

Utjecaj staničnog rasporeda na morfologiju sferoida

Baćani, Mirta

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:691455>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Mirta Baćani

**UTJECAJ STANIČNOG RASPOREDA NA
MORFOLOGIJU SFEROIDA**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Mirta Baćani

**UTJECAJ STANIČNOG RASPOREDA NA
MORFOLOGIJU SFEROIDA**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu Osijek, Katedra za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju

Mentorica: doc.dr.sc. Teuta Opačak-Bernardi

Rad ima: 21 list, 1 tablicu i 5 slika.

Veliko hvala mojoj obitelji na potpori tijekom školovanja, a posebno se zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Teuti Opačak-Bernardi na strpljenju i stručnom vođenju prilikom izrade ovog diplomskog rada. Hvala i doc.dr.sc. Barbari Viljetić na njezinoj angažiranosti prilikom provođenja praktičnog dijela istraživanja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1.Kultura stanica.....	1
1.2.Usporedba 2D i 3D stanične kulture.....	1
1.3. Morfologija sferoida.....	2
1.4. Magnetska levitacija.....	2
1.5. Karakteristike stanica fibroblasta i glioblastoma.....	3
2.HIPOTEZA	4
3.CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	5
4.MATERIJALI I METODE	6
4.1.Ustroj studije.....	6
4.2. MATERIJALI.....	6
4.2.1. Stanične linije.....	6
4.2.2. Kemikalije.....	6
4.3. METODE.....	7
4.3.1. Kultivacija i održavanje stanica.....	7
4.3. 3. Brojenje stanica.....	7
4.3.4. Formiranje sferoida.....	8
4.3.5. Rezanje sferoida.....	8
4.3.6. Bojenje sferoida	8
4.3.7. Mikroskopiranje.....	9
4.4. Statističke metode.....	9
5.REZULTATI.....	10
5.1.Analiza veličine sferoida	10
5.2.Statistička analiza veličine sferoida.....	13

6. RASPRAVA.....	14
7.ZAKLJUČAK	16
8. SAŽETAK.....	17
9. SUMMARY	18
10. LITERATURA.....	19
11. ŽIVOTOPIS	21

POPIS KRATICA

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

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

DMEM- Dulbeccov minimalni esencijalni medij (*engl.* Dulbecco's Modified Eagle Medium)

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

EDTA- etilendiamintetraoctena kiselina (*engl.* ethylenediaminetetraacetic acid)

FBS- fetalni goveđi serum (*engl.* Fetal Bovine Serum)

HBSS- Hankova uravnotežena otopina soli (*engl.* Hanks Balanced Salt Solution)

OT- temperatura objekta (*engl.* Object temperature)

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

1. UVOD

1.1. Kultura stanica

Prve stanične kulture su izolirane 1907. godine kada je Harrison istraživao podrijetlo živčanih vlakana (1). Od tada se ta metoda razvija te se danas stanice izoliraju izravno iz tkiva ili se koriste utvrđene stanične linije. Prva 3D stanična kultura napravljena je 1970. u otopini mekog agara i od tada su dobro opisane i dokumentirane sličnosti između morfologije i ponašanja stanica koje rastu u tumorskoj masi i onih uzgojenih u 3D kulturi (1). Kultura stanica se koristi za bolje razumijevanje stanične biologije, morfologije tkiva, mehanizama razvoja bolesti, proizvodnje proteina, proučavanje mehanizma djelovanja lijekova i razvoja tkivnog inženjeringa (1).

1.2. Usporedba 2D i 3D stanične kulture

U 2D kulturi stanica, stanice rastu kao monosloj pričvršćene za površinu i oblik stanica je ravan i izdužen. Sve stanice u kulturi dobivaju istu količinu hranjivih tvari i faktora rasta iz medija i zbog toga se više stanica nalazi u istoj fazi staničnog ciklusa (2). Nakon izolacije iz tkiva i prijenosa u 2D uvjete, morfologija stanica se mijenja, kao i način stanične diobe, a gubitak raznolikog fenotipa može također biti rezultat 2D uzgoja (1). Spojevi stanica su rijetki, kao i komunikacija među stanicama, a stanična diferencijacija je slaba, dok je stanična proliferacija veoma brza. Zbog poremećaja u interakciji s vanjskim okolišem, stanice gube svoj polaritet, što mijenja odgovor tih stanica na različite stanične procese, kao što je apoptoza (1). Razine ekspresije gena i proteina se znatno razlikuju u usporedbi sa *in vivo* modelima. Stanice ne mogu točno odgovoriti na mehaničke podražaje zbog nemogućnosti proširenja u treću dimenziju. No, veoma su lako dostupne i jeftine, replikacija je jednostavna i bolje su za dugoročne kulture (2).

Kod 3D stanične kulture očuvan je prirodni oblik stanice, a stanice rastu u 3D agregate/sferoide koji sadrže više slojeva. Hranjive tvari su neravnomjerno raspoređene, a stanične jezgre su često neaktivne jer primaju manje kisika i faktora rasta iz medija (2). Uobičajeni su stanični spojevi i komunikacija između stanica, pravilne su interakcija stanica-stanica i stanica-izvanstanična okolina te se stvaraju okolišne „niše“ (1). Stanice su dobro diferencirane i imaju veću otpornost na lijekove te im je stopa proliferacije veoma realna, nije prebrza kao kod 2D kulture. Sačuvana je morfologija stanica i način diobe, raznolik fenotip i polaritet. Ekspresija gena, spajanje, topologija i biokemija stanica je ista kao i kod stanica *in vivo*. Nedostatak im je lošija izvedba i ponovljivost pokusa,

teža interpretacija rezultata, teže provođenje kulture, cijena, dugotrajnost i manje je komercijalno dostupnih testova (2).

1.3. Morfologija sferoida

U sferoidu su stanice podijeljene u 3 zone. Središnji dio je zona nekroze jer stanice nemaju dovoljno kisika i hranjivih tvari, a na površini je zona proliferacije gdje se stanice aktivno umnažaju. Između ta dva sloja su neaktivne, hipoksične stanice (1). Sferoidi su gusti 3D agregati stanica koji pokazuju jaku adheziju stanica - stanica te zadržavaju svoj endogeni izvanstanični matriks. Također imaju svojstva koja usko oponašaju tkiva iz kojih potječu. Sama veličina sferoida ovisi o tipu stanica od kojih su formirane i o uvjetima njihove kulture. Obično su veličine od 100 μm do $>500 \mu\text{m}$. Veći tumorski sferoidi su korisni za proučavanje solidnih tumora. Morfologija sferoida se može procijeniti svjetlosnim ili fazno-kontrastnim mikroskopom. Morfološki parametri kao što su integritet sferoida, volumen, promjer, vanjska morfologija, prozirnost (pokazatelj zbijanja sferoida) i kinetika rasta (uključujući kašnjenje rasta) se procjenjuju tijekom formiranja sferoida. Sferoidi dobre kvalitete su prozirne kuglice s dobro definiranom vanjskom granicom i tamnijom jezgrom (3). Istraživanja pokazuju da brojni morfološki parametri utječu na odgovor velikih sferoida na lijekove. Stoga je jako važno pratiti parametre morfologije sferoida kao što su volumen, površina, promjer i sferičnost (4). Sferoidi se formiraju na različite načine a jedan od najstarijih je metoda viseće kapi. Sferoidi se mogu uzgajati i pomoću nosača koji su izgrađeni od prirodnih ili umjetnih materijala (3). Stanice koje formiraju sferoide koji oponašaju čvrsta tkiva izlučuju vlastiti ekstracelularni matriks i to je veoma važno jer ECM drži stanice na okupu, poboljšava staničnu adheziju, staničnu proliferaciju i komunikaciju među stanicama (5).

1.4. Magnetska levitacija

Pojam levitacija (lat. *levitas* – lakoća) označava proces kojim se omogućuje da neki predmet lebdi u gravitacijskom polju (6). Kod magnetske levitacije to omogućuje magnetsko polje gdje djelovanje gravitacijske sile poništava elektromagnetska sila istog intenziteta i iznosa, ali suprotnog smjera. Magnetska stanična levitacija je nedavno razvijena metoda kod koje su stanice ispunjene netoksičnim magnetskim nanočesticama i potaknute da formiraju višestanične sferoide unutar nekoliko sati putem vanjskog magnetskog polja. Takvim sferoidima se lako manipulira zahvaljujući njihovim magnetskim svojstvima (7). Naime, u stanice u 2D kulturi se unosi sklop magnetskih naončestica koji sadrži željezni oksid, nanočestice zlata i peptidne sekvence koje se

lijepe na stanice (8,9). Kada se resuspendira u mediju, vanjsko magnetsko polje levitira i koncentrira stanice na granici zrak-tekućina, gdje se one agregiraju u veće 3D kulture. Stanice mogu stvarati i vlastiti ekstracelularni matriks (8).

1.5. Karakteristike stanica fibroblasta i glioblastoma

U ovom istraživanju će se koristiti stanična linija fibroblasta i glioblastoma. Fibroblasti su glavne stanice koje su dio strukture vezivnog tkiva. Oni su odgovorni za sintezu vlakana i kolagenskih prekursora te sintetiziraju, održavaju i remodeliraju izvanstanični matriks tkiva. Također, igraju važnu ulogu u popravku i zacjeljivanju oštećenih organa te imaju neke karakteristike matičnih stanica (10). Glioblastom je najmaligniji i vrlo agresivan tumor mozga. Glavni je razlog recidiva i neuspješnog liječenja difuzno širenje stanica u okolno moždano tkivo. Stanice su nepravilnog oblika i visokoproliferativne. Za proučavanje ponašanja stanica glioblastoma konstruirana se 3D model i na taj način se oponaša mikrookruženje tumora te njegova interakcija s ekstracelularnim matriksom (11).

2.HIPOTEZA

Različiti redoslijed slaganja slojeva stanica uvjetuje razlike u morfologiji sferoida.

3.CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Odrediti određuje li početni prostorni raspored stanica građu sferoida,
2. Promatrati kretanje i samoorganizaciju stanica u sferoidu ovisno o redosljedu slojeva.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno 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. Istraživanje je odobreno od strane etičkog povjerenstva 7. srpnja 2022. URBROJ: 2158-61-46-22-160.

4.2. MATERIJALI

4.2.1. Stanične linije

Za istraživanje su korištene dvije komercijalno dostupne stanične linije:

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

4.2.2. Kemikalije

Tijekom eksperimentalnog dijela rada korištene su kemikalije i reagensi različitih proizvođača:

- fosfatni pufer (*engl.* Phosphate-buffered saline, 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 (*engl.* Dulbecco's Modified Eagle Medium), s visokim udjelom glukoze (4,5g/L), uz dodatak glutamin-S (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)
- fetalni goveđi serum (*engl.* Fetal Bovine Serum, FBS), uz dodatak antibiotik-antimikotik (penicilin/streptomycin) 100x; (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)
- tripsin/EDTA, tripsin 0.25%, 1mM EDTA-Na₄ u HBSS (Panbiotech GmbH, Aidenbach, Germany)
- erytrosin B, sterilno filtriran (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)
- magnetske čestice (NanoShuttle-PL.; Greiner, Frickenhausen, Germany)
- medij za kriostat (Tissue Freezing Medium; Leica, Nussloch, Germany)
- aceton (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- ksilol (Carlo Erba Reagents, Emmendingen, Germany)
- alkoholi (96%-tni i apsolutni etanol) – Histanol (Biognost, Zagreb, Hrvatska)

- boje: fuksin (Carlo Erba Reagents), orange G (Merck), fosfomolibden (Merck), anilin (Merck) i kanada balzam (Carlo Erba Reagents)

4.3. METODE

4.3.1. Kultivacija i održavanje stanica

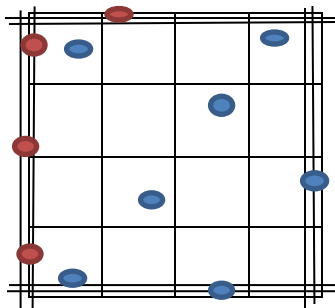
Stanice su uzgojene na DMEM hranjivom mediju i nasadene u bočice za kulturu stanica površine rasta 25 cm² (BD, Falcon, Njemačka). Stanice su rasle u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) na 37°C uz 5% CO₂ u vlažnoj atmosferi. Prema potrebi stanice su se odljepljivale s površine pomoću tripsina i prenosile u svježiji medij da bi mogle nastaviti s rastom.

4.3.3. Brojenje stanica

Brojenje stanica služi da bi se odredila vijabilnost stanične kulture koja određuje kvalitetu i reproducibilnost rezultata. 50 µL stanične suspenzije se pomiješa sa 100 µL boje Tripan blue. Potom se sve zajedno resuspendira i nanese na Bürker-Türkovu komoricu. Broje se samo neobojene žive stanice u 4 kvadranta i dvije susjedne stranice u svakom kvadrantu. Mrtve stanice su obojene jer se u njima boja nakuplja zbog propusne membrane.

$$\text{Račun: } R = \frac{3}{4} \times N \times 10^4 \text{ stanica/mL}$$

R= ukupan broj vijabilnih stanica, N= broj živih stanica određen u Bürker-Türkovoju komorici. Broj 4 označava broj polja u komorici, a broj 3 faktor razrjeđenja.



● - stanice koje brojimo

● - stanice koje ne brojimo

Slika 1. Princip brojanja stanica u Bürker-Türkovoju komorici (*izradila autorica*)

4.3.4. Formiranje sferoida

Sferoidi su formirani metodom magnetske levitacije. Za uspješnost metode potrebno je da stanice budu 70-80% konfluentne. Nakon što je to postignuto u stanice su dodane magnetske nanočestice ($4 \mu\text{L}/\text{cm}^3$). Zatim se stanice inkubiraju 8-12h, a nanočestice polako ulaze u citoplazmu stanica. Nakon inkubacije stanice se tripsiniziraju i izbroje pomoću Bürker-Türkove komorice. 5000 stanica se pomiješa u ukupno $350\mu\text{L}$ medija i nasadi na ploču s 24 jažice. Stanice su koncentrirane uz pomoć magnetske ploče za koncentraciju u jedan sloj na dnu jažice i inkubirane na taj način 24 sata. Nakon toga u istu jažicu je dodano 5000 stanica druge stanične linije, koncentrirane u sloj na postojeće stanice na dnu jažice tijekom 24 sata. Potom je na to stavljena magnetska ploča za levitaciju, a sferoidi se formiraju 48-72 sata. Medij je promijenjen prema potrebi, kada su stanice potrošile sve hranjive tvari iz medija, a uzgoj je trajao 3 tjedna. Stanice su se miješale na dva načina: tako da su prvi sloj činile stanice iz D54 stanične linije glioblastoma, a onda stanice iz BJ stanične linije fibroblasta i obrnuto. U svakom tjednu se promatrala morfologija BJ-D54 sferoida i D54-BJ sferoida.

4.3.5. Rezanje sferoida

Nakon završetka uzgoja stanice se uklapaju u medij za kriostatsko rezanje (Tissue Freezing Medium; Leica, Nussloch, Germany) koji se koristi za izradu smrznutih rezova koji se mogu obojati standardnim histološkim metodama bojenja. Režu se na kriostatu (Cryostat CM3050S, Leica, Nussloch, Germany). Temperatura komore (CT- *engl.* chamber temperature) je iznosila -22 °C. Nakon što se sferoid smrzne na -22 °C (OT- *engl.* object temperature) spreman je za rezanje. Sferoidi se režu na debljinu od $10\mu\text{m}$. Rezovi se rasprostiru po metalnoj pločici pomoću hladnog kista. Potom se prebacuju na silanizirana predmetna stakla i fiksiraju u acetonu.

4.3.6. Bojenje sferoida

Sferoidi su obojeni metodom trikromnog bojenja po Massonu. Preparati su bili 10 minuta u otopini Mallory koja se sastoji od kiselog fuksina i boje Orange G. Potom su isprani destiliranom vodom i prebačeni u otopinu 1%-tne fosfomolibdenske kiseline na 5 minuta. Nakon toga slijedi ispiranje destiliranom vodom i stavljanje u treću otopinu 2%-tnog anilina u octenoj kiselini na 10 minuta. Zatim se ispiru destiliranom vodom i slijedi postupak dehidracije 96%-tnim etanolom i apsolutnim etanolom. Nakon dehidracije stavljaju se u ksilol na 5 minuta, a nakon toga se dodaje kanada balzam i lijepi pokrovnica.

4.3.7. Mikroskopiranje

Pomoću svjetlosnog mikroskopa (Carl Zeiss, Axioskop 2 MOT, Jena, Germany) pregledani su preparati od sva tri tjedna te su slikani kamerom Olympus DP70 pod povećanjem 100x, a zatim i 200x. Dobivene slike su analizirane slobodno dostupnim programom ImageJ (Fiji 101) (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SAD).

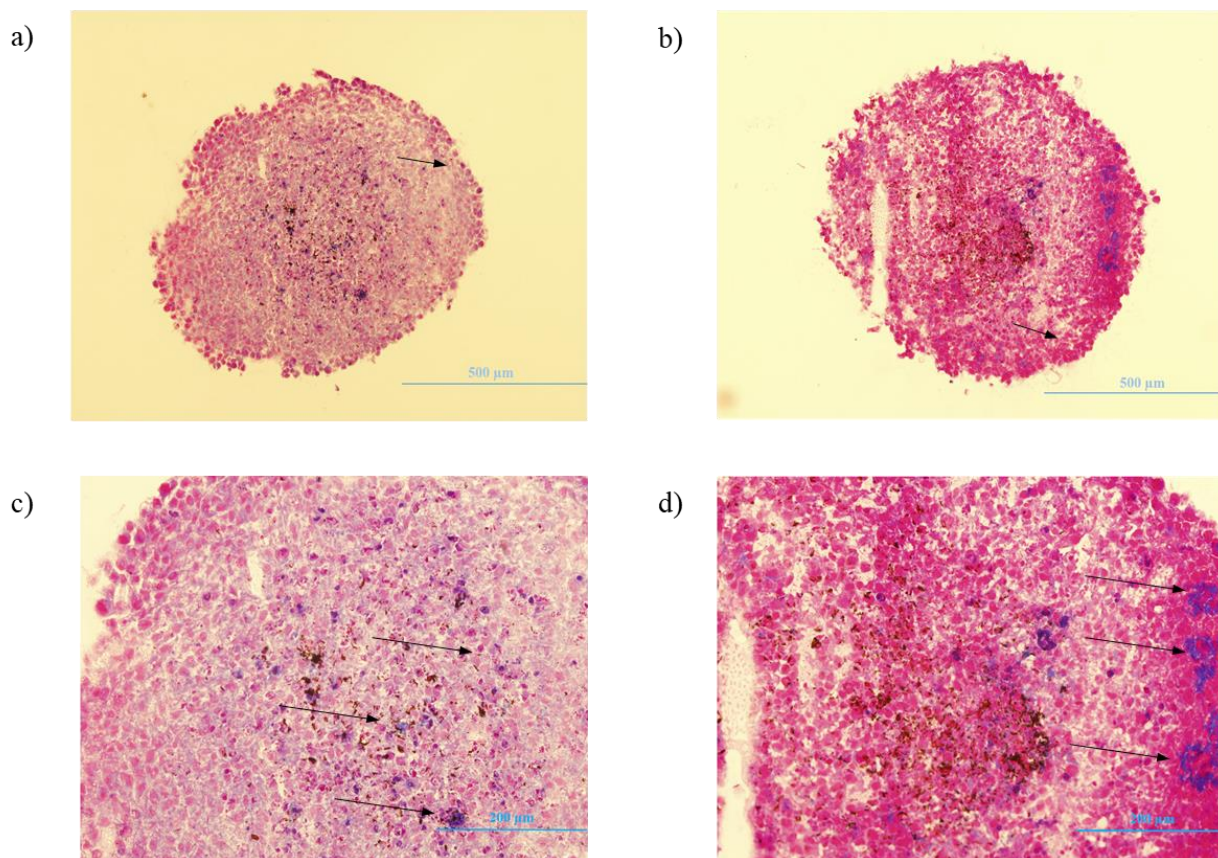
4.4. Statističke metode

Rezultati su obrađeni pomoću programa Statistica 12 (verzija 14.0.0.15) za Windows operativne sustave. Normalnost distribucije se testirala Shapiro-Wilk testom. Dobiveno je da je distribucija normalna i stoga se analiza radila Student t-testom za nezavisne uzorke. Razina statističke značajnosti za sve obrađene i prikazane rezultate iznosi $P < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Analiza sferoida

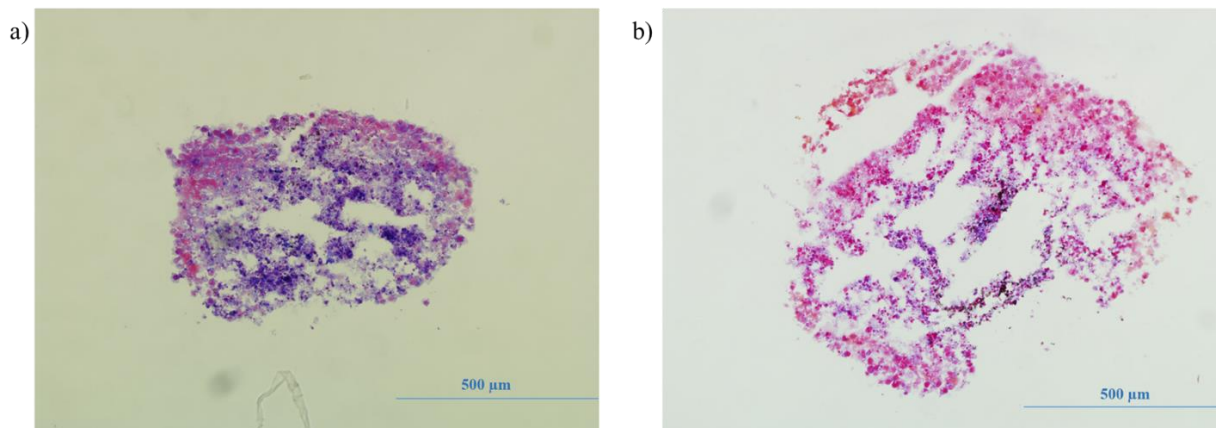
Na dobivenim slikama vidljive su razlike u morfologiji sferoida tijekom vremena rasta u kulturi. Na slici 2 su prikazani BJ-D54 i D54-BJ sferoidi nakon 1. tjedna uzgoja slikanih pod povećanjem 100x i 200x. Nakon prvog tjedna na slikama se vidi točno razgraničenje između slojeva stanica.



Slika 2. a) BJ- D54 sferoid (100x) b) D54- BJ sferoid (100x); strelicom su označene granice slojeva stanica. c) BJ-D54 sferoid (200x) d) D54-BJ sferoid (200x); strelicom su označene nakupine kolagena

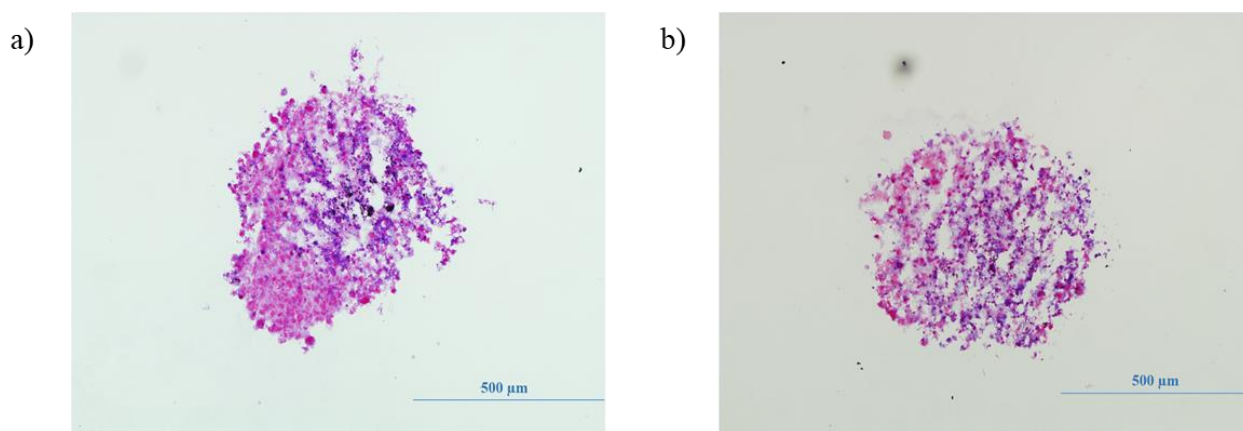
Na slici BJ-D54 sferoida pod povećanjem 100x vidi se da su stanice drugačije grupirane u jezgri sferoida nego kod D54-BJ sferoida gdje se primjećuju velike nakupine kolagena. Sferoidi su veoma kompaktni i nema praznina. Kolagen je lokaliziran u djelovima sferoida gdje se nalaze fibroblasti.

U drugom i trećem tjednu uzgoja (Slike 3 i 4) više se ne vide razlike u slojevima stanica. Također primjećujemo i veće količine praznog prostora unutar sferoida. Praznine su rezultat odumiranja stanica unutar nekrotične jezgre sferoida.



Slika 3. Sferoidi u drugom tjednu uzgoja a) BJ-D54 sferoid (100x) b) D54-BJ sferoid (100x)

Nakon trećeg tjedna uzgoja (Slika 4) primjećujemo praznine na više mjesta unutar sferoida, a ne samo unutar jezgre. BJ-D54 sferoidi su kompaktniji i imaju manji broj praznih zona unutar sferoida od D54-BJ sferoida.



Slika 3. Sferoidi u trećem tjednu uzgoja a) BJ-D54 sferoid (100x) b) D54-BJ sferoid (100x)

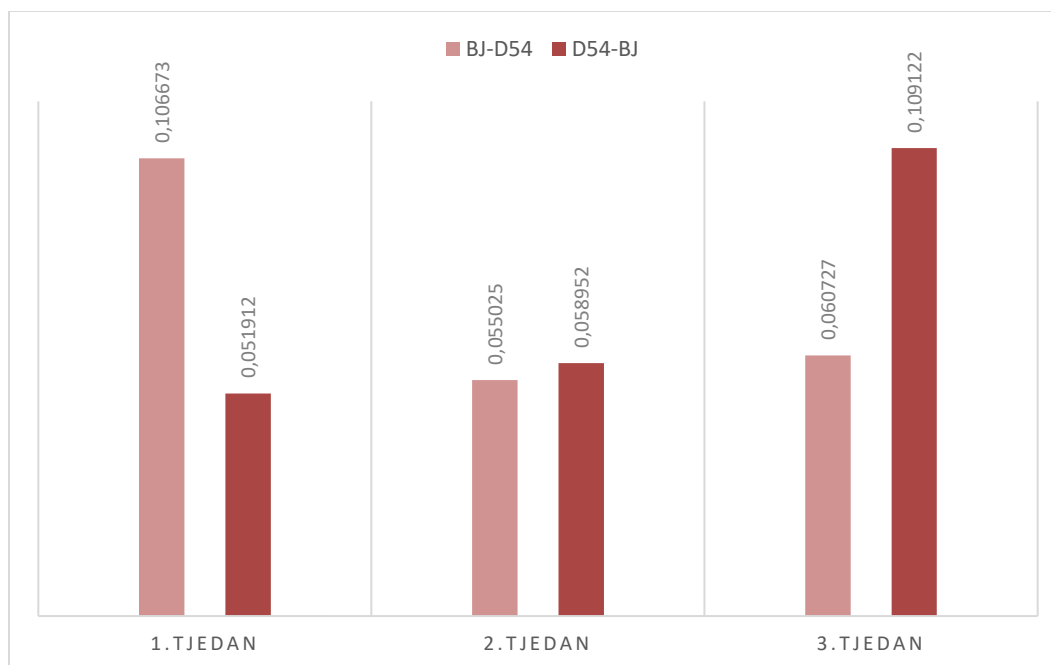
Sferoidi su analizirani programom Image J. Određivala se veličina sferoida, te promatrao raspored stanica i kolagena unutar sferoida. Za analizu veličine su se koristile slike pod povećanjem 100x.

Izračun se radio prema formuli:

$$N = \frac{\text{pikseli čestica}}{(\text{ukupni pikseli} - \text{pikseli praznog dijela slike})}$$

N- veličina sferoida, ukupni pikseli= 12533760

Na slici 5 se nalazi grafički prikaz razlika u veličini sferoida tijekom sva tri tjedna koliko je trajao njihov uzgoj. Iako se mikroskopski ne vidi razlika u veličini sferoida vidi se da BJ-D54 sferoidi bolje podnose uvjete uzgoja te da su kompaktniji od D54-BJ sferoida.



Slika 5. Grafički prikaz veličine sferoida tijekom 3 tjedna uzgoja (brojevi prikazuju broj piksela pojedinog sferoida)

Također iz grafa je vidljiv obrnuti trend rasta rasta sferoida. BJ-D54 sferoidi su u početku veći i postaju kompaktniji nakon prvog tjedna, dok su D54-BJ sferoidi u startu kompaktniji i rastu tijekom uzgoja te su najveći u trećem tjednu.

5.2. Statistička analiza veličine sferoida

Za statističku obradu se radila analiza rezova pet sferoida BJ-D54 i pet sferoida D54-BJ za svaki tjedan. U programu Image J se radilo mjerenje dobivenih slika svih sferoida. Iz ukupnog broja piksela po slici i količine praznih piksela dobivena je numerička veličina svakog sferoida koja se koristila u statističkoj obradi.

Veličina sferoida je analizirana u programu Statistica 12. Shapiro-Wilkovim testom za BJ-D54 i za D54-BJ dobiveno je da su podaci normalno distribuirani jer su vrijednosti veće od 0,5. Vrijednost Shapiro-Wilk testa za sferoide BJ-D54 iznosi 0,8512, a za D54-BJ iznosi 0,8737. Zakrivljenost BJ-D54 sferoida iznosi 0,8798, a z vrijednost zakrivljenosti je 0,7849. Asimetričnost je 1,2377, a z vrijednost asimetričnosti je 2,1335. Zakrivljenost D54-BJ sferoida je -1, 5392, a z vrijednost zakrivljenosti je -1, 3732. Asimetričnost D54-BJ sferoida iznosi 0,4030, a z vrijednost asimetričnosti je 0,6946. Sve vrijednosti se nalaze unutar intervala $\pm 2,58$.

z- vrijednost se računa prema formulama:

$$z = \frac{\text{asimetričnost}}{\text{standardna greška asimetričnosti}} \text{ ili } z = \frac{\text{zaobljenost}}{\text{standardna greška zaobljenosti}}$$

Zbog dobivenih vrijednosti izabran je t test za dva nezavisna uzorka. Vrijednosti su prikazane u tablici (Tablica 1). Test je pokazao da ne postoji statistički značajna razlika u veličini sferoida tijekom vremena uzgoja u prva dva tjedna dok u trećem tjednu postoji jer je $P = 0,0466$.

Tablica 1. Prikaz statističke obrade veličine sferoida.

	1.TJEDAN	2.TJEDAN	3.TJEDAN
P VRIJEDNOST	0,4213	0,3003	0,0466

6. RASPRAVA

Višestanični sferoidi su odlični *in vitro* modeli koji oponašaju *in vivo* tumore. Bolji su od dvodimenzionalnih jednoslojnih staničnih kultura jer u sferoidima interakcije stanica-stanica i stanica-izvanstanični matriks značajno oponašaju *in vivo* cito-arhitektonske uvjete (12). U ovom istraživanju sferoidi glioblastoma uzgojeni su sa stanicama fibroblasta koje proizvode fibronektin i kolagen koji mogu prirodno formirati fibroznu kapsulu u 3D strukturi (13). U ovom istraživanju za uzgoj sferoida koristila se metoda magnetske levitacije koja se pokazala odličnom za formiranje ovakve višestanične vrste sferoida. Metoda formira tumorske sferoide s definiranom staničnim sastavom i gustoćom u roku 24 sata (13). Nakon uzgoja, rezanja i bojenja sferoida uslijedila je analiza pod mikroskopom.

Na slikama koje su analizirane Image J programom opaža se da ne postoji oštra granica između slojeva stanica te da se stanice raspoređuju unutar sferoida neovisno o tome nalaze li se u prvom ili drugom sloju sferoida. U prvom tjednu je vidljiva granica između slojeva stanica, a nakon toga u drugom i trećem tjedna granica nestaje jer dolazi do samoorganizacije stanica unutar sferoida. U prvom tjednu se jasno vide nakupine kolagena u D54-BJ sferoidu, a nakon nekog vremena te nakupine nestaju jer se tumorske stanice infiltriraju u fibroblaste te nastoje iskoristiti sve hranjive tvari i mikrookoliš koji normalne stanice pružaju (15). Stanice nastoje formirati pravi tumor. Kroz sva tri tjedna koliko je trajao uzgoj sferoida nema značajne promjene u morfologiji. To bi značilo da stanični raspored nema utjecaja na samu morfologiju sferoida pošto se oni formiraju neovisno o tome kakav je početni stanični raspored. Razlog je taj što stanice međusobno komuniciraju i formiraju 3D strukture. U ovom konkretnom slučaju oponašale su glioblastom, zloćudni tumor mozga. Nakon drugog tjedna uzgoja jasno se vide praznine unutar sferoida, tj. formiraju se nekrotične jezgre. Nakon trećeg tjedna ima još više praznina koje se nalaze na svim mjestima unutar sferoida. D54-BJ sferoidi su manje stabilni i puno lošije podnose uvjete uzgoja od BJ-D54 sferoida. Fibroblasti stvaraju zaštitni sloj oko sferoida te na taj način štite i samu njegovu strukturu prilikom uzgoja. Razlog ubrzanog raspadanja nakon prvog tjedna je smanjeno djelovanje magnetskog polja zbog manjeg broja magnezskih čestica, smanjene količine dostupnih hranjivih tvari i rasta koncentracija otpadnih spojeva u okolišu sferoida.

Statistička analiza je pokazuje da nema statistički značajne razlike u veličini BJ-D54 i D54-BJ sferoida u prva dva tjedna uzgoja. U trećem tjednu razlika je statistički značajna jer su D54-BJ sferoidi nestabilniji i brže se kreću raspadati od BJ-D54 sferoida. Iz tog razloga su i puno manji jer imaju puno više nekrotičnih stanica samim time i praznih prostora od BJ-D54 sferoida. Dosadašnja istraživanja pokazuju da je razvojem tehnologije uzgoja pomoću mikrofluidnog staničnog uzorkovanja moguće kontrolirati staničnu diferencijaciju međustaničnim položajem. Za neke kombinacije stanica početno pozicioniranje stanica utječe na kasniju formaciju sferoida te nastaju sferoidi različitih tipova stanica, tzv. „Janus“ sferoidi. Konačna organizacija sferoida kokulture određena je ne samo tipovima stanica koji su pomiješani zajedno, već i njihovim početnim položajima jednih prema drugima (16). Naše istraživanje to nije pokazalo zbog toga što smo koristili već diferencirane stanice i sferoidi su uzgajani kraći vremenski period u statičnoj kulturi pa nije došlo do značajnije diferencijacije tijekom rasta sferoida. Na slikama analiziranim Image J programom primjećujemo da nema prevelike razlike u morfologiji kao ni jasne granice između slojeva stanica, neovisno o tome koji sloj stanica je prvi. To znači da možemo odbaciti hipotezu postavljenu na početku istraživanja da različit redoslijed slaganja slojeva stanica uvjetuje razlike u morfologiji sferoida. Također se može primjetiti i da je metoda magnetske levitacije odlična za formiranje višestanične vrste sferoida.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Početni prostorni raspored stanica ne uvjetuje građu sferoida,
2. Tijekom tri tjedna uzgoja stanice migriraju, ne postoji jasna granica između slojeva te dolazi do međusobnog mješanja stanica bez obzira na početni položaj
3. Postoji statistički značajna razlika u veličini sferoida između skupina sferoida različitog staničnog rasporeda nakon 3 tjedna uzgoja

8. SAŽETAK

CILJEVI ISTRAŽIVANJA: Ciljevi ovog istraživanja bili su odrediti određuje li početni prostorni raspored stanica građu sferoida i promatrati kretanje i samoorganizaciju stanica u sferoidu ovisno o redoslijedu slojeva.

USTROJ STUDIJE: Istraživanje je provedeno kao in vitro studija - kontrolirani pokus.

MATERIJALI I METODE: Za istraživanje su korištene dvije komercijalno dostupne stanične linije BJ stanice normalnih humanih fibroblasta i D54 humanog glioblastoma te DMEM medij za uzgoj adherentnih staničnih linija. Sferoidi su formirani metodom magnetske levitacije, izrezani u kriostatu i obojeni trikromnom metodom bojenja po Massonu. Pomoću svjetlosnog mikroskopa pregledani su preparati od sva tri tjedna te su slikani kamerom Olympus DP70. Slike su analizirane u Image J, a statistika je napravljena u Statistica 12 programu.

REZULTATI: Na slikama se ne primjećuju znatne razlike u morfologiji sferoida. Razlika između slojeva sferoida vidljiva je samo u prvom tjednu uzgoja, a u drugom i trećem tjednu se ne vidi razgraničenje između pojedinih slojeva stanica. T testom je pokazano da postoji statistički značajna razlika u veličini između sferoida s različitim rasporedom stanica u trećem tjednu uzgoja.

ZAKLJUČAK: Početni prostorni raspored stanica ne određuje građu sferoida i tijekom tri tjedna uzgoja stanice migriraju, miješaju se, te ne postoji jasna granica između ta dva sloja. Postoji statistički značajna razlika u veličini sferoida između skupina sferoida različitog staničnog rasporeda u trećem tjednu.

KLJUČNE RIJEČI: migracija stanica; tehnike stanične kulture, trodimenzionalne; morfologija

9. SUMMARY

INFLUENCE OF CELL ARRANGEMENT ON SPHEROID MORPHOLOGY

OBJECTIVES: Objectives of this research were to determine if initial spatial arrangement of cells determined spheroid structure and observe the movement and self-organization of cells in the spheroid depending on the order of the layers.

STUDY DESIGN: The research was conducted as an in vitro study - a controlled experiment.

MATERIALS AND METHODS: Two commercially available cell lines (BJ normal human fibroblasts and D54 human glioblastoma) were used for the research. Spheroids were formed using the magnetic levitation method, cut in a cryostat and stained using the Masson trichrome staining method. Preparations from all three weeks were examined using a light microscope and photographed with an Olympus DP70 camera. Images were analyzed in Image J, and statistical analysis was done with Statistica 12 program.

RESULTS: No significant differences in the morphology of the spheroids can be observed in the images. The difference between the layers of spheroids is visible only in the first week of cultivation, and in the second and third weeks no demarcation between individual layers of cells is visible. The size of the spheroids decreases over time due to the formation of necrotic centers. The t test showed that there was a statistically significant difference in size between spheroids with different cell arrangements in the third week of cultivation.

CONCLUSION: The initial spatial arrangement of the cells does not determine the structure of the spheroid and during the three weeks of cultivation the cells migrate, there is no clear boundary between the two layers. There is statistically significant difference in the size of spheroids between groups of spheroids with different cellular arrangement in the last week of growth.

KEYWORDS: Cell Migration; Cell Culture Techniques, Three Dimensional; Cell Morphology

10. LITERATURA

1. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of medical science*. 2018;14(4):910-919.
2. Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci*. 2020 Mar 6;7:33.
3. Steward R. Spheroids: properties, image analysis, and culture methods. 2020. Dostupno na adresi: <https://cytosmart.com/resources/spheroids>. Datum pristupa: 13.08.2022.
4. Zanoni M, Piccinini F, Arienti C, Zamagni A, Santi S, Polico R, i sur. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. 2016. Dostupno na adresi: <https://www.nature.com/articles/srep19103>. Datum pristupa: 13.08.2022.
5. Merck KGaA. 3D Cell Culture Tools and Techniques. 2022. Dostupno na adresi: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/3d-cell-culture/3d-cell-culture-technology>. Datum pristupa: 13.08.2022.
6. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža. 2021. Dostupno na adresi: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=69511>. Datum pristupa: 13.08.2022.
7. Lewis NS, Lewis EE, Mullin M, Wheadon H, Dalby MJ, Berry CC. Magnetically levitated mesenchymal stem cell spheroids cultured with a collagen gel maintain phenotype and quiescence. *J Tissue Eng*. 2017. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5460809/>. Datum pristupa: 13.08.2022.
8. Haisler LW, Timm MD, Gage AJ, Tseng H, KillianTC, Souza RG. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nature America, Inc*. 2013;8:10.
9. Souza GR, Molina JR, Raphael RM, Ozawa MG, Stark DJ, Levin CS, i sur. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat Nanotechnol*. 2010 Apr;5(4):291-6.

10. Rieske P, Krynska B, Azizi SA. Human fibroblast-derived cell lines have characteristics of embryonic stem cells and cells of neuro-ectodermal origin. 2005;73:474-483.
11. Diao W, Tong X, Yang C, Zhang F, Bao C, Chen H i sur. Behaviors of Glioblastoma Cells in in Vitro Microenvironments. 2019. Dostupno na adresi: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-36347-7>. Datum pristupa: 14.08.2022.
12. Raghavan S, Mehta P, Horst EN, Ward MR, Rowley KR, Mehta G. Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity. *Oncotarget*. 2016; 7: 16948-16961. Dostupno na adresi: <https://www.oncotarget.com/article/7659/text/>. Datum pristupa: 25.08.2022.
13. Leonard F, Godin B. 3D In Vitro Model for Breast Cancer Research Using Magnetic Levitation and Bioprinting Method. *Methods Mol. Biol.* 2016; 1406:239-51. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4961210/>. Datum pristupa: 25.08.2022.
14. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. *Encyclopedia Britannica, Student's t-test*. 2020. Dostupno na adresi: <https://www.britannica.com/science/Students-t-test>. Datum pristupa: 25.08.2022.
15. Seker-Polat F, Pinarbasi Degirmenci N, Solaroglu I, Bagci-Onder T. Tumor Cell Infiltration into the Brain in Glioblastoma: From Mechanisms to Clinical Perspectives. *Cancers (Basel)*. 2022;14(2):443. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8773542/>. Datum pristupa: 08.09.2022.
16. Torisawa YS, Mosadegh B, Luker GD, Morell M, O'Shea KS, Takayama S. Microfluidic hydrodynamic cellular patterning for systematic formation of co-culture spheroids. *Integr Biol (Camb)*. 2009 Dec;1(11-12):649-54. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2825702/>. Datum pristupa: 07.09.2022.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Mirta Baćani

Datum i mjesto rođenja: 13.03.1999. Virovitica, Republika Hrvatska

Adresa stanovanja: Dore Pejačević 1, 33520 Slatina

Tel. +385 99 548 9787

E-mail: mirtabacani78@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2005.-2013. Osnovna škola Josipa Kozarca Slatina

2013.-2017. Srednja škola Marka Marulića Slatina, opća gimnazija

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

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

OSTALO:

2018. vozačka dozvola B kategorije

2022. Certifikat iz engleskog jezika, stupanj 8 (B2/2 – Council of Europe), Učilište Lingua, Osijek