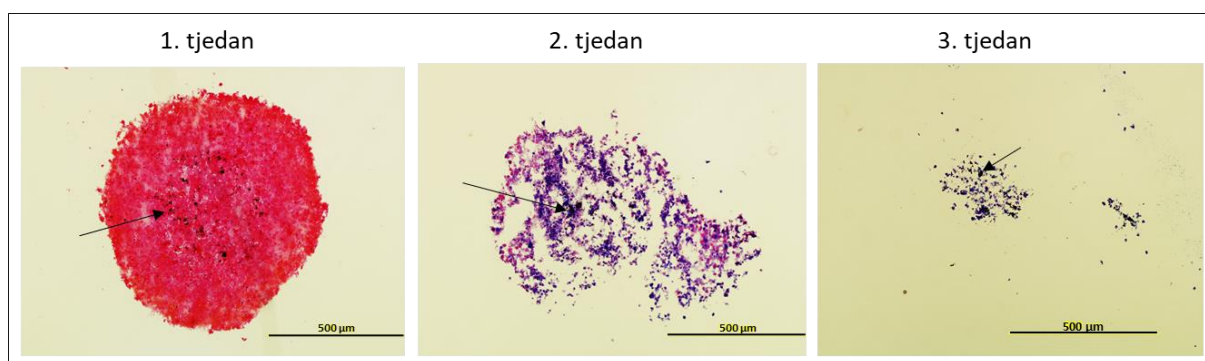
Za kvantifikaciju i dobivanje rezultata, slike su analizirane pomoću programa *ImageJ (Fiji 101)* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SAD). Broj dobivenih piksela magnetskih čestica podijeljen s razlikom piksela ukupne slike te pikselima praznog prostora između i oko tkiva korištenjem formule: pikseli čestica / (ukupni pikseli – pikseli praznog dijela slike). Tako smo dobili količinu piksela magnetskih čestica u tkivu glioblastoma kroz tri tjedna. Statistička obrada dobivenih podataka napravljena je u računalnom programu R, v4.1.0 (<https://www.r-project.org/>). Grafovi su dobiveni korištenjem ggstatsplot paketa (20). Numerički podaci opisani su medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR). Statistička značajnost razlike među neovisnim skupinama ispitana je neparametrijskim Kruskal-Wallisovim testom, dok su razlike između

distribucija dviju nezavisnih varijabli utvrđene Mann-Whitney testom. Statistička značajnost postavljena je na $P < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Određivanje broja magnetskih čestica

Staničnu liniju glioblastoma inkubirali smo s magnetskim nanočesticama, zatim stavili u ploču s 24 jažice i poklopili s 24 magneta. Nakon inkubacije, formirane sferoide smo rezali na kriostatu, bojali po Massonu te slikali pod svjetlosnim mikroskopom. Pomoću programa ImageJ kvantificirali smo magnetske čestice tako što smo analizirali 5 sferoida od svakog tjedna (Slika 3).



Slika 3. Prikaz sferoida glioblastoma kroz 3 tjedna. Sferoidi su bojeni nakon 1., 2. i 3. tjedna bojenjem po Massonu te slikani pod povećanjem 100x. Strjelicama su označene magnetske čestice. Skala predstavlja 500 μm.

Kako bi metoda bila što preciznija, najprije smo odredili količinu piksela magnetskih čestica te podijelili s razlikom piksela praznog prostora i piksela ukupne slike te tako izračunali količinu magnetskih čestica u tkivu. Navedene rezultate izrazili smo postotkom pomnoživši sa 100. U prvom tjednu, srednja vrijednost udjela magnetskih čestica u tkivu bila je najveća, iznosila je 1,886%. U drugom tjednu srednja vrijednost udjela magnetskih čestica iznosila je 0,912%, dok je u trećem tjednu vrijednost bila najmanja, iznosila je 0,59% (Tablica 2). Koristeći te podatke, napravili smo deskriptivnu statistiku prikazanu u tablici (Tablica 3). Zatim smo statističku analizu napravili pomoću dva testa: Kruskal-Wallisovim testom usporedili smo više nezavisnih uzoraka, odnosno količinu čestica u tri vremenska razdoblja, a Mann-Whitney testom usporedili smo razlike između

dvije nezavisne varijable, odnosno između dva tjedna. Kruskal-Wallisovim testom je dobivena statistički značajnu razlika udjela magnetskih čestica u sferoidima različite starosti, p vrijednost je 0,03 (Tablica 4 i Slika 4). Mann-Whitney test je također pokazao statistički značajnu razliku, a rezultati su prikazani u Tablici 4.

Tablica 2. Prikaz udjela magnetskih čestica u tkivu nakon 1., 2. i 3. tjedna, odnosno 7., 14., 21. dana uzgoja prema kojima je napravljena statistička analiza.

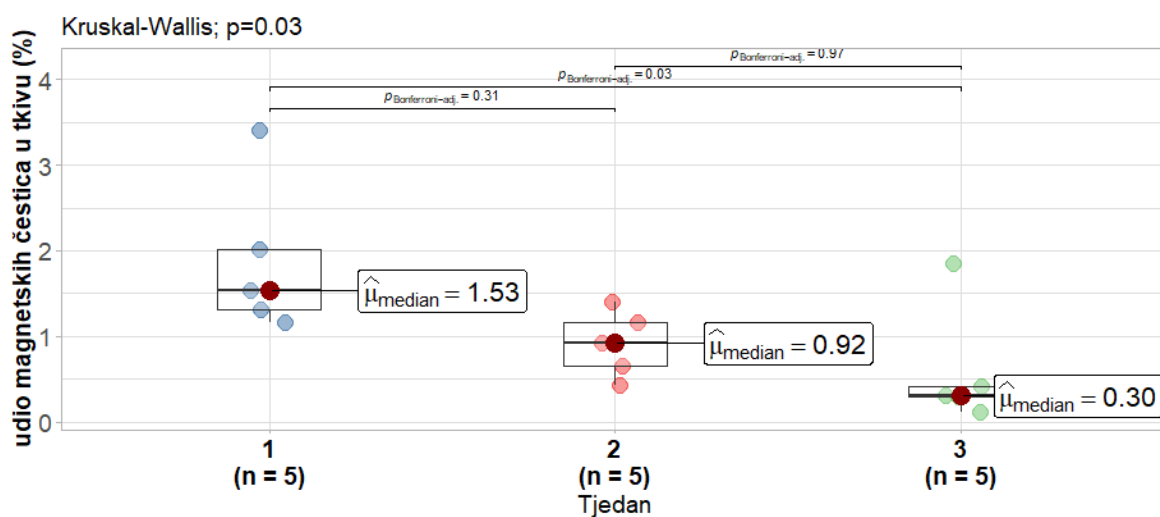
| | 1. tjedan | 2. tjedan | 3. tjedan |
|--------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Udio magnetskih čestica u tkivu (%) | 2,010 | 0,654 | 1,846 |
| | 1,318 | 1,393 | 0,408 |
| | 3,411 | 0,431 | 0,302 |
| | 1,529 | 0,917 | 0,287 |
| | 1,163 | 1,163 | 0,108 |
| Srednja vrijednost | 1,886 | 0,912 | 0,590 |

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

| Tjedan | median | IQR | Q1 | Q3 | min | max |
|----------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 1,529 | 0,692 | 1,318 | 2,010 | 1,163 | 3,411 |
| 2 | 0,917 | 0,508 | 0,654 | 1,163 | 0,431 | 1,393 |
| 3 | 0,302 | 0,121 | 0,287 | 0,408 | 0,108 | 1,846 |

Tablica 4. Prikaz statistički dobivenih vrijednosti Kruskal-Wallisovim i Mann-Whitney testom.

| Test | Razlika između tjedana | p |
|----------------|------------------------|------|
| Kruskal-Wallis | 1., 2. i 3. | 0,03 |
| Mann-Whitney | 1. i 2. | 0,04 |
| Mann-Whitney | 1. i 3. | 0,04 |
| Mann-Whitney | 2. i 3. | 0,14 |



Slika 4. Grafički prikaz usporedbe udjela magnetskih čestica u sferoidima glioblastoma promatranih nakon 1, 2 i 3 tjedna. p=0,03 (Kruskal-Wallisov test s post hoc Bonferroni-Dunnovom korekcijom).

5. RASPRAVA

Glioblastom je najrašireniji i najagresivniji tip primarnog malignog tumora mozga koji je, zbog svojih brojnih tumorskih svojstava, teško liječiv (2). Kako je liječenje kompleksno, ovaj tumor ima tešku kliničku sliku te vrlo visoku stopu smrtnosti pa je stoga bitno pronaći što adekvatniju terapiju (5). Za testiranja potencijalne terapije koriste se i kulture stanica koje nam omogućuju uzgajanje samih tumorskih stanica te proučavanje njihove biologije i morfologije pa tako i mehanizma same bolesti. Postoje 2D i 3D kulture stanica, no zbog bolje imitacije uvjeta *in vivo*, u istraživanju tumora češće su korištene 3D stanične kulture (9,11). Među 3D kulturama ističu se sferoidi i organoidi jer najbolje oponašaju heterogenost i patofiziologiju ljudskih tumora te bi mogli popuniti prazninu između testiranja na 2D kulturama i životinjskih modela (19).

Postoje brojne metode stvaranja staničnih sferoida. Jedna od njih je i metoda magnetske levitacije koja nam omogućuje stvaranje sferoida korištenjem magnetskih nanočestica. Na taj način stvara se magnetsko polje koje omogućuje levitiranje stanica između medija i zraka. Postupno, kroz nekoliko sati, formiraju se sferoidi koji nam zatim služe za proučavanje stanica tumora u 3D okruženju (10,17).

U ovom radu korištena je upravo metoda magnetske levitacije. Stanična linija glioblastoma D54 inkubirana je s magnetskim nanočesticama te se pratio njihov broj kroz period od 1, 2 i 3 tjedna. Svakim tjednom broj magnetskih čestica bio je sve manji i manji, a samim time se i deformirao oblik sferoida. Glioblastomi su u 1. tjednu imali gotovo pravilan okrugli oblik koji je tjednima postajao sve nepravilniji. Dok se broj magnetskih čestica reducirao kroz vrijeme, količina praznog prostora tkiva se povećavala. Izračunom se utvrdilo da se i udio magnetskih čestica u tkivu također reducirao što nam je mnogo relevantnija informacija nego broj samih magnetskih čestica. Statistički je značajan pad broja magnetskih čestica između 1. i 3. tjedna. Kako bi utvrdili statistički značaj, koristili smo Kruskal-Wallis test i Mann-Whitney test.

Također, u istraživanju Van de Walle i sur. korištena je magnetometriju za mjerenje magnetskih nanočestica u sferoidima matičnih stanica. Rezultati njihovog istraživanja su u skladu s našim rezultatima, oni su također utvrdili smanjenje broja magnetskih čestica kroz vrijeme (21).

Metoda magnetske levitacije je često korištena metoda u formiranju sferoida. 3D kultura stanica i sferoidi kao takvi omogućuju nam prikaz stanica i njihovih međusobnih odnosa sličnim

kao u uvjetima *in vivo*. Zbog toga, oni su često korišteni modeli u istraživanju lijekova, biranju i praćenju terapije te procjene njezine učinkovitosti (13). Metoda magnetske levitacije ima i neke svoje nedostatke, a to su: nemogućnost kontroliranja veličine stanica i vremena potrebnog za formiranje sferoida, potencijalno uzrokovanje promjena u staničnim strukturama te čak i mogućnost apoptoze (17). Metode formiranja sferoida konstantno se razvijaju i poboljšavaju kako bi bile što bolje i jednostavnije za korištenje.

6. ZAKLJUČAK

- Broj magnetskih čestica u stanicama glioblastoma se smanjuje kroz vrijeme.
- Statistički značaj pad broja magnetskih čestica je između 1. i 3. tjedna
- Smanjenjem broja magnetskih čestica, sferoidi se kreću raspadati te gube svoj pravilan okrugli oblik.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Proučiti zadržavanje magnetskih čestica u sferoidima glioblastoma te odrediti njihov broj kroz period od 3 tjedna.

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

Materijali i metode: Staničnu liniju glioblastoma, D54, inkubirali smo s magnetskim nanočesticama na 37°C u kontroliranoj atmosferi, s visokom vlažnošću zraka i 5% CO₂ u trajanju od 6 sati. Zatim smo izbrojali 5000 stanica te ih stavili u ploču s 24 jažice i poklopili pločom s 24 magneta. Tako pripremljeni set, stavili smo u inkubator te povremeno, svakih nekoliko dana, mijenjali mediji kako bi stanice uspješno rasle. Nakon 7., 14. i 21. dana smo sferoide rezali na kriostatu, a zatim bojali po Massonu. Tako pripremljene rezove smo mikroskopirali i slikali na svjetlosnom mikroskopu s ugrađenom kamerom. Za kvantifikaciju i dobivanje rezultata, analizirane su slike pomoću programa ImageJ.

Rezultati: Broj magnetskih čestica reducirao se s vremenom. Statistički značajan pad vidljiv je između 1. i 3. tjedna. Broj magnetskih čestica se smanjivao, a količina praznog prostora povećavala. Unatoč tome, izračunom smo utvrdili i pad udjela magnetskih čestica u tkivu. Također smo utvrdili da sferoidi nakon određenog vremena gube svoj okruglasti oblik i raspadaju se.

Zaključak: Metoda magnetske levitacije je često korištena metoda u formiranju sferoida. Magnetske čestice koje se koriste za ovu metodu zadržavaju se u stanicama samo određeni period. Broj magnetskih čestica korelira s vremenom, odnosno kako vrijeme odmiče, njihov broj se reducira. Samim time se i sferoidi krenu raspadati i tvoriti nepravilne oblike.

Ključne riječi: glioblastom; kultura stanica; magnetska levitacija; sferoidi

8. SUMMARY

Retention of magnetic particles in glioblastoma spheroids

Research objective: To study the retention of magnetic particles in glioblastoma spheroids and to determine their number over a period of 3 weeks.

Study design: *In vitro* study - controlled experiment.

Materials and methods: The glioblastoma cell line, D54, was incubated with magnetic nanoparticles at 37°C in a controlled atmosphere, with high humidity and 5% CO₂ during 6 hours. 5000 cells were counted, transferred into 24-well plate and covered with a 24-magnet plate. Cells prepared this way were put into the incubator and occasionally, every few days, the media was changed so that the cells would grow successfully. After 7th, 14th and 21st day, the spheroids were cut on a cryostat and then stained with Masson stain. We examined and imaged the sections prepared in this way on a light microscope with a built-in camera. For quantification and obtaining results, images were analyzed using the ImageJ program.

Results: The number of magnetic particles reduced over time. A statistically significant decrease is visible between the 1st and 3rd week. The number of magnetic particles decreased, and the amount of empty space increased. In spite of this, we also determined the decrease in the proportion of magnetic particles in the tissue. We also found that the spheroids lose their round shape after a certain time and disintegrate.

Conclusion: The magnetic levitation method is a frequently used method in the formation of spheroids. The magnetic particles used for this method remain in the cells only for a certain period of time. The number of magnetic particles correlates with time, meaning that, as time goes on, their number is reduced. As a result, the spheroids begin to disintegrate and form irregular shapes.

Keywords: glioblastoma; cell culture; magnetic levitation; spheroids

9. LITERATURA

1. Cooper GM, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
2. Wirsching HG, Weller M. Glioblastoma. U: Moliterno Gunel, J, Piepmeier, J, Baehring, J, urednici. Malignant Brain Tumors. Cham: Springer; 2017. str. 265-288.
3. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, i sur. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(10):1985–96.
4. Darkes MJM, Plosker GL, Jarvis B. Temozolomide. *Am J Cancer.* 2002;1:55–80.
5. Ellor SV, Pagano-Young TA, Avgeropoulos NG. Glioblastoma: Background, standard treatment paradigms, and supportive care considerations. *J Law Med Ethics.* 2014;42(2):171-182.
6. Al-Kharboosh R, ReFaey K, Lara-Velazquez M, Grewal SS, Imitola J, Quiñones-Hinojosa A. Inflammatory mediators in glioma microenvironment play a dual role in gliomagenesis and mesenchymal stem cell homing: implication for cellular therapy. *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes.* 2020;4(4):443-459.
7. MacLeod RAF, Drexler HG. Cytogenetic characterization of Tumor Cell Lines. U: Langdon S, urednik. *Cancer Cell Culture – Methods and Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press; 2003. str. 57-76.
8. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* 2014;12(4):207-18.

9. Kapalczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, i sur. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci.* 2018;14(4):910-919.
10. Hoarau-Véchet J, Rafii A, Touboul C, 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.
11. Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(1):61-86.
12. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, i sur. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda).* 2017;32(4):266-277.
13. Cezars Z, Tamama K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:9176357.
14. Gong X, Lin C, Cheng J, Su J, Zhao H, Liu T, i sur. Generation of Multicellular Tumor Spheroids with Microwell-Based Agarose Scaffolds for Drug Testing. *PLoS One.* 2015; 10(6):e0130348.
15. Mišković Špoljarić K, Jukić M, Opačak-Bernardi T, Glavaš-Obrovac Lj. 3D Cell Technology in Biomedical Research. *Collegium antropologicum [Internet].* 2020 [pristupljeno 26.05.2022.];44(3):171-174. Dostupno na: <https://doi.org/10.5671/ca.44.3.10>
16. Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Advanced cell culture techniques for cancer drug discovery. *Biology (Basel).* 2014;3(2):345–67.

17. Ryu NE, Lee SH, Park H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*. 2019;12;8(12):1620.
18. Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(17):6225.
19. Zanoni M, Cortesi M, Zamagni A, Arienti C, Pignatta S, Tesi A. Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. *J Hematol Oncol*. 2020;16;13(1):97.
20. Patil, I. Visualizations with statistical details: The 'ggstatsplot' approach. *Journal of Open Source Software*. 2021;6(61):3167.
21. Van de Walle A, Fromain A, Sangnier AP i sur. Real-time in situ magnetic measurement of the intracellular biodegradation of iron oxide nanoparticles in a stem cell-spheroid tissue model. *Nano Res*. 2020;13:467–476.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Aida Imeri

Datum i mjesto rođenja: 27.05.2000., Đakovo, Hrvatska

Adresa stanovanja: S.S. Kranjčevićeva 11, Đakovo

E-mail: aidaimeri7@gmail.com

OBRAZOVANJE

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

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

AKTIVNOSTI TIJEKOM STUDIJA

Radionice:

- Osnove znanstvenog istraživanja (4.-5. prosinca 2020.)
- Hematologija (15. travnja 2021.)
- Festival znanosti (2.-7. svibnja 2022.) – voditeljica radionice „Život“

Kongresi:

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