

# Morfologija ko-kultiviranih sferoida

---

Kadović, Tin

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:618443>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Tin Kadović**

**MORFOLOGIJA KO-KULTIVIRANIH  
SFEROIDA**

**Završni rad**

**Osijek, 2022.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Tin Kadović**

**MORFOLOGIJA KO-KULTIVIRANIH  
SFEROIDA**

**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. Teuta Opačak - Bernardi

Rad ima 18 listova i 3 slike.

## **ZAHVALA**

*Najviše se zahvaljujem svojoj mentorici doc. Dr. sc. Teuti Opačak-Bernardi na strpljenju, pomoći te pristupačnosti prilikom izrade ovog završnog rada.*

*Hvala članovima Laboratorija za stanične kulture što su omogućili uvjete za nastanak ovog pokusa te za susretljivost i sve savjete koje su mi dali.*

*Zahvaljujem se i svim kolegama i kolegicama koji su bili uz mene ove tri godine studiranja te omogućili da dođem u priliku pisati ovaj rad i dovršiti ga.*

*Veliko hvala zaslužuju moji roditelji, moja sestra, moja baka i svi moji prijatelji koji su učinili ove godine studiranja lakšim dajući mi podršku.*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Tumor.....	1
1.2. Glioblastomi .....	1
1.3. Kulture stanica .....	2
1.4. Stanične linije.....	2
1.5. Izvanstanični matriks .....	2
1.6. Kolagen .....	3
2. CILJEVI .....	4
3. METODE I MATERIJALI .....	5
3.1. Ustroj studije .....	5
3.2. Materijali.....	5
3.2.1. Stanične linije .....	5
3.2.2. Kemikalije.....	5
3.3. Metode .....	6
3.3.1. Kultura i održavanje stanica in vitro.....	6
3.3.2. Brojanje stanica .....	6
3.3.3. Nasađivanje sferoida.....	7
3.3.4. Rezanje sferoida.....	7
3.3.5. Bojanje sferoida .....	7
3.3.6. Mikroskopiranje.....	8
3.4. Statistička obrada podataka.....	8
4. REZULTATI.....	9
5. RASPRAVA.....	12
6. ZAKLJUČAK .....	14
7. SAŽETAK.....	15
8. SUMMARY .....	16
9. LITERATURA .....	17
10. ŽIVOTOPIS .....	18

## **POPIS KRATICA**

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

CT – temperatura komore (engl. *chamber temperature*)

D54 – stanice glioblastoma (engl. *human glioblastoma cells*)

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

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

OT – temperatura objekta (engl. *object temperature*)

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

# 1. UVOD

## 1. UVOD

### 1.1. Tumor

Tumor se ne sastoji isključivo od tumorskih stanica, nego je to heterogeni skup stanica koje se aktivno kreću unutar tumora i izlaze iz njega, izvanstaničnog matriksa te izlučenih faktora. Tumorske stanice iskorištavaju matične stanice obližnjeg tkiva kako bi osigurale da se ključni koraci u razvoju tumora odvijaju. Također, stimuliraju određene molekularne, stanične te fizikalne promjene kako bi poticale rast tumora. Dakle, tumorski mikrookoliš je kompleksna struktura koja se konstantno razvija. Tako tumori da bi savladali prepreke života u kiselj sredini mogu poticati angiogenezu kako bi si osigurali opskrbu kisikom i hranjivim tvarima te se uspješno rješavali štetnih nusprodukata metabolizma. Sastav tumorskog mikrookoliša se razlikuje od tumora do tumora no neke komponente su svima zajedničke (stanice imunološkog odgovora, stromalne stanice, krvne žile i izvanstanični matriks) (1).

Fibroblasti igraju važnu ulogu u interakciji tumorskih stanica sa ostatkom tumorskog mikrookoliša. Izvan tumora, fibroblasti pomažu kod zacjeljivanja rana tako što reverzibilno postaju miofibroblasti te potiču proliferaciju stanica i formaciju izvanstaničnog matriksa. Unutar tumorskog mikrookoliša, fibroblasti proizvode većinu izvanstaničnih komponenti poput faktora rasta, citokina te komponenti izvanstaničnog matriksa. Na taj način fibroblasti potiču proliferaciju samog tumora i metastaza, neoangiogenezu, promjene u izvanstaničnom matriksu te djeluju imunosupresivno. Uz navedene, vrlo važnu ulogu u razvoju tumora imaju i zvjezdaste stanice te adipociti. Tumor regrutira te stanice pomoću lučenja upalnih faktora iz izvanstaničnog matriksa. Osim fibroblasta, za rast i razvoj tumora bitne su i zvjezdaste stanice, adipociti i stanice imunološkog odgovora(1).

### 1.2. Glioblastomi

Glioblastomi su najčešći maligni tumori na mozgu. Primarni glioblastomi su agresivni tumori koji se vrlo brzo razvijaju de novo, najčešće kod starijih pacijenata bez kliničke ili histološke dijagnoze neke manje agresivne, prekursorske lezije. Sekundarni glioblastomi nastaju iz difuznog astrocitoma niskog stupnja ili anaplastičnog astrocitoma te češće zahvaćaju mlađe pacijente. Primarni i sekundarni glioblastomi se ne mogu histološki razlikovati, no vidljive su razlike u njihovim genetskim i epigenetskim profilima. Za primarni glioblastom tipične su mutacije EGFR gena, PTEN mutacije te gubitak 10. kromosoma, dok su za sekundarni glioblastom češće mutacije P53 gena te gubitak kromosoma 19q. No, tek otkrićem IDH1 mutacija kod sekundarnog glioblastoma potvrđeno kako ta dva glioblastoma imaju različit genetski put nastajanja (2,3).



## 1. UVOD

### 1.3. Kulture stanica

Kulture stanica su važan i neizostavan dio otkrivanja lijekova, istraživanja raka te istraživanja matičnih stanica. Danas se većinom koriste 2D kulture stanica, no nove napredne metode izrade 3D kulture stanica omogućavaju bolji uvid u razvoj i ponašanje raka. Za razliku od 2D modela kulture stanica, 3D sferoidi bolje oponašaju značajke tumora poput prostornog rasporeda, odgovara na fiziološke podražaje, lučenja topljivih medijatora, ekspresije gena te mehanizma otpornosti na lijekove. Iz navedenoga je vidljiv potencijal koji nose 3D kulture kao mogući in vitro modeli za razvoj lijekova protiv raka. Također, upotrebom 3D kulture stanica može se smanjiti učestalost eksperimentiranja na životinjama (4). Za promatranje tumora, sve se više koriste 3D stanične kulture. One bolje prikazuju morfologiju te raspored stanica jer u in vivo uvjetima stanice se nalaze u trodimenzionalnim oblicima.

Magnetska levitacija je jedna od metoda stvaranja sferoida. U toj metodi, stanice su tretirane magnetskim nanočesticama koje prodiru u citoplazmu te pod utjecajem magnetske pločice za levitaciju omogućuju da stanice budu sa svih strana okružene medijem potrebnim za rast stanica. Također, u takvim uvjetima stanice zadržavaju svoju aktivnost, što je važno kod promatranja tumorskih stanica kako bi vidjeli što točno te stanice koriste odnosno produciraju svojom aktivnošću te naposljetku može li se u toj staničnoj aktivnosti pronaći lijek za jedan od najvećih problema zdravlja (5,6).

### 1.4. Stanične linije

Stanične linije korištene prilikom izrade ovog završnog rada su D54 (stanična linija glioblastoma) i BJ (stanična linija humanih fibroblasta). D54 stanična je linija nastala iz tumora, odnosno glioblastoma. Prekursorske stanice za nastanak D54 su astrociti (zvjezdaste stanice). D54 su adherentne stanice u kulturi, dakle rastu zalijepljene za podlogu te kao takve zahtijevaju posebne metode održavanja. D54 stanična linija glavnu primjenu ima u uzgoju 3D kultura (7). BJ stanična je linija humanih fibroblasta, te je izolirana iz kože ili kože penisa. Osim primjene u 3D kulturama, također je korisna i u toksikologiji. Stanična kultura je adherentna poput D54 i također zahtijeva određene postupke održavanja (8).

### 1.5. Izvanstanični matriks

Izvanstanični matriks je nestanična komponenta prisutna u svim tkivima i organima. Za razvoj tumora potrebna je interakcija između neoplastičnih stanica i izvanstaničnog matriksa. Tijekom interakcije između tumora i izvanstaničnog matriksa dolazi do remodeliranja mikrookoliša koji okružuje tumor što dovodi do lučenja faktora rasta povezanih s izvanstaničnim matriksom te

## 1. UVOD

oni mogu dalje stimulirati rast tumora (3). Zbog toga je istraživanje utjecaja fibroblasta i netumorskih stanica u tumoru ključno za stvaranje dobrog modela.

### 1.6. Kolagen

Jedan od spojeva kojega tvore tumorske stanice je kolagen. Tumorske stanice mijenjaju raspored i količinu kolagena kako bi utjecale na razne signalne puteve te ih mijenjale kako bi se mogle uspješnije rasti i razvijati. Kolagen utječe na G-proteinske receptore, tirozin-kinaza receptore te tako pomaže tumorskim stanicama u rastu, razvoju te mogućem metastaziranju. Važno je primijetiti da se u ovom eksperimentu količina kolagena povećava u odnosu na veličinu sferoida s vremenom. Dakle, možemo zaključiti da, što je tumor razvijeniji to mu je potrebno više kolagena kako bi nastavio svoj razvoj. Kolagen je jedan od ključnih spojeva kojega tumorske stanice moraju imati u odgovarajućim količinama kako bi ostajale na životu. Jednako tako, kolagen može biti i pokazatelj razvoja tumora i metastaza u organizmu (9).

## 2. CILJEVI

### 2. CILJEVI

1. Uzgoj sferoida pomoću staničnih linija glioblastoma i fibroblasta korištenjem metode magnetske levitacije.
2. Određivanje količine stvorenog kolagena u sferoidima nakon jedan, dva i tri tjedna.

### 3. METODE I MATERIJALI

#### 3. METODE I MATERIJALI

##### 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

Prilikom izrade ovoga rada korištene su dvije komercijalno dostupne stanične linije:

- D54 – stanična linija glioblastoma
- BJ – stanična linija fibroblasta

###### 3.2.2. Kemikalije

- Fosfatni pufer (PBS): NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x7 H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- DMEM, s visokim udjelom glukoze (4,5g/L), uz dodatak L-glutamina (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Fetalni goveđi serum (FBS), dodatak antibiotik-antimikotik (penicilin/streptomycin) 100x; (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Tripsin/EDTA, tripsin 0,25 %, 1mM EDTA- Na<sub>4</sub> u HBSS (Panbiotech GmbH, Aidenbach, Njemačka)
- Eritrozin B, sterilno filtriran (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Magnetske čestice (NANOSHUTTLE-PL.; Greiner, Frickenhausen, Njemačka )
- Medij za kriostat (Tissue Freezing Medium; Leica, Nussloch, Njemačka)
- Aceton (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Ksilol (Carlo Erba Reagents, Emmendingen, Njemačka)
- Alkohol – Histanol (Biognost, Zagreb, Hrvatska)
- Boje:
  - Fuksin (Carlo Erba Reagents, Emmendingen, Njemačka)

### 3. METODE I MATERIJALI

- Orange G (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Fosfomolibden (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Anilin (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Kanada balzam (Carlo Erba Reagents, Emmendingen, Njemačka)

#### 3.3. Metode

##### 3.3.1. Kultura i održavanje stanica in vitro

Stanice su se kultivirale u bočicama za kulturu stanica s površinom rasta od 25 cm<sup>2</sup> (BD, Falcon, Njemačka) te su se inkubirale u inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u kontroliranoj atmosferi na temperaturi od 37 °C uz 5 % CO<sub>2</sub>.

Za potrebe ovog rada, ko-kultivirane su BJ stanične linije humanih fibroblasta te D54 stanične linije glioblastoma.

Stanice se uzgajaju u DMEM mediju i po potrebi tripsiniziraju. Nakon uklanjanja medija, stanice se ispiru PBS-om i inkubiraju s 0,25 % tripsinom u trajanju od 6 minuta. Stanice, odvojene od podloge, skupljaju se u 5 mL svježe pripremljenog medija, te se broje.

##### 3.3.2. Brojanje stanica

Kako bi razlikovali žive od mrtvih stanica, koristi se boja eritrozina. Kod mrtvih stanica dolazi do oštećenja na staničnoj membrani te eritrozin B prodire u unutrašnjost tih stanica i boji ih ružičasto. Žive stanice imaju netaknutu membranu, prema tome ostaju nebojene. Uzima se 50 μL stanične suspenzije kojoj se još dodaje 100 μL eritrozina B i to se sve skupa stavlja na Bürker-Türkovu komoricu za brojanje stanica. Broje se žive stanice, a sljedećom formulom se određuje njihov broj:

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

N – broj stanica

4 – broj polja u komorici

3 – faktor razrjeđenja

### 3. METODE I MATERIJALI

#### 3.3.3. Nasađivanje sferoida

Za nasađivanje sferoida korištena je metoda magnetske levitacije. Kada su stanice dovoljno konfluentne (70-80 %), dodajemo im magnetske nanočestice ( $4\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ) te se inkubiraju 8-12h. Nakon inkubacije stanice je potrebno tripsinizirati i izbrojati. Na ploču sa 24 jažice (Greiner, Frickenhausen, Njemačka) nasađeno je 5000 stanica svake stanične linije (D54 i BJ) u ukupno  $350\mu\text{L}$  medija, dakle konačna gustoća stanica iznosi 10000 stanica/ $350\mu\text{L}$  medija. Na ploču se stavlja magnetska ploča za levitaciju (Greiner; Monroe, SAD) kako bi povukla stanice sa magnetskim česticama i odvojila ih od podloge te omogućila formiranje sferoida koje traje 48-72h . Ako je potrebno, medij se mijenja tijekom trajanja pokusa.

#### 3.3.4. Rezanje sferoida

Nakon uspješnog uzgoja, sferoidi se uklapaju u medij za kriostat. Sferoidi se zatim režu na kriostatu (Cryostat CM30350S, Leica, Nussloch, Njemačka) na temperaturi komore (CT, engl. *chamber temperature*)  $-22\text{ }^\circ\text{C}$  i temperaturi objekta (OT, engl. *object temperature*)  $-22\text{ }^\circ\text{C}$ . Rezovi su bili debljine  $10\mu\text{m}$ . Rezovi su se lijepili na silanizirana predmetna (Menzel-Glaser, Thermo Scientific, Braunschweig, Njemačka) stakalca i fiksirali acetonom.

#### 3.3.5. Bojanje sferoida

Kako bi se prikazala količina kolagena stvorena u sferoidima, korišteno je bojanje po Massonu. To bojanje se sastoji od sljedećih koraka:

1. 10 minuta uroniti u otopinu A (Mallory) koja se sastoji od kiselog fuksina i orange G
2. Ispiranje destiliranom vodom
3. 5 minuta uroniti u otopinu B (1 % fosfomolibdenska kiselina)
4. Ispiranje destiliranom vodom
5. 10 minuta uroniti u otopinu C (2 % anilin u octenoj kiselini)
6. Ispiranje destiliranom vodom
7. Dehidracija 96 %-tnim etanolom i apsolutnim etanolom
8. 5 minuta uroniti u ksilol
9. Dodati kanada balzam i staviti pokrovnicu
10. Nakon bojenja, preparati su spremni za mikroskopiranje i slikanje.

### 3. METODE I MATERIJALI

#### 3.3.6. Mikroskopiranje

Za mikroskopiranje ovih preparata korišten je svjetlosni mikroskop (Carl Zeiss, Axioskop 2MOT, Jena, Njemačka) sa kamerom Olympus DP70 (Olympus DP70, Optical Olympus, Japan). Preparati su mikroskopirani i slikani pod povećanjem od 100x i 200x.

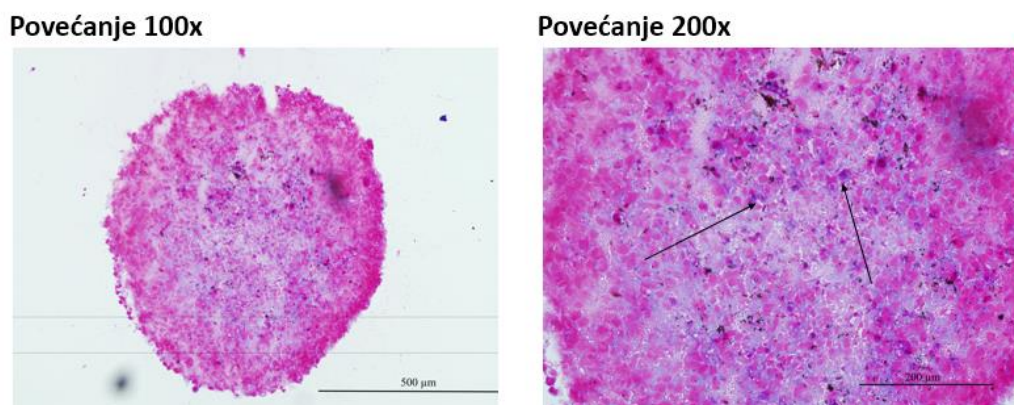
#### 3.4. Statistička obrada podataka

Kako bi se slike kvantificirale te došlo do rezultata korišten je računalni program ImageJ (Fiji 101) (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SAD). Prvo se analizom slika odredi ukupna količina piksela na slici i količina piksela koji predstavljaju prazan dio slike, kako bi dobili veličinu samog sferoida zatim se odredi količina piksela koji predstavljaju kolagen te se pomoću formule: pikseli kolagena / (ukupni pikseli – pikseli praznog dijela slike) dobije brojčana vrijednost prisutnog kolagena po promatranom rezu. Rezultati analize slika obrađeni su pomoću programa Statistica 12. Prvo je normalnost distribucije testirana Shapiro-Wilk testom, te je korišten T-test uz razinu značajnosti  $P=0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4. REZULTATI

Promatrana je količina kolagena u sferoidima nastala nakon 7, 14 i 21 dan. Sferoidi su nakon tjedan dana rasta vrlo kompaktni i stanice su zbijene. Kolagen koji se ovim načinom bojanja boja plavo, za razliku od stanica koje su obojene ružičasto i crveno, može se pri većem povećanju lijepo vidjeti u obliku tankih niti. Također vidljive su zone u kojima je plava boja manje izražena ali prisutna što bi moglo ukazati na početak sinteze izvanstaničnog matriksa. (Slika 1).

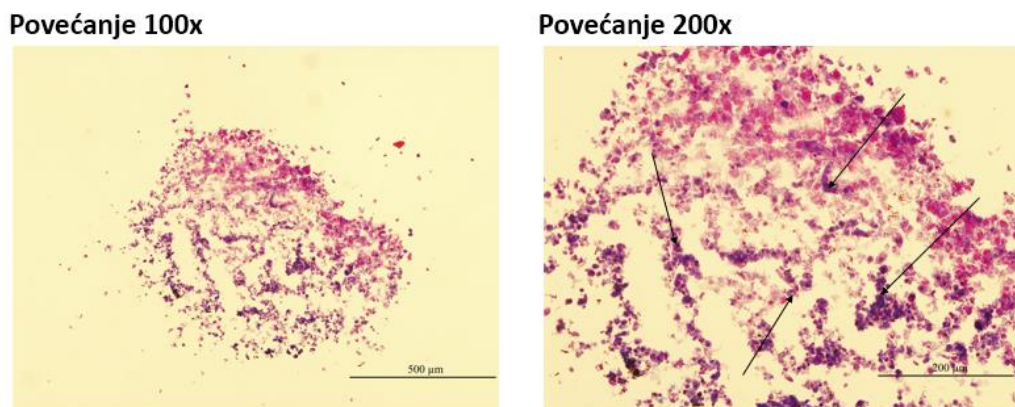


**Slika 1.** Prikaz sferoida bojenih metodom po Massonu nakon 1. tjedna. Povećanja su 100x i 200x. Strjelicama je označen kolagen.

Nakon dva tjedna rasta u kulturi dolazi do smanjenja kompaktnosti sferoida, te se on polako počinje raspadati. To je rezultat povećanih zahtjeva za hranom i velike koncentracije stanica. Sferoidi gube svoju kompaktnost i strukturu ali su još dovoljno čvrsti da ih se može rezati i bojati. U unutrašnjosti sferoida ima praznina, a stanice su obavijene slojem izvanstaničnog matriksa s kolagenom, što je vidljivo iz ljubičastog obojenja (Slika 2).



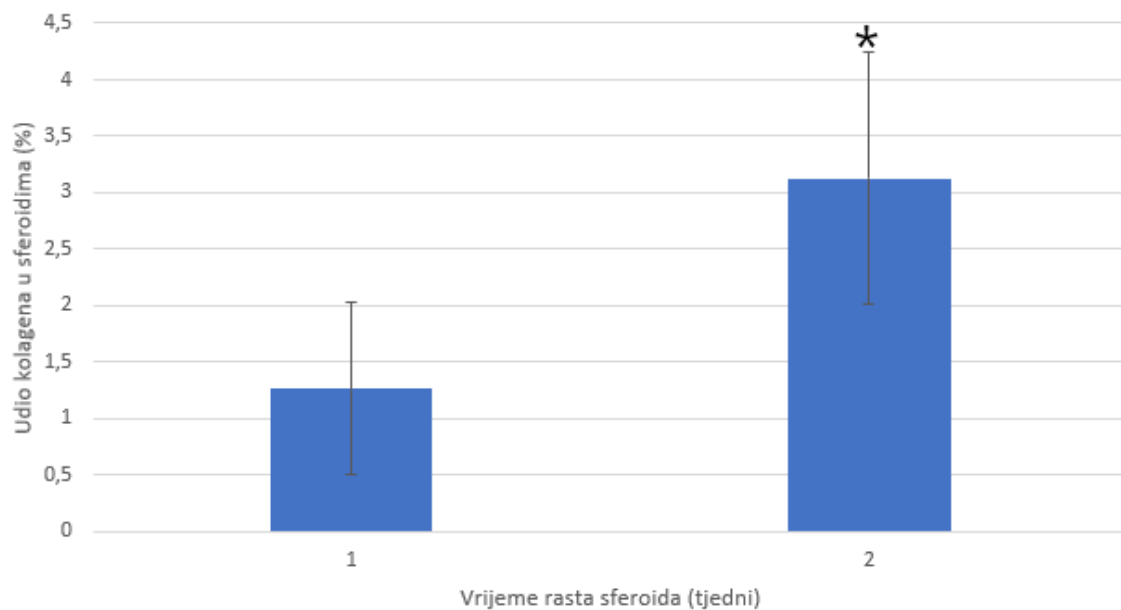
## 4. REZULTATI



**Slika 2.** Prikaz sferoida bojenih po Massonu nakon 2. tjedna. Povećanja su 100x i 200x. Strjelicama je označen kolagen.

Nakon 3 tjedna u kulturi uvjeti rasta su bili toliko nepovoljni da su se sferoidi u potpunosti raspali te ih nije bilo moguće obraditi. Za duže vrijeme uzgoja potrebno je sferoide trajno držati u magnetskom polju, povećati volumen medija i učestalost njegove izmjene. Analizom slika dobivena je količina kolagena prikazana obrađena je statistički i pokazano je da je količina kolagena u sferoidima statistički značajno različita između prvog i drugog tjedna. Tijekom rasta sferoida u kulturi došlo je povećanja količine kolagena (Slika 3).

#### 4. REZULTATI



**Slika 3.** Graf prikazuje srednju vrijednost ( $\sigma_1=1,145$ ,  $\sigma_2=0,7555$ ) udjela kolagena u sferoidima za 1. i 2. tjedan. Stupac označen brojem 1 predstavlja 1. tjedan, stupac označen brojem 2 predstavlja 2. tjedan. Zvezdica iznad stupca označenim brojem 2 predstavlja statistički značajnu razliku u količini kolagena između prvog i drugog tjedna rasta sferoida.

## 5. RASPRAVA

### 5. RASPRAVA

Glioblastom je najčešći i najagresivniji maligni tip tumora na mozgu kod odraslih te čini 16 % neoplazmi nastalih na mozgu i u središnjem živčanom sustavu (3). Dijelev se na primarni i sekundarni, gdje primarni čini 90 % nastalih glioblastoma. Također, primarni glioblastom se razvija bez prisustva neke manje maligne prekursorske lezije, razvija se brže i teže je liječiv od sekundarnog glioblastoma (2).

Izvanstanični matriks je prepoznat kao ključan faktor u rastu i razvoju tumora. Jedan od glavnih dijelova izvanstaničnog matriksa je kolagen. Kolagen XI je manji kolagen čija je glavna uloga regulacija dužine kolagenskih vlakana.  $\alpha 1$  lanac kolagena XI je pronađen kod mnogih poremećaja vezanih uz mišiće i kosti. Novija istraživanja pokazuju važnost  $\alpha 1$  lanca kolagena XI kod mnogih vrsta karcinoma te njegovu ulogu prilikom metastaziranja, razvoja otpornosti na lijekove i angiogeneze. Također je dokazano da karcinomi višeg stupnja razvoja imaju promijenjeni  $\alpha 1$  lanac kolagena XI. Kao takav važan dio razvoja i rasta tumora,  $\alpha 1$  lanac kolagena XI se sve više ispituje kao jedno od mogućih rješenja glavnog problema svjetskog zdravlja, odnosno liječenja raka (10.)

Rezultati ovoga rada se podudaraju s očekivanjima, odnosno vidljivo je da tumor kako raste sve više treba kolagen za daljnji napredak. U 2. tjednu rasta sferoida vidljiv je porast samog sferoida te porast udjela kolagena u sferoidu. Važnost kolagena za rast i razvoj tumora opisana je u istraživanju koje su proveli Provenzano i suradnici. Oni su kultivirali tumorske stanice raka dojke u gelu obogaćenom s različitim udjelima kolagena te su došli do zaključka da je došlo do veće proliferacije stanica koje su rasle u gelu s većom koncentracijom kolagena (11). Uloga kolagena u razvoju tumora prikazana je u radu koji su napravili Egebald i suradnici. Oni su proučavali količinu i kakvoću kolagena premalignim lezijama te u karcinomima. Vidljive su promjene u količini, ali i strukturi kolagena prisutnog kod karcinoma, došlo je do promjene prije navedenog  $\alpha 1$  lanca kolagena XI. Kao i u ovom radu, kod razvijenijih tumora dolazi do veće potrebe za kolagenom, a time i proizvodnje kolagena (12).

Tumorske stanice uzgojene u 3D kulturama, poput sferoida uzgojenih u ovom istraživanju, odgovaraju na promjene okoline u kojoj se nalaze. U našem slučaju, to je okolina idealna za rast i razvoj tumora. Međutim, ta okolina ima svoja ograničenja i sferoid dok raste pitanje je vremena kada će prerasti i okolinu u kojoj se nalazi. Također, sferoidi su uzgojeni pomoću magnetskih čestica i one su ih držale na okupu. Činjenica da su se sferoidi raspali nakon 3 tjedna

## 5. RASPRAVA

uzgoja pokazuje i važnost magnetskih čestica za ovaj rad. Količina magnetskih čestica u sferoidima se s vremenom smanjivala te je tako 3. tjedan bilo nedovoljno magnetskih čestica da drže sferoid na okupu te se on raspao. Također, jedan od razloga raspadanja sferoida je činjenica da se razvilo previše stanica te ih magnetska sila više nije mogla držati na okupu. Jednako tako, zbog razvoja prevelikog broja stanica, stanicama je ponestalo hranjivih tvari te su se počele raspadati te je bilo premalo ekstracelularnog matriksa da drži stanice na okupu. Za duže vrijeme uzgoja potrebno je sferoide trajno držati u magnetskom polju, povećati volumen medija i učestalost njegove izmjene.

## 6. ZAKLJUČAK

### 6. ZAKLJUČAK

Na osnovu ovog istraživanja zaključeno je sljedeće:

- količina kolagena se tijekom uzgoja sferoida povećava i dolazi do razvoja izvanstaničnog matriksa
- postoji statistički značajan porast količine kolagena između prvog i drugog tjedna

## 7. SAŽETAK

### 7. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Uzgojiti sferoide korištenjem metode magnetske levitacija te promatrati i proučavati količinu kolagena koja se stvara u sferoidima nakon jedan, dva i tri tjedna

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

**Metode i materijali:** Stanične linije D54 i BJ su inkubirane s magnetskim česticama te inkubirane na 37°C, uz 5 % CO<sub>2</sub> i visoku vlažnost zraka. Nakon toga, 5000 stanica svake stanične linije s magnetskim česticama stavljeno je u pločicu s 24 jažice te poklopljeno pločicom za magnetsku levitaciju. U periodu od tri tjedna sferoidi su rezani na kriostatu i bojani metodom po Massonu. Zatim su mikroskopirani i slikani na svjetlosnom mikroskopu s kamerom te su dobivene slike analizirane pomoću programa ImageJ.

**Rezultati:** Količina stvorenog kolagena u sferoidima raste iz tjedna u tjedan. Također dolazi do razvoja izvanstaničnog matriksa. Porast količine kolagena je statistički značajan.

**Zaključak:** Kako sferoid raste i razvija se, tako i stvara sve više kolagena te dolazi do razvoja izvanstaničnog matriksa.

**Ključne riječi:** glioblastom, fibroblasti, sferoid, kultura stanica

## 8.SUMMARY

### 8. SUMMARY

#### **Morphology of co-cultivared spheroids**

**Objectives:** Grow spheroids using the magnetic levitation method and analyse the quantity of collagen produced during the 3 weeks of growth

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

**Methods and materials:** BJ and D54 cells were incubated with magnetic particles and at 37°C with high humidity and 5 % CO<sub>2</sub>. After that, 5000 cells of each cell line with magnetic particles were put into a 24- well plate and covered with a magnetic plate. In the period of next three weeks spheroids were cut using a cryostat and then stained with Masson stain. Then, they were examined using a microscope and photographed and the pictures were analysed using the ImageJ programme.

**Results:** The amount of collagen in spheroids increased during the period of three weeks. Spheroids developed extracellular matrix. The increase in the amount of collagen, the difference was statistically important.

**Conclusion:** As the spheroid grows and develops, it creates more collagen and extracellular matrix.

**Key words:** glioblastoma, fibroblasts, spheroid, cell culture

### 9. LITERATURA

1. Anderson, N.M. i Simon, M.C.: The tumor microenvironment, *Current Biology*, 2020, 30:R905–R931
2. Ohgaki, H. i Kleihues, P.: The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma, *Clin Cancer Res*, 2013, 19(4): 764–772
3. Davis ME: Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment, *Clin J Oncol Nurs*. 2016, 20(5): S2–S8.
4. Costa EC, Moreira AF, de Melo-Diogo D, Gaspar VM, Carvalho MP, Correia IJ: 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis, *Biotechnology Advances* 2016, 34 (8):1427-1441
5. Huang YL, Shiao C, Wu C, Segall JE, i Wua M: The architecture of co-culture spheroids regulates tumor invasion within a 3D extracellular matrix, *Biophys Rev Lett*. 2020; 15(3): 131–141
6. Białkowska K, Komorowski P ORCID, Bryszewska M ORCID i Miłowska K: Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application, *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(17), 6225
7. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB i sur.: Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006 7;444(7120):756-60. Epub
8. ATCC, ATCC–BJ CRL-2522™. Dostępno na adresi: <https://www.atcc.org/products/crl-2522>. Datum pristupa: 9.9.2022.
9. Xu S, Xu H, Wang W, Li S, Li H, Li T i sur. : The role of collagen in cancer: from bench to bedside, *Journal of Translational Medicine* 2019, volume 17, članak br. 309
10. Raglow Z, Thomas SM: Tumor matrix protein collagen XI $\alpha$ 1 in cancer, *Cancer Lett*, 2015 28;357(2):448-53
11. Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Knittel JG, Yan L, Rueden CT i sur.: Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression, *BMC Med*. 2008; 6: 11
12. Egeblad M, Rasch MG, Weaver vm: Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution, *Curr Opin Cell Biol*, 2010 (5):697-706.



10. ŽIVOTOPIS

**OSOBNI PODACI:**

**Ime i prezime:** Tin Kadović

**Datum i mjesto rođenja:** 23.8.2000., Vinkovci

**Adresa stanovanja:** Osječka ulica 40, Županja

**E-mail:** [kadovictin@gmail.com](mailto:kadovictin@gmail.com)

**OBRAZOVANJE:**

2015.-2019. – Prirodoslovno-matematička gimnazija, Gimnazija Županja

2019.-2022. - Sveučilište u Osijeku, Medicinski fakultet, Preddiplomski sveučilišni studij

Medicinsko laboratorijska dijagnostika

**AKTIVNOSTI TIJEKOM STUDIJA:**

Voditelj radionice „Život“ na festivalu znanosti (2.-7. svibnja 2022.)