

Energetski status D54 sfera u ovisnosti o veličini sfera i dostupnost nutrijenata

Ruška, Matej

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:594337>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



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

Matej Ruška

ENERGETSKI STATUS D54 SFERA U
OVISNOSTI O VELIČINI SFERA I
DOSTUPNOSTI NUTRIJENATA

Diplomski rad

Osijek, 2022.

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

Matej Ruška

ENERGETSKI STATUS D54 SFERA U
OVISNOSTI O VELIČINI SFERA I
DOSTUPNOSTI NUTRIJENATA

Diplomski rad

Osijek, 2022.

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

Mentor rada: doc. dr. sc. Marijana Leventić

Rad ima 27 listova, 1 tablicu i 5 slika.

Zahvala:

Veliku zahvalnost dugujem mentorici doc. dr. soc. Marijani Leventić na pruženoj prilici za suradnju, pomoći, posvećenom vremenu, strpljenju i savjetima za izradu diplomskoga rada.

Zahvaljujem višoj tehničarki bacc. med. lab. dijag. Ivani Jelavić na pomoći pri radu u laboratoriju.

Također, neizmjerne hvala mojim roditeljima, djevojci, prijateljima i kolegama na motivaciji i podršci kroz sve godine studija.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Glioblastom.....	1
1.2. D54 stanična linija.....	2
1.3. Kultura stanica.....	2
1.4. Energetska valuta stanice.....	4
2. HIPOTEZA.....	6
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	7
4. MATERIJALI I METODE.....	8
4.1. Ustroj studije.....	8
4.2. Materijali.....	8
4.3. Metode.....	8
4.3.1. Kultura stanica.....	8
4.3.2. Određivanje broja živih stanica.....	8
4.3.3. Uzgoj staničnih sferoida.....	9
4.3.4. Kolorimetrijsko određivanje ATP-a.....	10
4.3.5. LDH analiza.....	11
4.3.6. Određivanje aktivnosti mitohondrija.....	12
4.3.7. Statističke metode.....	13
5. REZULTATI.....	14
5.1. Kolorimetrijsko određivanje ATP-a.....	14
5.2. LDH analiza.....	14
5.3. Određivanje aktivnosti mitohondrija.....	15
6. RASPRAVA.....	17

7. ZAKLJUČAK	20
8. SAŽETAK	21
9. SUMMARY	22
10. LITERATURA	23
11. ŽIVOTOPIS	27

POPIS KRATICA:

ADP – adenzin-difosfat

AMP – adenzin-monofosfat

ATP – adenzin-trifosfat

DMEM – Dulbekov modificirani medij (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

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

GB – glioblastom

INT – jodonitrotetrazol (engl. *iodonitrotetrazolium*)

LDH – laktat dehidrogenaza

M – mol/dm³

PBS – fosfatni pufer (eng. *phosphate-buffer saline*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

TMRE – tetrametilrodamin etil ester (engl. *tetramethylrhodamine, ethyl ester*)

2D – dvodimenzionalno

3D – trodimenzionalno

1. UVOD

1.1. Glioblastom

Glioblastom (GB) je najčešći primarni tumor mozga te na njega otpada čak 16 % primarnih tumora mozga, ali i čak 70 % novo dijagnosticiranih malignih tumora mozga (1). Iz razloga što glioblastom, ali i ostali tumori mozga imaju znatno nižu incidenciju od drugih tumora kao što su npr. rak dojke, prostate, jajnika i slično, dobivaju znatno manje pažnje nego ostali. Na primjer, incidencija glioblastoma je oko 5,5 slučajeva na 100 000, dok od raka dojke oboli 1 od 8 žena (2). Glioblastom se razvija iz glija stanica, koje su nakon neurona, najbrojnije stanice živčanog sustava. Glija stanice se dijele u nekoliko podskupina: astrociti, oligodendrociti, ependimske stanice i mikroglija u središnjem živčanom sustavu te Schwannove i satelitne stanice u perifernom živčanom sustavu (3). Njihova uloga je moduliranje brzine prijenosa živčanog signala, stvaranje ionskog okruženja neurona, zaštita neurona, formiranje mijelina i omogućavanje popravka nakon neuralne ozljede (4). Gliomi su primarni tumori mozga koji su klasificirani prema vrsti stanica iz kojih nastaju. Dijele se na astrocitne tumore (astrocitom, anaplastični astrocitom te glioblastom), oligodendrogliome, ependimome i pomiješane gliome (5). Glioblastomi su najmaligniji tumori mozga, a njihovo liječenje je iznimno teško. Čak i ukoliko dođe do izlječenja, velika je vjerojatnost recidiva. Čak 90 % tumora recidivira na izvorno mjesto nastanka (6,7). Patogeneza glioblastoma je iznimno složena jer postoji više putova njegova nastanka te se ne može odrediti jedan najčešći put nastanka, a samo kod 5 % bolesnika je utvrđena obiteljska povijest obolijevanja od glioblastoma. Važna karakteristika ovog tumora je dobra prokrvljenost što omogućuje dotok velike količine hranjivih tvari iz krvi koje dovodi velika mreža krvnih žila (7). Upravo to je uzrok brzom rastu ovog tumora i kratkom preživljenju bolesnika kojima je dijagnosticiran. Prosječno preživljenje bolesnika kojima je dijagnosticiran glioblastom te nakon operacijskog zahvata i onkološkog liječenja iznosi 12-15 mjeseci (8). To je samo nekoliko mjeseci više nego kod oboljelih koji se nisu liječili. Petogodišnje preživljenje iznosi samo 6,2 % (9). Upravo to je razlog hitne potrebe za pronalaskom učinkovitijih načina liječenja.

Najčešće od glioblastoma obolijeva starija populacija (oko 64 godine), ali raspon dobi oboljelih obuhvaća i djecu. Od primarnog glioblastoma najčešće obolijevaju stariji, dok je kod djece učestalije da se sekundarni glioblastom razvije iz astrocitoma niskog stupnja (10,11). Što se tiče incidencije, uočeno je kako se glioblastom nešto češće pojavljuje u muškoj populaciji nego u ženskoj i to u omjeru 1,6:1. Također, prema rasnoj podjeli, češće se

pojavljuje među pripadnicima bijele rase. Uočena je razlika pojavnosti među različitim geografskim područjima, tako je u Europi najveća pojavnost od oko 5,5 slučajeva na 100 000, a zatim slijede Sjeverna Amerika, Sjeverna Afrika, Zapadna Azija te Australija i Novi Zeland (12).

Kod bolesnika s primarnim glioblastomom uočen je akutni razvoj kliničkih simptoma te su kod tih bolesnika tegobe izražene u prosjeku 3 do 6 mjeseci. Za razliku od njih, kod bolesnika sa sekundarnim glioblastomom nastalim iz glijalnih tumora nižeg stupnja, klinički simptomi mogu perzistirati mjesecima. Najčešće je prvi simptom tumora na mozgu glavobolja, koja obično ne popušta. Također je moguće i povraćanje uzrokovano povećanim intrakranijalnim tlakom. Glioblastom rijetko može uzrokovati i epileptičke napadaje, iako su za to češće odgovorni benigni tumori i spororastući oblici raka kao što je astroцитom. Primarni i sekundarni glioblastom slično reagiraju na terapiju (13). Problem kod liječenja glioblastoma je prirodna obrana mozga, odnosno barijera krv-mozak koja značajno otežava liječenje i smanjuje broj dostupnih opcija liječenja. Trenutno standardno liječenje glioblastoma uključuje kirurško liječenje (pokušaj odstranjivanja što većeg zahvaćenog područja), kemoterapija i radioterapija (14).

1.2. D54 stanična linija

Stanična linija D54 često je korištena stanična linija glioblastoma (15). Izvor stanica je Duke University Medical Centre. Ova stanična linija potiče od glija stanica, točnije astrocita. Stanice je donirala 36-godišnja ženska pacijentica. Koristi se u istraživanju raka. Staničnu liniju opisao je S Binger (16).

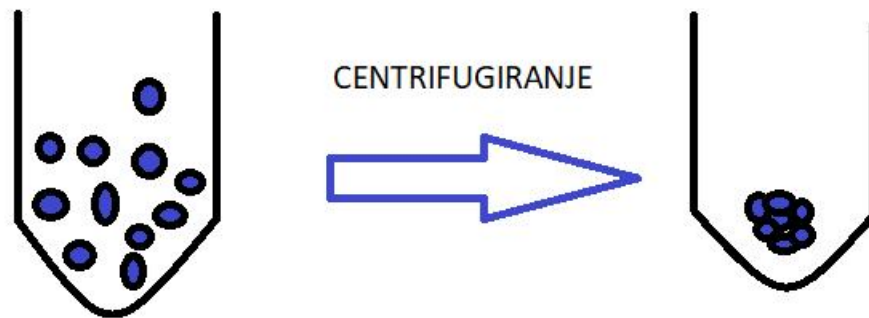
1.3. Kultura stanica

Metoda kulture stanica uključuje laboratorijski uzgoj stanica, tkiva ili organa i kompletnih organizama na umjetnim hranidbenim podlogama i u aseptičnim uvjetima. Ova metoda je izvrsna za istraživanje fiziologije i biokemije stanica, karcinogeneze, mutageneze te za ispitivanje učinka lijekova (17). Prilikom *in vitro* kultivacije važna je mogućnost kontrole fizikalno-kemijskih uvjeta (temperatura, vlaga, nutrijenti) te ih je moguće održavati relativno konstantnima. Stanična kultura podrazumijeva izdvajanje stanica, tkiva ili organa iz organizma i njihov uzgoj u ranije navedenim kontroliranim uvjetima. Uzgoj kulture stanica *in vitro* omogućen je korištenjem definiranih medija u kojima su sadržane sve hranjive tvari potrebne stanicama za njihov rast i razvoj, ali i za održavanje određenih fizikalno-kemijskih

uvjeta. Za razliku od *in vivo* metode, *in vitro* metoda je ekonomičnija zbog manje uporabe reagensa, ali su osim toga izbjegnuta i sva legalna i etička pitanja koja se postavljaju pri korištenju životinja u istraživačke svrhe. Također, glavna prednost korištenja *in vitro* kulture stanica je ponovljivost rezultata istraživanja (17).

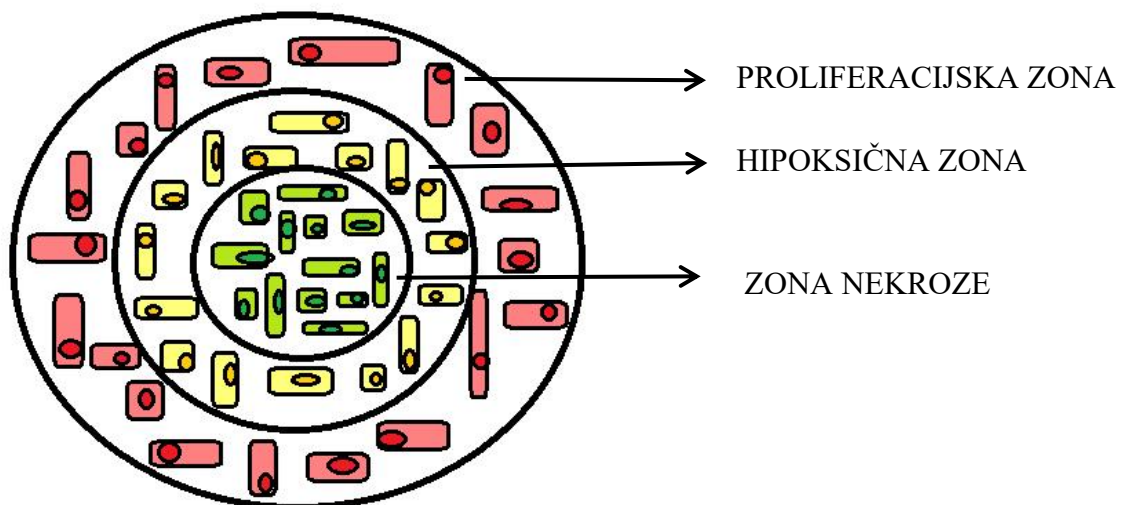
Standardna 2D kultura stanica temelji se na adheziji stanica za hranjivu površinu, tipično u Petrijevim zdjelicama. Na takvoj podlozi stanice rastu u monosloju što im omogućuje da budu jednako i neograničeno izložene hranjivom mediju što uzrokuje homogen rast i proliferaciju stanica (18). To je jednostavan, brz i lak način za interpretaciju, ali su očiti njegovi nedostaci. Strukture dobivene takvim uzgojem ne oponašaju vjerno interakcije između stanica i ekstracelularnog matriksa stanicama tumora, a upravo su te interakcije odgovorne za staničnu proliferaciju, ekspresiju gena i staničnu diferencijaciju. Unatoč navedenim nedostacima, 2D kultura stanica bitna je i ima vrlo važnu ulogu u početnim stupnjevima istraživanja (19).

3D modeli kulture stanica podrazumijevaju cijele organizme, organotipske eksplantirane kulture, stanične sferoide te modele tkivnog inženjeringa (20). S obzirom na navedene nedostatke 2D kulture stanica, glavna uloga 3D kulture stanica je oponašanje fiziologije unutar živih organizama. Interakcije stanica-stanica i stanica-matriks ne mogu se proučavati u 2D kulturi (21). Stanični sferoidi su najčešće korišteni modeli jer su jednostavni i mogu biti generirani iz mnogo vrsta i tipova stanica. Umjesto adheriranja stanica kao kod 2D kulture, kod formiranja staničnih sferoida bitna je agregacija stanica koja se postiže centrifugiranjem (Slika 1.). Samom agregacijom stanica postiže se fizički kontakt i stanična signalizacija kao u tumorima *in vivo*. Upravo zbog toga korištenje 3D kulture je dobar model za ispitivanje novosintetiziranih spojeva s visokim potencijalom oponašanja kompleksa 3D organizacije tumorskog tkiva *in vivo* (22).



Slika 1. Formiranje staničnih sferoida metodom plutajućih stanica (autor izradio sliku)

Formiranjem staničnih sferoida stanice u različitim fazama rasta se poslože u više slojeva. U vanjskom sloju staničnog sferoida smještene su vijabilne stanice koje se većinom nalaze u S fazi staničnog ciklusa te stanice koje pripadaju tom sloju imaju pristup hranidbenim tvarima iz medija. Zatim, slijedi hipoksična zona sa nekrotičnim središtem, odnosno stanice su u nekrozi ili apoptozi (Slika 2.) (23).



Slika 2. Prikaz presjeka staničnog sferoida sa zonama, gdje je crveno naznačena proliferacijska zona, žuto hipoksična zona i zeleno zona nekroze (autor izradio sliku)

1.4. Energetska valuta stanice

Sve stanice u organizmu imaju potrebu za adekvatnom opskrbom nutrijentima i energijom, dok smanjenje dostupnih nutrijenata i energije uzrokuje stanični stres pa i staničnu smrt (24). Stanični energetska status vrlo je važan ne samo za zdravlje stanice, nego i za

regulaciju stanične signalizacije. Sve stanice objedinjuju informacije o energetske statusu i dostupnosti nutrijenata za regulaciju metaboličkih aktivnosti koje podržavaju specifične stanične funkcije (25). Zbog toga je konstantna opskrba stanica energijom od iznimne važnosti.

ATP je glavni unutarstanični izvor energije te se nalazi posvuda u citoplazmi i nukleoplazmi. On je organska molekula koja se uz ADP (adenozin-difosfat) i AMP (adenozin-monofosfat) ubraja u skupinu adenzin-fosfata. To su nukleotidi koji se sastoje od dušikove baze adenzina, šećera riboze i fosfata. Adenzin-fosfati su kratkoročni prenositelji energije te mogu prelaziti jedan u drugoga. Energija dobivena iz ATP-a hidrolizom fosfatne skupine vezane na pentozni prsten riboze predstavlja neposredni izvor slobodne energije u mnogobrojnim staničnim reakcijama (26). Energija je u ATP-u pohranjena u fosfatnim vezama. ATP potiče sve životne procese kao što su genska ekspresija, metabolizam i transport. S obzirom da se ATP može proizvesti iz glukoze, razgradnja ugljikohidrata predstavlja glavni izvor stanične energije. ATP se može proizvesti putem glikolize, ciklusa limunske kiseline koji se odvija u matriksu mitohondrija te oksidativne fosforilacije koja se odvija na kristama, sastavnim dijelovima unutrašnje membrane mitohondrija (27).

Glikoliza je početna faza razgradnje glukoze i prisutna je u svim stanicama u našem tijelu. Glikolizom se glukoza razgradi do piruvata. Prilikom mišićnog napora dolazi do anaerobnih uvjeta u kojima se piruvat reducira u laktat, tj. dolazi do mliječnog kiselog vrenja, dok se u aerobnim uvjetima piruvat dekarboksilira u acetyl CoA koji se dalje u potpunosti oksidira u ciklusu limunske kiseline. Središnju ulogu u proizvodnji ATP-a zauzimaju mitohondriji gdje se prijenos elektrona preko gradijenta protona koristi za generiranje energije koja je potrebna za enzim ATP sintazu, odnosno za stvaranje ATP-a i ADP-a i fosfata (27).

2. HIPOTEZA

S potrošnjom nutrijenata iz medija i povećanjem sfera dolazi do promjene energetskog statusa u D54 sfera.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je odrediti utječe li veličina sfera i dostupnost nutrijenata na energetske status sferoida formiranih od stanica D54 glioblastoma.

4. MATERIJALI I METODE

Rad je odobren od strane Etičkog povjerenstva Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku Medicinskog fakulteta Osijek.

Praktični dio istraživanja energetskeg statusa D54 staničnih sferoida proveden je u laboratoriju Zavoda za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu na Medicinskom fakultetu Osijek.

4.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao *in vitro* studija- kontrolirani pokus.

4.2. Materijali

U ovom istraživanju za formiranje sferoida korištena je odabrana, komercijalno dostupna stanična linija D54 (RRID:CVCL_7185).

4.3. Metode

4.3.1. Kultura stanica

Adherentne D54 stanice uzgajane su u DMEM mediju (Capricorn Scientific GmbH, Njemačka) koji sadrži 10 % FBS (GIBCO Invitrogen; Paisley, Velika Britanija), 2 mM glutamina (GIBCO Invitrogen; Paisley, Velika Britanija) te 100 U/0,1 mg penicilin/streptomycin antibiotika (GIBCO Invitrogen; Paisley, Velika Britanija) kako bi se spriječila kontaminacija stanične kulture. Kultivacija se odvijala u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CellLife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pri temperaturi od 37 °C te atmosferi od 5 % CO₂ uz visoku vlažnost.

4.3.2. Određivanje broja živih stanica

Tijekom samog procesa uzgoja, ali i rukovanja stanicama one mogu umrijeti. Za pravilno provođenje istraživanja bitno je znati broj živih stanica s kojima radimo, odnosno razlikovati žive od mrtvih stanica. Korištena je eritrozina B boja (SIGMA-ALDRICH, SAD) pri određivanju vijabilnosti stanica. Ova metoda se temelji na tome da će se mrtve stanice sa pokidanom membranom obojati, dok će žive stanice sa očuvanom membranom aktivno izbacivati boju te će ostati neobojane. Za brojanje živih stanica korištena je Bürker-Türkova komorica te su stanice brojane u 4 kvadranta poštivajući L pravilo, odnosno odabiru se dvije

stranice u kojima se stanice broje. Svaka stanica koja prelazi prve linije koje čine slovo L se ne broje.

Broj živih stanica se određuje po formuli:

$$\text{Broj vijabilnih stanica} = \frac{N}{4} \times 3 \times 10^4 \text{ stanica / ml}$$

U kojoj je:

N- broj izbrojanih živih stanica

3- faktor razrjeđenja

4- kvadranti u kojima su stanice brojane

4.3.3. Uzgoj staničnih sferoida

Formiranje staničnih sferoida temelji se na agregiranju stanica, čime se omogućuje stanična signalizacija kakva je prisutna u tumorima *in vivo*. Sferoidi su uzgojeni pomoću metode plutajućih stanica (eng. *forced floating*). To je jeftina i jednostavna metoda kod koje koristimo mikrotitarske ploče sa slaboprijanjajućim jažicama konusnog dna (28). Stanične linije namijenjene formiranju staničnih sferoida najprije se tripsiniziraju pomoću 0,25 % tripsin-EDTA (Capricorn Scientific GmbH, Germany) te se resuspendiraju u mediju za uzgoj stanica. Stanice su nasađene na mikrotitarske ploče u koncentraciji od 1×10^4 stanica/ml u volumenu od 200 μ l. Nakon nasađivanja stanične suspenzije u jažice odrađeno je centrifugiranje kako bi se stanice agregirale i formirale sferoide. Ploče sa stanicama su centrifugirane na 1100 rpm tijekom 10 minuta (Eppendorf centrifuga: model 5804/5804 R). Nakon centrifugiranja stanice su ostavljene u inkubatoru kako bi se formirali sferoidi na 37 °C i 5 % CO₂. Stanični sferoidi su uzgajani tijekom 8 i 13 dana u dva seta. Jednom setu je mijenjan medij svakih nekoliko dana, dok je drugi set staničnih sferoida uzgojen bez izmjene medija. Po završetku uzgoja stanični sferoidi su skupljani za analize kolorimetrijskog određivanja ATP-a, LDH (laktat dehidrogenaza) te određivanja mitohondrijskog potencijala.

4.3.4. Kolorimetrijsko određivanje ATP-a

Pomoću ATP Assay Kit-a (abcam, Cambridge, UK) jednostavno se kvantificira ukupni ATP u tkivnim ili staničnim lizatima, biološkim tekućinama i krvnim stanicama. Analiza se temelji na fosforilaciji glicerola koji se onda može lako kolorimetrijski izmjeriti na valnoj duljini od 515 nm. Fosforilizirani glicerol proporcionalan je količini prisutnog ATP-a (29).

Za određivanje ATP statusa u staničnim sferoidima oni su prikupljeni iz 32 jažice za analizu. Praćene su upute proizvođača ATP Assay Kit (abcam, Cambridge, UK) za kolorimetrijsko određivanje ATP-a. Na stanične sferoide je dodan ATP pufer za lizu stanica, odrađeno je centrifugiranje (1500 rpm, 6 min, 4°C) te je zatim supernatant prikupljen u novu tubicu. Uzorak je deproteiniziran perklornom kiselinom u konačnoj koncentraciji od 1 M te je neutraliziran sa kalijevim hidroksidom dodanim u 30 %-tnom volumenu od ukupnog volumena u koncentraciji od 2 M. Ponovljeno je centrifugiranje te odvajanje supernatanta u novu tubicu i pripremljen za analizu na ploči od 96 jažica. Na pripremljene uzorke dodan je reakcijski miks koji se sastoji od ATP pufera, ATP probe, ATP pretvarača i razvijača boje. Pozadinska reakcija pripremljena je kao i ATP reakcijska smjesa, ali bez ATP pretvarača. Iz ATP standarda je pripremljen ATP standardni pravac u koncentracijama od 0 do 10 nmol po jažici. Reakcijska smjesa inkubirana je 30 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi, te je apsorbancija izmjerena na čitaču mikroploča (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) na 515 nm.

Koncentracija ATP-a izračunata je pomoću sljedeće formule:

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

U kojoj je:

B- količina ATP-a u uzorku dobivena iz standardnog pravca

V- volumen uzorka

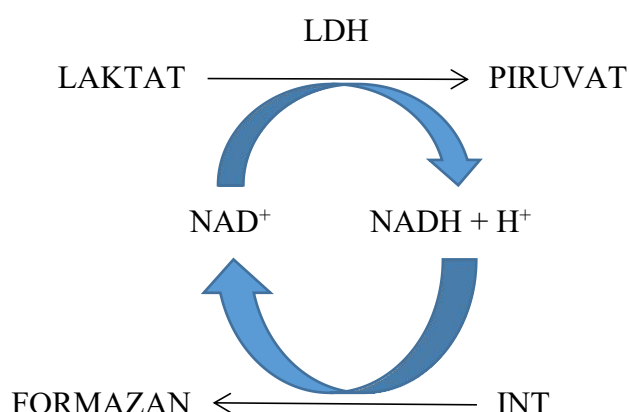
D- faktor razrjeđenja

DDF- deproteinizacijski faktor razrjeđenja izračunat prema uputama proizvođača kita

4.3.5. LDH analiza

LDH se nalazi u svim stanicama u organizmu, redovito u citoplazmi. Pri gubitku integriteta stanične membrane, oslobađaju se citoplazmatski enzimi. Zbog toga se LDH koristi radi otkrivanja ili praćenja oštećenja tkiva. Analizom LDH se, između ostaloga, mogu pratiti različiti poremećaji koji dovode do nedostatka kisika i izumiranja stanica. Aktivnost enzima direktno je proporcionalna sa brojem stanica sa oštećenom staničnom membranom (30). Upravo zbog toga je korištena ova metoda jer se očekuje zona hipoksije i nekroze u središtu staničnog sferoida (23).

LDH se otpušta u stanični supernatant prilikom oštećenja stanične membrane. Korištenjem kita za određivanje aktivnosti LDH (LDH Cytotoxicity Detection Kit, TAKARA BIO INC.) kolorimetrijski se određuje citoliza stanica kvantitativno mjereći aktivnost LDH u staničnom supernatantu. Aktivnost LDH se određuje putem dvo-stupanjske enzimatske reakcije (Slika 3.).



Slika 3. Dvo-stupanjska enzimatska reakcija za određivanje aktivnosti LDH (autor izradio sliku)

U prvom koraku, LDH katalizira konverziju laktata u piruvat pri čemu se NAD reducira u NADH/H⁺. U drugom koraku, diaforaza prenosi H/H⁺ sa NADH/H⁺ na žutu tetrazolijevu sol INT pri tome ju reducirajući u crveni formazan. Porast u broju mrtvih ili stanica sa oštećenom membranom rezultira u povećanoj aktivnosti enzima LDH u staničnom supernatantu. Porast aktivnosti LDH direktno korelira sa količinom nastalog formazana, odnosno količina nastale crvene boje proporcionalna je broju oštećenih stanica. Analiza mora sadržavati i kontrole,

nisku i visoku. Za nisku kontrolu koristi se svježi medij, dok se za visoku kontrolu koristi medij sa sferama tretiran sa 1 % Triton X detergentom kako bi se dobila maksimalna vrijednost aktivnosti LDH (31).

Na dan analize 100 µl supernatanta preneseno je na ploču sa 96 jažica te je inkubirano 4 sata u CO₂ inkubatoru sa 100 µl otopine C koja je nastala miješanjem otopine A (katalizator diaforeza/NAD⁺) i otopine B (INT boja) prema uputama proizvođača kita. Po završetku inkubacije apsorbancija je izmjerena na čitaču mikroploča (iMark, BIO RAD, Hercules, CA, USA) na 515 nm.

Za izračun zastupljenosti LDH u mediju korištena je sljedeća formula:

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

U kojoj je:

A stanični supernatant- medij prikupljen sa sfera

A niska kontrola- svježi medij

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

4.3.6. Određivanje aktivnosti mitohondrija

Mitohondrij je glavni izvor energije u stanicama. Većina aktivnosti mitohondrija ovisi upravo o membranskom potencijalu unutarnje membrane mitohondrija. Analiza mitohondrijskog membranskog potencijala koristi se za procjenu funkcije mitohondrija.

Prikupljeni su stanični sferoidi iz 28 jažica u svrhu određivanja mitohondrijskog membranskog potencijala koji su inkubirani u različitim vremenskim intervalima sa izmjenom i bez izmjene medija. Stanični sferoidi su isprani sa PBS-om te su se razdvojili na pojedinačne stanice tako što su se ostavile 3 minute pod tripsinom. Inaktivacija tripsina je izvršena pomoću svježeg medija, te je isti uklonjen sa stanica nakon centrifugiranja. Za određivanje mitohondrijskog membranskog potencijala korišten je TMRE Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (abcam, Cambridge, UK). Stanice dobivene od staničnih

sferoida inkubirane su TMRE bojom u koncentraciji od 200 nM kroz 30 minuta u CO₂ inkubatoru. Nakon završetka bojenja sa stanica je uklonjena boja te su stanice resuspendirane u PBS-u. Intenzitet fluorescencije izmjeren je na čitaču mikroploča (Spark, Tecan) pri Ex/Em = 530/580.

4.3.7. Statističke metode

Rezultati dobiveni analizama prikazani su kao srednje vrijednosti više ponovljenih mjerenja. Dobiveni podatci analizirani su korištenjem jednosmjernog ANOVA testa uz statističku značajnost postavljenu na $P < 0,05$. Normalnost razdiobe dobivenih podataka određena je Kolmogorov – Smirnova testom i Shapiro-Wilkovim testom. Usporedba više skupina podataka napravljena je post-hoc Scheffé metodom, studentovim Newman – Keuls i Tukey – Kramer testovima. Statistička analiza podataka određena je pomoću statističkog programa MedCalc® Statistical Software version 20.112 (32).

5. REZULTATI

5.1. Kolorimetrijsko određivanje ATP-a

Najveću koncentraciju ATP-a imaju D54 sfere kojima je medij redovno mijenjan kroz osam dana koja iznosi 0,138 nmol/ μ l. Za razliku od sfera koje su uzgajane kroz osam dana bez izmjene medija kod kojih je zabilježena najniža koncentracija ATP-a od 0,008 nmol/ μ l. Sfere koje su uzgajane kroz duži vremenski period pokazale su veću koncentraciju ATP-a bez izmjene medija od 0,065 nmol/ μ l, nasuprot sferama kojima je mijenjan medij sa 0,023 nmol/ μ l ATP-a (Tablica 1).

Tablica 1. Zastupljenost ATP-a u D54 staničnim sferoidima

Uvjeti uzgoja	Uzgoj 8 dana	Uzgoj 13 dana
Bez izmjene medija	0,008 nmol/ μ l	0,065 nmol/ μ l
Sa izmjenom medija	0,138 nmol/ μ l	0,023 nmol/ μ l

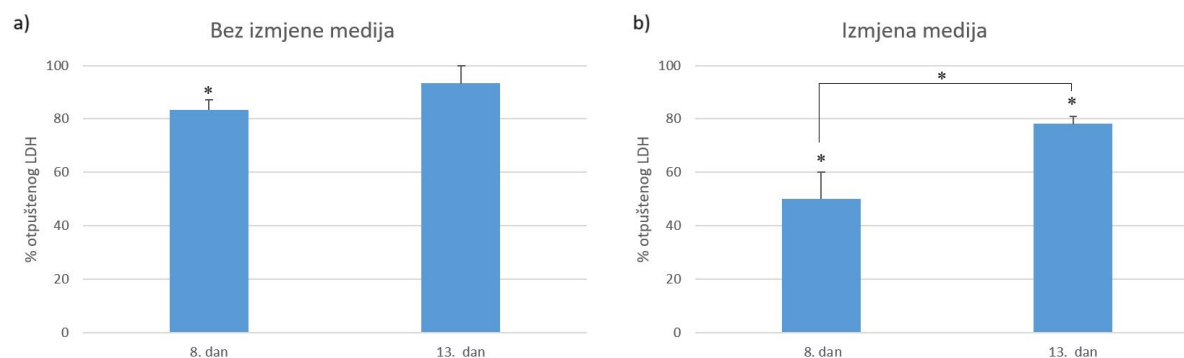
5.2. LDH analiza

Kako bi se procijenio integritet stanične membrane izmjerena je postotna zastupljenost LDH u mediju nakon 8 i 13 dana uzgoja D54 sfera. Jednom setu sfera medij se redovno izmjenjivao, dok je drugi set sfera uzgajan s redukcijom nutrijenata bez izmjene medija. Prikazan postotak LDH na Slici 4. predstavlja otpušteni LDH iz medija sfera u odnosu na maksimalno otpušten LDH (visoka kontrola) nakon tretmana sfera sa Triton-X-om.

D54 sfere uzgajane bez izmjene medija kroz osam dana pokazuju statistički značajan postotak otpuštenog LDH od 83,3 % \pm 3,8. Za razliku od sfera koje su uzgajane kroz duže vrijeme od 13 dana vidljiv je gotovo maksimalni postotak otpuštenog LDH u mediju za uzgoj (Slika 4 a)).

Sfere kojima se redovno izmjenjivao medij, nakon 8 dana uzgoja zabilježen je statistički značajan postotak otpuštenog LDH od 50,1 % \pm 9,9 u odnosu na visoku kontrolu. Određena je

statistički značajna aktivnost LDH u mediju za uzgoj stanica nakon 13. dana od $78,1 \% \pm 2,7$ u odnosu na visoku kontrolu. Također, međusobnom usporedbom otpuštenog LDH iz sfera kojima je mijenjan medij, zabilježen je statistički značajan postotak otpuštenog LDH nakon 13 i nakon 8 dana (Slika 4 b)).

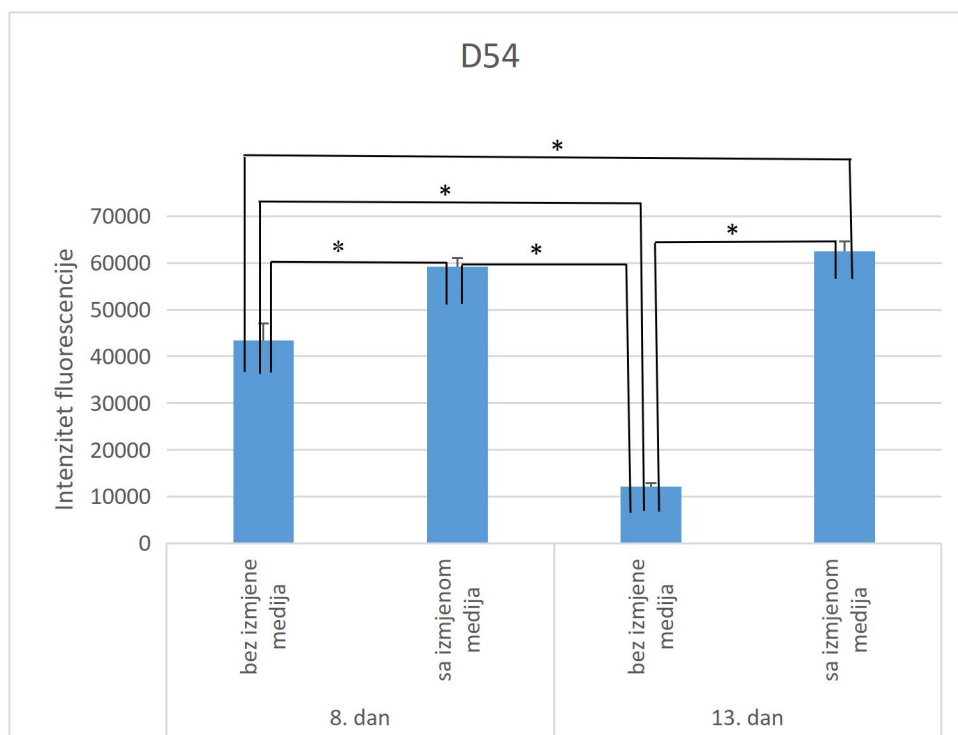


Slika 4. Zastupljenost LDH u mediju za uzgoj D54 sfera. Grafovi prikazuju postotni udio LDH u mediju sfera uzgajanih kroz 8 i 13 dana. Slika predstavlja: a) sfere kojima se medij nije mijenjao i b) sfere kojima se redovno mijenjao medij. Postotak LDH prikazan je u odnosu na maksimalno otpušteni LDH iz sfera tretiranih sa Triton-X (visoka kontrola).

Statistička značajnost (*) $P < 0,05$.

5.3. Određivanje aktivnosti mitohondrija

Aktivnost mitohondrija procijenjena je promjenom intenziteta TMRE fluorescentne boje koja se nakuplja u aktivnim mitohondrijima. Pad intenziteta fluorescencije odraz je narušenog mitohondrijskog potencijala i smanjene aktivnosti mitohondrija. D54 sfere koje su uzgajane sa izmjenom medija u oba vremenska perioda pokazuju statistički značajan intenzitet fluorescencije u odnosu na sfere kojima se nije izmjenjivao medij. Sfere bez izmjene medija nakon osam dana pokazuju statistički nižu fluorescenciju od sfera uzgajanih kroz isti period uz izmjenu medija. Pri čemu sfere nakon produženog vremena inkubacije kroz trinaest dana pokazuju statistički značajan pad fluorescencije u odnosu na sve promatrane grupe sfera (Slika 5).



Slika 5. Procjena aktivnosti mitohondrija u D54 sferama. Graf prikazuje intenzitet fluorescencije TMRE boje izmjereno 8. i 13. dan kod staničnih sferoida sa i bez izmjene medija. Statistička značajnost (*) $P < 0,05$.

6. RASPRAVA

Rak je jedna od najistraživanijih bolesti današnjice. To se može pripisati činjenici da je rak jedna od vodećih bolesti koja napada sve dobne skupine. Napredak znanosti i moderna tehnologija omogućili su ljudima da za mnoštvo bolesti imaju jednostavan i efikasan lijek, no to nije slučaj i za rak. Nastanak tumora uključuje složene procese koji su najčešće uzrokovani genetskim oštećenjem, ali još uvijek se ne razumije točan način nastanka raka. Zbog toga se radi na poboljšanju njegova liječenja. Unatoč drastičnom povećanju u broju istraživanja i napretku na polju liječenja, to je i dalje nedostatno te su rakovi jedni od vodećih uzroka smrti. Prema Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo, u 2019. godini tumorska su oboljenja drugi vodeći uzrok smrti nakon bolesti srca i krvnih žila (33).

Glioblastom je tumor mozga koji pripada grupi brzo rastućih tumora zbog sklonosti dobroj vazkularizaciji što dovodi do opskrbljivanja stanica tumora hranjivim tvarima omogućavajući im proliferaciju. Stanice glioblastoma, kao i mnogi drugi tumori, energiju proizvode putem glikolize, a ne putem oksidativne fosforilacije, što se naziva "Warburg efekt". On rezultira nakupljenjem laktata neovisno o dostupnosti kisika (34). Iako su prisutna opsežna istraživanja, efikasno liječenje glioblastoma i dalje je nepoznanica (35, 36). Mnoga istraživanja su dokazala kako su stanični sferoidi puno pogodniji za onkološka i terapijska istraživanja od klasičnih 2D kultura stanica jer je otežana difuzija lijekova u stanične sferoide što se realnije slaže sa stvarnim interakcijama in vivo (37). Potreba za razvojem 3D staničnih modela koji bi u što većem obimu oponašali tumore in vivo od velikog su značaja, gdje se kultura D54 stanične linije pokazala kao jednom od dobrih kandidata (8). Za uspostavljanje prikladnih tumorskih modela potrebno je odrediti opće karakteristike samog modela.

Kako bi utvrdili dolazi li do promjene energetskeg statusa u sferama različitih veličina, D54 sfere uzgajane su kroz osam i trinaest dana. Kako bi odredili dolazi li do promjene energetskeg statusa sferoida uzgajanih sa redukcijom i bez redukcije nutrijenata analizirali smo koncentraciju ATP-a, zastupljenost LDH u mediju i aktivnost mitohondrija.

Dobiveni rezultati na temelju ATP koncentracije idu u prilog sferama koje su uzgajane kroz 8 dana uz stalnu izmjenu medija. Nasuprot stanicama koje su uzgajane kroz duže vrijeme gdje je vidljivo smanjenje ATP-a u odnosu na stanice koje su uzgajane kroz osam dana. Sfere koje su uzgajane bez stalnog izvora nutrijenata pokazuju vrlo nisku koncentraciju ATP-a, gdje su daljnje analize pokazale odumiranje stanica sfera koje se povećava produženim vremenom uzgoja.

Integritet stanične membrane procijenjen je postotkom otpuštenog LDH u mediju za uzgoj sfera. Rezultati upućuju na značajno narušen integritet stanične membrane u stanicama koje su uzgajane kroz 13 dana iako su imale stalni pristup nutrijentima u odnosu na stanice koje su uzgajane u kraćem vremenskom periodu. Kod sfera bez izmjene medija integritet stanične membrane u većini stanica je narušen neovisno o vremenu uzgoja. Do visoke razine aktivnosti LDH u mediju doveo je povećan broj mrtvih stanica, odnosno kod sfera kojima nije mijenjan medij došlo je do potrošnje svih hranjivih tvari iz medija te su stanice počele odumirati. Prilikom uzgajanja sfera uz izmjenu medija stanice se unutar sfere smještaju u različite faze rasta. Stanice koje su izložene mediju i hranjivim tvarima, odnosno vijabilne stanice koje se nalaze u S fazi rasta, nalaze se u vanjskom sloju sferoida (23). Nakon njih slijedi hipoksična zona te zona nekroze sa nekrotičnim stanicama koje zbog svog položaja unutar sfere ne dobivaju dovoljno hranjivih tvari te odumiru. Kako su istraživanja pokazala, porastom same sfere, raste i zona nekroze u središtu (38). Stoga, kod sfera kojima je mijenjan medij najvjerojatnije je došlo do rasta samih sfera te je time proširena i zona nekroze u središtu sfere čime je povećana prisutnost ovog enzima, ali u manjem obimu nego kod sfera kojima nije mijenjan medij.

Iako sfere koje su uzgajane kroz 13 dana uz izmjenu medija odražavaju aktivnost mitohondrija gotovo kao i sfere nakon 8 dana, zabilježena je manja koncentracija ATP-a kao i otpuštenog LDH iz većine stanica sfera. Kao takvi mitohondriji predstavljaju dinamički sustav organela koje stanice tumora koriste kako bi zadovoljile energetske potrebe u nepovoljnim uvjetima. Stanice tumora podliježu različitim procesima u smjeru preživljenja i povećane otpornosti na kemoterapiju održavajući svoju agresivnost. Jedan od procesa je autofagija koja uključuje degradaciju disfunkcionalnih mitohondrija putem mitohondrijske autofagije (mitofagije), citoprotektivnog procesa koji kontrolira proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. reactive oxygen species) i eliminaciju oštećenih mitohondrija. Istraživanje provedeno na stanicama glioblastoma ukazuje na povezanost mehanizma preživljenja putem mitohondrijske NIX-posredovane mitofagije unutar hipoksične zone glioblastoma (39).

Dobiveni rezultati intenziteta fluorescencije TMRE boje ukazuju na statistički značajniju aktivnost mitohondrija u sferama kojima se stalno izmjenjivao medij. Medij za uzgoj je vrlo važan čimbenik pri uspostavljanju kulture stanica te se on odabire na osnovi potreba koje ciljane stanice imaju za određenim nutrijentima i faktorima rasta. U medij se često dodaje i mala količina seruma te se on uobičajeno dodaje u medij u koncentraciji od

10 % kako bi se potaknuo stanični rast. To je supernatant zgrušane krvi te u sebi sadrži neophodne sastojke za proliferaciju stanica. On u sebi sadrži faktore rasta, proteine, elemente u tragovima, vitamine te hormone. Najčešće se koriste goveđi ili konjski serum, a također se koristi i teleći serum. U ovom istraživanju je korišten goveđi serum. Konstantna izloženost takvom jednom mediju staničnoj kulturi omogućuje opskrbu svim hranjivim tvarima i faktorima rasta koji joj omogućuju stalan rast i proliferaciju. To se postiglo u setovima staničnih sferoida kojima je mijenjan medij i koji su dobivali svježi medij te nisu potrošili hranjive tvari iz medija. Samim time ti stanični sferoidi pokazuju veću aktivnost mitohondrija za razliku od staničnih sferoida kod kojih se značajno gubi aktivnost mitohondrija uzrokovano dugotrajnim izgladnjivanjem.

Sfere dobivene od D54 stanica glioblastoma upućuju na ovisnost energetskeg statusa o izvoru nutrijenata kao i veličini sfera. Sfere sa najvišim energetskeim statusom pokazale su se sfere koje su uzgajane kroz osam dana uz izmjenu medija. Sfere koje su izgladnjivane pokazale su gubitak staničnog integriteta uz pad energetskeg statusa neovisno o vremenu uzgoja.

7. ZAKLJUČAK

Provedenim istraživanjem dolazimo do sljedećih zaključaka:

- D54 sfere koje su uzgajane uz stalnu izmjenu medija pokazuju bolji energetske status nakon osam dana uzgoja u odnosu na produženo vrijeme uzgoja od trinaest dana
- Sfere kojima je reducirana izvor nutrijenata odražavaju energetske disbalans koji se povećava kroz vrijeme uzgoja
- Produženo vrijeme uzgoja sfera dovodi do smanjenja energetske statusa
- Najveći utjecaj na pad energetske statusa u sferama pokazala se dostupnost nutrijenata u mediju za uzgoj

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Odrediti utječe li veličina sfera i dostupnost nutrijenata na energetske status sferoida formiranih od stanica D54 glioblastoma.

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

Materijal i metode: Uzgojene su sfere od komercijalno dostupne stanične linije glioblastoma D54. Sfere su uzgajane kroz 8 i 13 dana kako bi se osigurao rast i formiranja sfera. Jednom setu sfera redovno je mijenjan medij, dok je drugi set sfera uzgajan bez izmjene medija. Procjena energetskog statusa sfera uzgajanih pod različitim uvjetima određena je pomoću kolorimetrijskog ATP testa, postotkom otpuštenog LDH u mediju i mjerenjem intenziteta TMRE boje u ovisnosti o aktivnosti mitohondrija. Analiza podataka je napravljena jednosmjernom ANOVA analizom korištenjem MedCalc programa.

Rezultati: Kolorimetrijskom analizom utvrđena je najviša koncentracija ATP-a u sferama nakon 8 dana uzgoja uz stalnu izmjenu medija u odnosu na ostale setove sfera. LDH analiza ukazuje na narušen integritet stanične membrane kod sfera koje su uzgajane bez izmjene medija, koje se sa povećanjem sfera kroz produženo vrijeme uzgoja povećava. Sfere kojima se redovno izmjenjivao medij dovode do narušenog staničnog integriteta u dijelu stanica, koje se povećava nakon 13. dana. Najviša aktivnost mitohondrija vidljiva je u sferama koje su uzgajane uz stalni izvor nutrijenata, za razliku od sfera koje su izložene redukciji nutrijenata gdje je došlo do pada u fluorescenciji odnosno smanjenoj aktivnosti mitohondrija.

Zaključak: Najviši energetske status zabilježen je u D54 sferama nakon osam dana uzgoja kojima se redovno izmjenjivao medij u odnosu na ostali set sfera. Najveće djelovanje na pad energetskog statusa pokazala se dostupnost nutrijenata iz medija za uzgoj.

Ključne riječi: sfere glioblastoma; ATP; energetske status

9. SUMMARY

Energy status of D54 spheres depending on sphere size and nutrient availability

Objectives: To determine whether the size of the spheres and the availability of nutrients affect the energy status of spheroids formed from D54 glioblastoma cells.

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

Material and Methods: Spheres of the commercially available glioblastoma cell line D54 were cultured. Spheres were cultured for 8 and 13 days to ensure growth and sphere formation. One set of spheres had its medium changed regularly, while the other set of spheres was grown without changing the medium. The evaluation of the energy status of the spheres grown under different conditions was determined using the colorimetric ATP test, the percentage of LDH released in the medium and the measurement of the intensity of the TMRE color depending on the mitochondrial activity. Data analysis was done by one-way ANOVA analysis using the MedCalc program.

Results: Colorimetric analysis determined the highest concentration of ATP in the spheres after 8 days of cultivation with constant medium change compared to other sets of spheres. LDH analysis indicates impaired integrity of the cell membrane in the spheres that were grown without changing the medium, which increases with the increase of the spheres through extended cultivation time. Spheres with regular medium changes lead to impaired cellular integrity in some of the cells, which increases after 13 days. The highest mitochondrial activity is visible in the spheres that were grown with a constant source of nutrients, in contrast to the spheres that were exposed to the nutrient reduction, where drop in fluorescence was noticed, i.e. reduced mitochondrial activity.

Conclusion: The highest energy status was recorded in D54 spheres after 8 days of growing, with regular media changes compared to the other set of spheres. The availability of nutrients from the medium proved to have the greatest impact on the decline in energy status.

Key words: glioblastoma spheres; adenosine triphosphate; energy status

10. LITERATURA

1. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS i sur. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2014;23:1985–1996.
2. Opačak-Bernardi, Teuta. EFFECT OD dnMAML PEPTIDE ON GLIOBLASTOMA CELLS, doktorska disertacija, Poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij molekularnih bioznanosti, Osijek, 2013.
3. Jäkel S, Dimou L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:24.
4. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, i sur. *Neuroscience*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001.
5. Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi MS, Simjee US. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *National Library of Medicine*. 2017;18(1):1–7.
6. Hochberg, F. H., Pruitt, A., Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurology*30. 1980, 907–911.
7. Lah TT, Novak M, Breznik B. Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases. *Semin Cancer Biol*. 2020;60:262-273. doi:10.1016/j.semcancer.2019.10.010
8. Arthurs AL, Keating DJ, Stringer BW, Conn SJ. The Suitability of Glioblastoma Cell Lines as Models for Primary Glioblastoma Cell Metabolism. *Cancers*. 2020; 12(12):3722. <https://doi.org/10.3390/cancers12123722>
9. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C i sur. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro-oncol* 2016;18:1–75.
10. Ellor SV, Pagano-Young TA, Avgeropoulos NG. Glioblastoma: Background, standard treatment paradigms, and supportive care considerations. *Journal of Law, Medicine, and Ethics*. 2014;42:171–182.

11. Porter, K. R., McCarthy, B. J., Freels, S., Kim, Y., Davis, F. G., 2010. Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by age, gender, behavior, and histology. *Neuro-oncology*, 12(6), pp.520–527.
12. Koruga, Nenad. Pojavnost neurotropnih virusa u glioblastoma i utjecaj na kliničku sliku i ishod liječenja. Doktorska disertacija. Osijek, 2020.
13. Wen, P. and Kesari, S., 2008. Malignant gliomas in adults. *New England Journal of Medicine*, 359, pp.492-507.
14. Contreras-Ochoa C, López-Arellano M, Roblero-Bartolon G, et al. Molecular mechanisms of cell death induced in glioblastoma by experimental and antineoplastic drugs: New and old drugs induce apoptosis in glioblastoma. *Human & Experimental Toxicology*. April 2020:464-476. doi:10.1177/0960327119892041
15. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006 Dec 7;444(7120):756-60. Epub 2006 Oct 18.
16. Bigner SH, Bullard DE, Pegram CN, Wikstrand CJ, Bigner DD. Relationship of in vitro morphologic and growth characteristics of established human glioma-derived cell lines to their tumorigenicity in athymic nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1981 Jul;40(4):390-409.
17. Cell culture basics handbook. 2016. Dostupno na adresi:
<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/lifesciences/CellCultureandTransfection/pdfs/Gibco-Cell-Culture-Basics-HandbookGlobal.pdf>
18. Duval K, i sur. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)* 2017; 32(4): 266 – 277.
19. Janić, Ivana. Modeliranje staničnih sferoida različitim metodama *in vitro*. Završni rad. Osijek, 2019.
20. Haycock JW. 3D Cell Culture: a review of current approaches and techniques. *Methods Mol Biol*. 2011; 695: 1 - 15.

21. Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22):12200. doi:10.3390/ijms222212200
22. Jukić, Marijana. Protutumorski učinci novih N-9-sulfonilpurinskih derivata *in vitro*. Doktorska disertacija. Osijek, 2017.
23. 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):207-218. doi:10.1089/adt.2014.573
24. Lee H, Zandkarimi F, Zhang Y, et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis. *Nat Cell Biol.* 2020;22(2):225-234. doi:10.1038/s41556-020-0461-8
25. Tantama M, Martínez-François JR, Mongeon R, Yellen G. Imaging energy status in live cells with a fluorescent biosensor of the intracellular ATP-to-ADP ratio. *Nat Commun.* 2013;4:2550. doi:10.1038/ncomms3550
26. Kero, Ivana. Razvoj metode za analizu adenozin-fosfata u ljudskoj krvi. Diplomski rad. Zagreb, 2021.
27. Cooper GM, Hausman RE. Stanica: molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
28. Špoljarić KM, Jukić M, Opačak-Bernardi T, Glavaš-Obrovac L. 3D Cell Technology in Biomedical Research. *Coll Antropol.* 2020;44(3):171–4.
29. Abcam. ATP Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric). 2022;2-21.
30. Leović, Jasna. Protutumorski učinci novih N-9-sulfonilpurina. Diplomski rad. Osijek, 2016.
31. Takara Bio Inc. LDH Cytotoxicity Detection Kit. Product manual. 3-16.
32. MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2022
33. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2019., Bilten 44, Zagreb, 2021.
34. Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 1956, 123, 309–314.

35. Pažanin L. Histopatologija glijalnih tumora mozga. Pregledni članak. Zagreb, 2011.
36. Trogrlić I, Trogrlić D. Glioblastom. Dostupno na adresi: http://www.dren-trogrlic.com/images/staridoc/tumori_mozga/vrste/5.glioblastom.pdf Datum pristupa: 03.09.2022.
37. 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.
38. Barisam M, Saidi MS, Kashaninejad N, Nguyen NT. Prediction of Necrotic Core and Hypoxic Zone of Multicellular Spheroids in a Microbioreactor with a U-Shaped Barrier. *Micromachines (Basel)*. 2018;9(3):94. Published 2018 Feb 25. doi:10.3390/mi9030094
39. Jung J, Zhang Y, Celiku O, et al. Mitochondrial NIX Promotes Tumor Survival in the Hypoxic Niche of Glioblastoma. *Cancer Res*. 2019;79(20):5218-5232. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-0198

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Matej Ruška

Datum rođenja: 11.07.1998.

Adresa: Hvarska 24, Osijek

E-mail: matejruska@gmail.com

Broj mobitela: 0955752288

OBRAZOVANJE

2020.-2022. Medicinski fakultet Osijek, Diplomski sveučilišni studij
Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2017.- 2020. Medicinski fakultet Osijek, Preddiplomski sveučilišni studij
Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2013.- 2017. II. Gimnazija Osijek

2005.- 2013. Osnovna škola Grigor Vitez Osijek

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