

Utjecaj sastava i svježine medija na rast stanica

Kovačević, Nikolina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:152:155312>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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



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

Nikolina Kovačević

**UTJECAJ SASTAVA I SVJEŽINE
MEDIJA NA RAST STANICA**

Završni rad

Osijek, 2023.

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

Nikolina Kovačević

**UTJECAJ SASTAVA I SVJEŽINE
MEDIJA NA RAST STANICA**

Završni rad

Osijek, 2023.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za funkcionalnu genomiku i kulturu tkiva na Medicinskom fakultetu Osijek

Mentor rada: doc. dr. sc. Teuta Opačak-Bernardi

Rad ima 25 stranica i 5 slika

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Uvod	1
1.2. Adherentne i suspenzijske kulture.....	1
1.2.1 Adherentne kulture	2
1.2.2. Suspenzijske kulture	2
1.3. Uvjeti kultivacije.....	2
1.3.1 Medij.....	3
1.3.2. Serum.....	4
1.3.3. pH, CO ₂ i temperatura	5
1.4. Primjena kultura životinjskih stanica.....	6
2. CILJEVI	7
3. MATERIJALI I METODE.....	8
3.1. MATERIJALI.....	8
3.1.1. Stanične linije.....	8
3.1.2. Kemikalije.....	8
3.2. METODE.....	9
3.2.1 Uspostavljanje kulture adherentnih stanica.....	9
3.2.2. Uspostavljanje kulture suspenzijskih stanica	9
3.2.3. Brojanje stanica	9
3.2.4. Brojanje adherentnih stanica	10
3.2.5. Brojanje suspenzijskih stanica.....	10
3.2.6. Statističke metode.....	11
4. REZULTATI.....	12
4.1. Rast adherentnih stanica u različitim medijima	12
4.2. Rast suspenzijskih stanica u različitim medijima	14
4.3. Krivulja rasta Caco-2 stanica u različitim medijima	16
4.4. Krivulja rasta suspenzijskih stanica u različitim medijima (THP-1).....	17
5. RASPRAVA.....	18
6. ZAKLJUČAK.....	20
7. SAŽETAK.....	21
8. SUMMARY	22
9. LITERATURA	23
10. ŽIVOTOPIS	25

POPIS KRATICA

AE-1-HB-72 – mišje hibridne stanice (engl. *mouse hybrid cells*)

ATCC – globalni centar za biološke resurse (engl. *American Type Culture Collection*)

BHK-21 [C-13] – fibroblasti bubrega bebe hrčka (engl. *baby hamster kidney fibroblasts*)

Caco-2 – stanice adenokarcinoma debelog cijeva (engl. *colon adenocarcinoma cells*)

CHO – Stanice jajnika kineskog hrčka (engl. *Chinese hamster ovary cells*)

CO₂ – ugljikov dioksid (engl. *carbon dioxide*)

Cos-7 – stanična linija fibroblasta izvedena iz tkiva bubrega majmuna (engl. *a fibroblast cell line derived from monkey kidney tissue*)

DMEM – Dupleccov modificirani Eaglov medij (engl. *Duplecco's Modified Eagle Medium*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

EMEM – Eaglov minimalni esencijalni medij (engl. *Eagle's Minimal Essential Medium*)

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

HCO₃⁻ – hidrogenkarbonat ili bikarbonat (engl. *bicarbonate*)

HEK-293 – besmrtno stanice bubrega ljudskog embrija (engl. *immortalized human embryonic kidney cells*)

HeLa – stanice raka cerviksa (engl. *cervical cancer cells*)

HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etansulfonska kiselina (eng. *4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid*)

HUVEC – stanice iz endotela vena iz pupkovine (engl. *Human umbilical vein endothelial cell*)

Jurcat – besmrtna linija ljudskih T-limfocitnih stanica (engl. *an immortalized human T-lymphocyte cell line*)

MCF-7 – stanice raka dojke (engl. *breast cancer cells*)

MEM – Minimalni esecijalni medij (engl. *minimal essential medium*)

O₂ – kisik (engl. *oxygen*)

PBMC – bilo koja stanica iz krvi koja ima jednu jezgru (engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cell*)

PBS – fosfatno puferirana fiziološka otopina (engl. *phosphate buffered saline*)

PC-12 – stanična linija izvedena iz feokromocitoma štakora (engl. *a cell line derived from rat pheochromocytoma*)

PDL – poli-D-lizin (engl. *poly-D-lysine*)

RPMI –Memorijalni institut Roswell Park(engl. *Roswell Park Memorial Institut*)

Sp2/0-Ag14 – B limfocitna stanična linija (engl. *B lymphocyte cell line*)

THP-1 – stanice akutne monocitne leukemije (engl. *acute monocytic leukemia cells*)

1. UVOD

1.1. Uvod

Kultura stanica je uzgoj živih stanica u odgovarajućem hranjivom mediju, a odnosi se na uzgoj biljnih, životinjskih ili humanih stanica iz i njihov rast u prikladnom umjetnom okolišu izvan organizma. Stanice se dobivaju izravnim izuzimanjem iz tkiva nakon provedene mehaničke ili enzimske razgradnje ili iz staničnog soja ili stanične linije. Primarnoj kulturi pripadaju stanice izolirane direktno iz tkiva i stavljenje u kulturu gdje se održavaju i dijele pod odgovarajućim uvjetima u prisustvu hranjivog medija. Primarne kulture nakon dostizanja konfluentnosti (popunjenost posude za uzgoj) se prenose u novu posudu za uzgoj bilo postupkom razrijeđivanja ili enzimskim odvajanjem od podloge za uzgoj što je poznato kao „pasažiranje“ stanica. Nastavak uzgoja praćen dodatkom svježeg medija rezultira nastankom sekundarne kulture ili stanične linije (2) koja također ima ograničen broj dioba (1). Ako je subpopulacija stanične linije odabrana iz kulture pomoću kloniranja ili neke druge metode, ova stanična linija postaje stanični soj (1). Stanični soj često stječe dodatne genetske promjene u odnosu na pripadajuću roditeljsku liniju. Razlikujemo konačnu i kontinuiranu staničnu liniju. Konačne stanične linije dijele se ograničen broj puta prije nego izgube sposobnost proliferacije, što je genetski proces poznat kao starenje. Stanična linija postaje kontinuirana kada prođe proces transformacije kojim stanice postaju besmrtne. Transformacija se može dogoditi spontano ili može biti virusno ili kemijski izazvana (2).

1.2. Adherentne i suspenzijske kulture

Postoje dva osnovna sustava koja se koriste u tehnologiji kultivacije životinjskih stanica, a to su: suspenzijske kulture, čije stanice rastu neovisno o površini za uzgoj i adherentne kulture, tj. kulture stanica koje rastu pričvršćene za površinu (3).

1.2.1 Adherentne kulture

Adherentne kulture su zastupljene u skoro svim primjenama stanične kulture. Stanice rastu pričvršćene za podlogu. Tijekom uzgoja zahtijevaju periodičnu pasažu, a rast stanica možemo lako provjeriti svjetlosnim mikroskopom. Površinu na kojoj rastu stanične kulture čine obrađene staklene ili polistirenske bočice, ploče i filtri koji su dizajnirani za prihvaćanje stanica. Prihvaćanje stanica može se olakšati upotrebom sintetskih polimera kao što je poli-D-lizin (PDL) i proteini izvanstaničnog matriksa, poput kolagena, koji osiguravaju okvir za adherenciju stanica (3). Stanice disociramo mehanički (struganje) ili enzimski (tripsinizacija), a rast je ograničen površinom. Adherentne kulture imaju primjenu u citologiji i mnogim istraživanjima (2).

1.2.2. Suspenzijske kulture

Suspenzijske kulture potječu iz hematopoetskih stanica, stanica porijeklom iz leukemija i limfoma i nekoliko drugih staničnih linija koje nisu adherentne kao što su stanice izolirane iz mrežnice ili epitelne stanice izolirane iz pleuralnog izljeva. Jednostavnije su za održavanje od adherentnih, ali zahtijevaju vizualni pregled, a kako bi potaknuli rast stanica kulturu prihranjujemo ili je možemo razrijediti i prenijeti u novu posudu za uzgoj. Ne zahtijevaju mehaničku niti enzimsku disocijaciju, a rast je ograničen koncentracijom stanica, što znači da prevelika koncentracija uzrokuje povećano odumiranje stanica. Mogu se održavati u posudama za kulture koje nisu tretirane specifično za kulturu tkiva, ali kada je volumen dodanog medija veći od površine posude za uzgoj zahtijeva agitaciju (tj. mućkanje ili miješanje) za odgovarajuću izmjenu plinova (2). Suspenzijske kulture koriste se za masovnu proizvodnju svih vrsta stanica i mnoge istraživačke primjene.

1.3. Uvjeti kultivacije

Jedna od glavnih prednosti kulture stanica je mogućnost upravljanja uvjetima staničnog uzgoja. Ova tehnika daje mogućnost kontroliranja okoliša u kojem stanice rastu, poput: temperature, pH, osmotskog tlaka, količine kisika (O_2) i ugljičnog dioksida (CO_2),

koncentracije hormona i drugih nutritivnih komponenti. Fizikalno-kemijski uvjeti (pH, temperatura...) dobro su definirani u odnosu na fiziološke (hormoni), a većinu kultivacijskih uvjeta, uz iznimku temperature, kontroliramo pomoću medija (4).

1.3.1 Medij

Medij je najvažnija komponenta za rast stanica u kulturi. Sadrži neophodne vitamine, nutrijente i faktore rasta nužne za rast stanica, te regulira osmotski tlak i pH (6). Iskorak u primjeni kultura životinjskih stanica dogodio se 1955. godine, zahvaljujući Harryju Eagleu koji je napravio opsežnu analizu nutritivnih zahtjeva stanica *in vitro* i formulirao kemijski definirani medij za uzgoj životinjskih stanica poznat kao minimalni esencijalni medij (engl. *Eagle's Minimum Essential Medium* - EMEM), koji je mogao zamijeniti do tada rabljene biološke tekućine promjenjivog i nedefiniranog sastava (7). Postoje tri osnovne vrste medija: bazalni medij, medij sa smanjenim udjelom seruma i medij bez seruma (2).

Bazalni medij sadrži vitamine, aminokiseline, anorganske soli, te izvor ugljika (glukoza) (6). Većina staničnih linija dobro raste u bazalnim medijima, ali oni se moraju nadopuniti serumom. Kako bi se smanjio neželjeni učinak seruma u kulturi, provedeni su eksperimenti u kojima je korišten medij sa smanjenim udjelom seruma. Medij sa smanjenim udjelom seruma predstavlja bazalni medij nadopunjen hranjivim tvarima i tvarima životinjskog podrijetla koji su smanjili količinu seruma koja je uobičajeno potrebna (2). Medij bez seruma obogaćen je određenim prehrambenim i hormonskim dodacima, te na taj način izbjegava problem vezane uz primjenu životinjskih seruma. Kao glavnu prednost možemo istaknuti da odabirom različitih faktora rasta imamo mogućnost medij učiniti selektivnim za određene tipove stanica(1).

Dubleccova modifikacija Eaglovog medija (engl. *Dublecco's Modified Eagle Medium* - DMEM) koristi se u kulturi stanica kao bazalni medij. Temelji se na Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM), ali ima četverostruko veću koncentraciju aminokiselina i vitamina. Medij ne sadrži nikakve hormone rasta, lipide ili proteine koji su bitni za rast stanica. Uspješno kultivira primarne stanice kao što su fibroblasti, neuroni, HUVEC, stanice glatkih mišića ili stanične linije, kao što su HEK-293, HeLa, Cos-7 i PC-12 (5). DMEM High Glucose, kao što mu ime kaže, ima povećan sadržaj glukoze od 4,5 g/L. Uobičajena je praksa dopuna DMEM-a fetalnim goveđim serumom (engl. *fetal bovine serum*- FBS), najčešće u

koncentraciji od 10%, i L-glutaminom. DMEM sadrži bikarbonatni pufer za održavanje optimalne pH razine od 7,4 (2) i obično dolazi s fenol crvenim kao pH indikatorom (6). Stanice uzgojene u DMEM i bilo kojem mediju koji sadrži bikarbonatni puferski sustav, moraju se držati u kontroliranoj okolini CO₂ od 5-10%, a kada se doda fenol crveno možemo pratiti promjene pH od 6,2 (žuto) do 8,2 (crveno) (7).

RPMI 1640 je kratica za Roswell Park Memorial Institute, gdje je ovaj medij i razvijen 1966.g. RPMI 1640 medij razvijen je za podršku limfoblastoidnim stanicama u suspenzijskim kulturama, a također može podržati širok raspon drugih vrsta stanica kao što su HeLa, Jurkat, MCF-7, PC12, PBMC, astrociti i ostali karcinomi (8). Namijenjen je da se nadopunjava serumom, ali otkriveno je da neke stanične linije podržava i u nedostatku seruma.

Medij sa smanjenim udjelom seruma, OptiMEM, je poboljšani minimalni esencijalni medij (MEM) koji omogućuje smanjenje dodavanja fetalnog goveđeg seruma za najmanje 50% bez promjene u brzini rasta ili morfologiji. Može se koristiti s raznim suspenzijama i prijanjajućim stanicama sisavacauključujući Sp2/0-Ag14, AE-1-HB-72, CHO, BHK-21 [C-13], HEK-293 i primarne fibroblaste. Koristi puferski sustav natrijevog bikarbonata (2,4 g/L) za održavanje fiziološkog pH, te sadrži inzulin, transferin, hipoksantin, timidin i elemente u tragovima (9).

Gledajući kemijske sastave medija, DMEM i RPMI imaju najsličniji sastav i dijele najviše kemijskih komponenti. Zajedničke aminokiseline su im: glicin, arginin, cistin, glutamin, histidin, izoleucin, leucin, metionin, fenilalanin, serin, treonin, triptofan, tirozin i valin (7,8). Osim aminokiselina zajedničko im je i nekoliko vitamina i soli, poput: folne kiseline, nikotinamida, riboflavina, kalijeva jodida i drugih (7,8). OptiMEM sadrži puferski sustav s bikarbonatom kao i DMEM medij, a kao zajednička komponenta sva tri medija je fenol crvenilo za praćenje promjena pH vrijednosti (7-9).

1.3.2. Serum

Serum je izvor prijanjajućih faktora, hormona, lipida, faktora rasta i minerala za stanice u bazalnom mediju. Regulira propusnost stanične membrane i služi kao prijenosnik lipida, mikronutrijenata i enzima u stanicu (6). Fetalni goveđi serum najčešće je korišten serum. Sadrži veće količine faktora rasta, vrlo malo gama globulina i manje proteina

komplementa u odnosu na druge serume kao što su tećeći, svinjski, odrasli goveđi i drugi (10). Važan je i jer smanjuje mogućnost lize stanica. Međutim, korištenje seruma ima nedostatke i neželjene učinke: inhibicija ili stimulacija rasta stanica, visoka cijena, varijabilnost i specifičnost (2). Kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije, serum je potrebno nabaviti iz provjerenih izvora.

1.3.3. pH, CO₂ i temperatura

Među različitim sojevima stanica postoje varijabilnosti u odgovarajućem pH području u kojem rastu, ali većina staničnih linija sisavaca dobro raste pri pH 7,4. Neke stanične linije fibroblasta rastu bolje u blago alkalnoj sredini pri pH od 7,4 do 7,7, a neke transformirane stanične linije bolje rastu u kiselijoj okolini na pH od 7,0 do 7,4 (2). Većina komercijalno dostupnih medija za uzgoj kulture uključuje fenol crveno kao pH indikator, što omogućuje konstantno praćenje pH vrijednosti (11). Tijekom rasta stanica, zbog metabolita koje oslobađaju stanice, medij mijenja boju kako se pH mijenja. Pri niskom pH fenol crveno mijenja boju medija u žutu, a pri višem pH mijenja boju u ljubičastu. Pri optimalnom pH od 7,4 medij je žarko crvene boje. Međutim, za studije u kojima se koriste stanice osjetljive na estrogen kao što su stanice dojke preporučljivo je koristiti medije bez fenol crvenog jer oponaša djelovanje steroidnih hormona (12).

Medij kontrolira pH i puferira stanice u kulturi protiv neželjenih promjena pH. Kao pufer najčešće se koriste bikarbonatni pufer (CO₂-HCO₃) ili organski pufer, najčešće s HEPES-om. Budući da promjena u atmosferskom CO₂ može promijeniti pH medija, bitna je ravnoteža otopljenog CO₂ i bikarbonata. Iako većina istraživača koristi 5-7% CO₂, svaki medij ima preporučenu koncentraciju bikarbonata i CO₂ za postizanje odgovarajućeg pH (6).

Kako bi mogli prilagoditi temperaturu uzgoja stanica potrebno je znati podrijetlo stanica, jer temperature uzgoja u kulturi ovisi o temperaturi domaćina iz koje je stanica izolirana. Također, moramo uzeti u obzir da temperature kože nije jednaka kao i temperatura npr. skeletnih mišića (temperature kože je niža). U inkubatoru uvijek postavljamo temperaturu nižu od optimalne, jer je pregrijavanje puno opasnije za stanice od nižih temperatura. Tako se stanične linije ljudi održavaju na 36-37°C, insekata na 27°C, ptica na 38,5°C, a stanične linije hladnokrvnih životinja podnose temperaturni raspon od 18 do 26 °C(1).

1.4. Primjena kultura životinjskih stanica

Kulture životinjskih stanica ima vrlo široku primjenu u znanosti i biotehnologiji. Danas zauzimaju glavno mjesto u proizvodnji raznih biofarmaceutika za terapijsku primjenu i kao ekspresijski sustavi za proizvodnju proteina(5). Primjenom kulture stanica proizvode se monoklonska protutijela, rekombinantni proteini, cjepiva : cjepivo protiv bjesnoće, rubeole, ospica, zaušnjaka, gripe, eritropoetin, interferon α , factor VII, antitrombin III (5). Broj biofarmaceutika dobivenih kulturom stanica svakog dana raste, a isto tako je velik broj u fazama kliničkog ispitivanja što ukazuje na veliku važnost primjene kulture stanica.

Znanstvena primjena je prisutna u skoro svim granama znanosti. U posljednje vrijeme dolazi do sve veće zamjene pokusa na životinjama različitim oblicima kulture stanica. Pokusi na laboratorijskim životinjama omogućili su brojna važna postignuća u medicini. Međutim u radu s pokusnim životinjama sve se više pažnje posvećuje etičkim postupcima, a najveći utjecaj na zamjenu pokusa na laboratorijskim životinjama imala je primjena kultura tkiva i stanica u znanstvenim istraživanjima (11). Kada su pokusi na životinjama neizbježni unutar cjelokupnog programa istraživanja, moguće je zamijeniti primjenu životinja s *in vitro* metodama unutar pojedinog projekta, u pojedinačnom eksperimentu, ili u samo jednom tipu postupka (11).

2. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. procijeniti brzinu rasta stanica u različitim najčešće korištenim medijima
2. ispitati utjecaj promjene medija na brzinu rasta

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Stanične linije

U ovom radu korištene su dvije komercijalno dostupne stanične linije:

- Caco-2 (Caco-2 [Caco2] - HTB-37, ATCC) – stanice adenokarcinoma debelog crijeva (adherentne stanice)
- THP-1 (THP-1-TIB-202, ATCC) - stanice akutne monocitne leukemije (stanice u suspenziji)

3.1.2. Kemikalije

Medij DMEM, high glucose, bez glutamina, Capricorn, Njemačka

Medij RPMI-1640, s glutaminom, Capricorn, Njemačka

Medij OptiMEM (1x), Gibco, SAD

HEPES, puferska otopina, 1M, Capricorn, Njemačka

Natrijev piruvat, 100 mM, Capricorn, Njemačka

Otopina antibiotika-antimikotika, 100x, Capricorn, Njemačka

FBS, fetalni goveđi serum, Capricorn, Njemačka

PBS, otopina 1x

Tripsin-EDTA (0,25%) u HBSS (1x), Capricorn, Njemačka

Glutamin-stabilan (alanin-glutamin, glutamin-S), Sigma, Njemačka

Eritrozin B, otopina 0,2%, Sigma, Njemačka

3.2. METODE

3.2.1 Uspostavljanje kulture adherentnih stanica

Stanice adenokarcinoma debelog crijeva, Caco-2, nasadili smo u tri različita medija: DMEM, RPMI i OptiMEM. Stanice su se kultivirale u pločama za adherentne stanice sa 6 jažica i inkubirale u CO₂inkubatoru (IGO 150 Cell Life, JOUAN) u kontroliranoj atmosferi na 37°C i 5% CO₂. Svakodnevno smo pratili stanični rast, te promjene zabilježili fotografiranjem stanica. Prva fotografija zabilježena je nakon 24 sata od uspostavljanja kulture, a preostale dvije nakon 72 sata od prethodne fotografije. Fotografiranjem smo dobili vizualni prikaz procesa rasta stanica, te smo pratili promjene u morfologiji, brzini rasta i raspadanju stanica.

3.2.2. Uspostavljanje kulture suspenzijskih stanica

Stanice akutne monocitne leukemije, THP-1, također smo nasadili u tri različita medija: DMEM, RPMI i OptiMEM. Stanice su se kultivirale u pločama za suspenzijske stanice sa 6 jažica, inkubirale na isti način kao i Caco-2 stanična linija, te je ostatak postupka ponovljen i istovjetan sa adherentnim stanicama.

3.2.3. Brojanje stanica

Stanice se broje nakon bojanja s eritrozinom B. Kod mrtvih stanica eritrozina B ulazi u citoplazmu i boji ih ružičasto. Kod živih stanica eritrozina ne može ući u stanicu, te one ostaju neobojene. Broj stanica određen je pomoću Bürker-Türkove komorice za brojanje stanica. Broje se žive stanice u kvadrantima (slika), a broj se računa na slijedeći način:

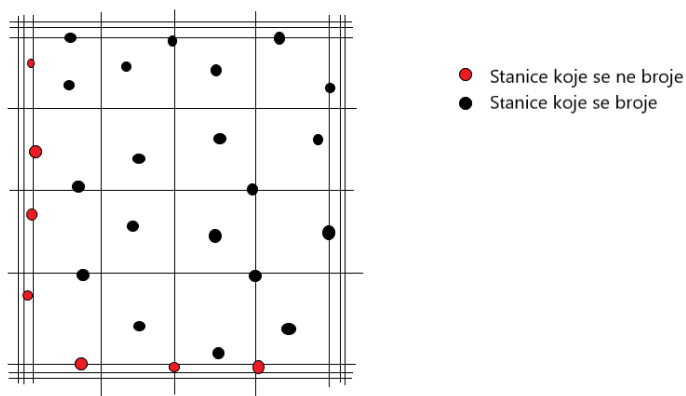
$$N/4 \cdot 3 = x \cdot 10^4 \text{ stanica/dm}^3$$

Gdje je:

N - broj stanica

4 - broj kvadranta

3 - faktor razrjeđenja



Slika 1. Schematski prikaz Bürker-Türk komorice

Izvor: izradila autorica rada

3.2.4. Brojanje adherentnih stanica

Nakon uspostavljanja kulture, stanice brojimo u pravilnim vremenskim intervalima (svaka 24 sata). Adherentne stanice, kao što su stanice Caco-2 stanične linije potrebno je prvo odvojiti od površine kako bi mogli odrediti njihov broj. Stanice odvajamo tripsinizacijom, a cijeli postupak obavlja se u sterilnim uvjetima. Prvo je potrebno pokupiti sav medij pri tome pazeći da ne oštetimo stanice. Nakon što smo pokupili sav medij, dodajemo 200 μ l tripsina (Tripsin-EDTA (0,25%) u HBSS (1x)) u jažicu i inkubiramo 3 do 5 minuta. Zatim dodajemo 500 μ l PBS-a, resuspendiramo i premjestimo u tubicu. Kada smo dodani PBS premjestili u tubicu, dodamo još toliko PBS-a i ostavimo u jažici dok ne isperemo preostale jažice. Preostali PBS pokupimo i pridružimo odgovarajućim tubicama u kojima se nalazi prvih 500 μ l PBS-a. Sadržaj u tubici resuspendiramo i 50 μ l suspenzije uzmemo i stavimo u ploču za brojanje. U svaku jažicu na ploči za brojanje dodajemo još 30 μ l eritrozina (Eritrozin B, otopina 0,2%, Sigma), sve resuspendiramo, stavljamo u hemocitometar i brojimo pod mikroskopom (Eclipse E200, Nikon).

3.2.5. Brojanje suspenzijskih stanica

Kao i sa Caco-2 staničnom linijom, THP-1 stanice također brojimo svaka 24 sata. Budući da su THP-1 stanice suspenzijske, tripsinizacija nije potrebna. Stanice je potrebno

dobro resuspendirati pipetom, kako bi se razbili klasteri, i prebacitiu ploču za brojanje. Cijeli postupak se obavlja u sterilnim uvjetima. U jažice na ploči za brojanje dodamo 30 μ l eritrozina i ponovimo postupak brojanja kao i kod adherentnih stanica.

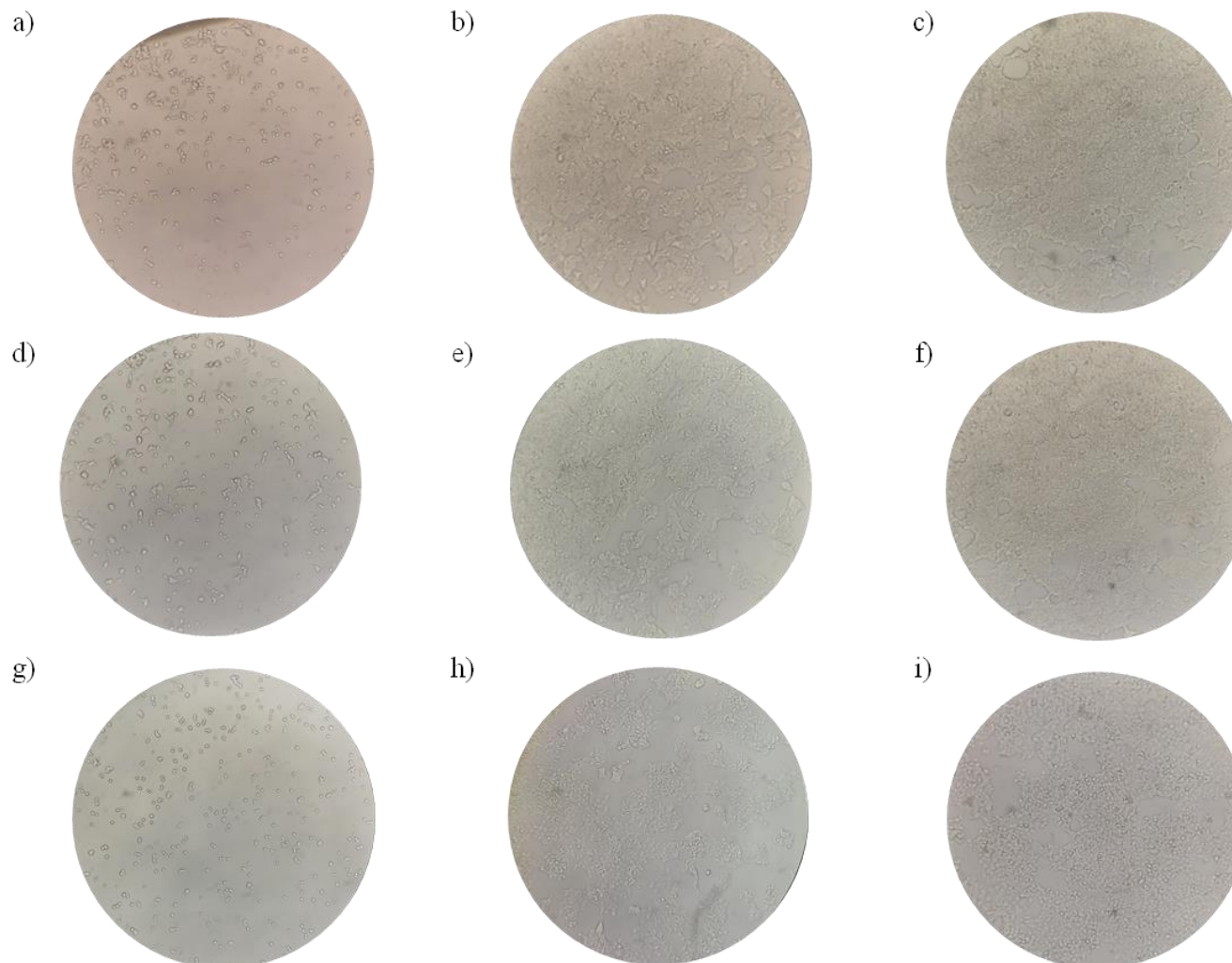
3.2.6. Statističke metode

Sva brojanja su izvedena u triplikatu. Statistička značajnost je određena pomoću t-testa u programu Statistica za Windowse, 14.0.0.15. TIBCO.

4. REZULTATI

4.1. Rast adherentnih stanica u različitim medijima

Prema podacima dostupnim na stranicama ATCC preporučeni medij za staničnu liniju Caco-2 je DMEM. Uz ovaj medij odabrali smo rast testirati na medijima RPMI te specijalnom mediju OptiMEM nakon isteka roka trajanja. Caco-2 stanična linija pokazala je najbrži rast u DMEM mediju, zatim u RPMI, a najsporiji rast zabilježen je u OptiMEM mediju. Nakon 24 sata vidjeli smo da su se stanice Caco-2 stanične linije umnožile, a nakon 72 sata od nasađivanja uočavamo kako su se stanice adherirale za površinu jažice. Nakon 168 sati boravka u kulturi stanice još nisu postigle 100% konfluentnost, tedalje nastavljaju svoj rast. Rezultati su prikazani na slici br. 2.

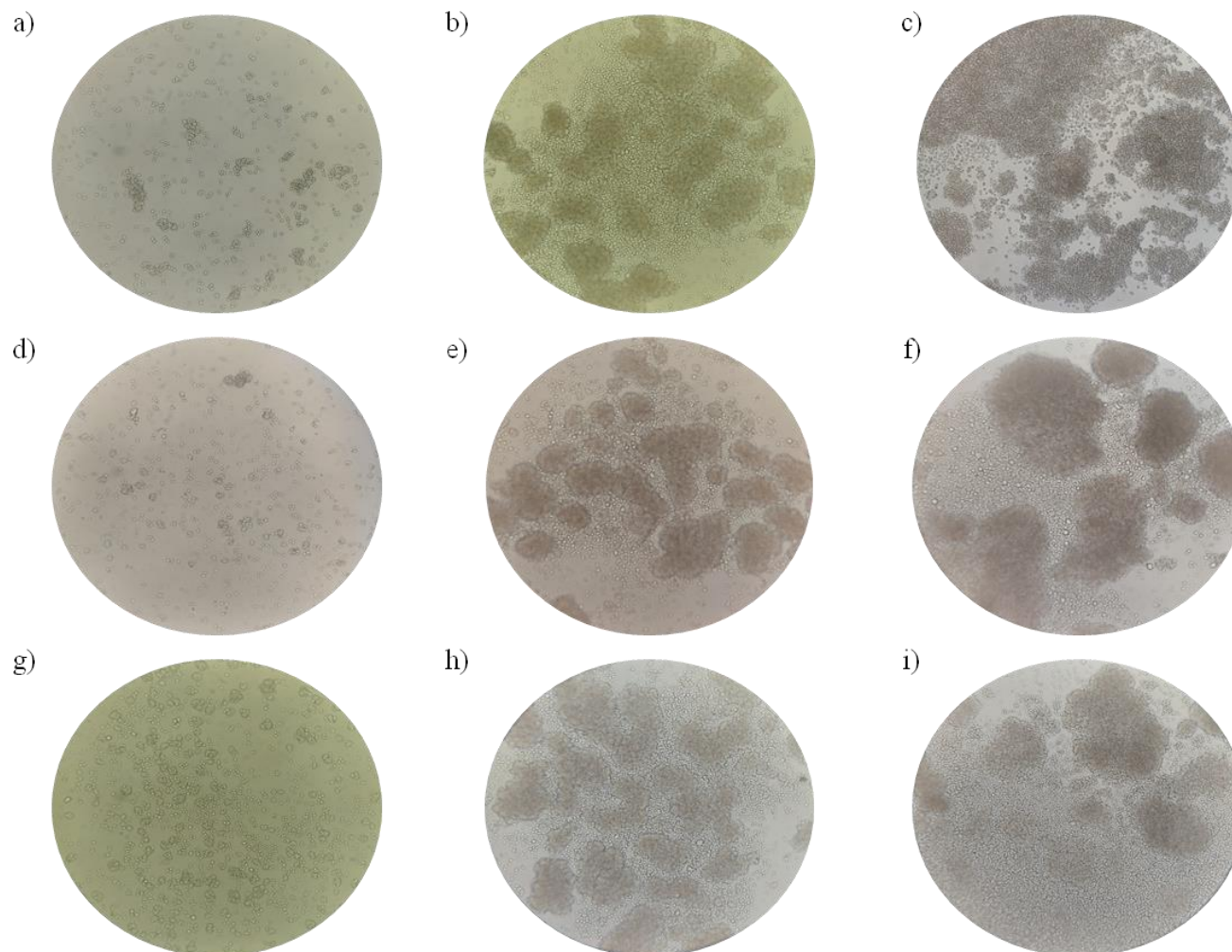


Slika 2. Rast stanica Caco-2 u različitim medijima

Stanice nasađene u preporučeni medij (DMEM - slike a,b,c), zamjenski medij (RPMI - slike d, e, f) te specijalni medij (OptiMEM - slike g,h, i) su slikane 24 sata (a,d,g), 72 sata (b,e,h) i 168 sati (c,f,i) nakon nasađivanja (Axiovert 25,Zeiss, povećanje 10x)

4.2. Rast suspenzijskih stanica u različitim medijima

Za THP-1 staničnu liniju prema podacima ATCC-a je RPMI medij. Kao i kod prethodne linije koristili smo jedan preporučeni medij, jedan zamjenski te jedan medij kojem je istekao rok trajanja. THP-1 stanična linija pokazala je najbrži rast u RPMI mediju, zatim u DMEM, a najsporiji rast bio je u OptiMEM mediju. Na slici broj tri vidimo da THP-1 stanična linija pri svom rastu stvara klastere, te da u RPMI i DMEM mediju nakon 168 sati provedenih u mediju nije postignuta 100% konfluentnost, dok je kod OptiMEM medija postignuta konfluentnost i broj stanica je nakon 168 sati počeo opadati.

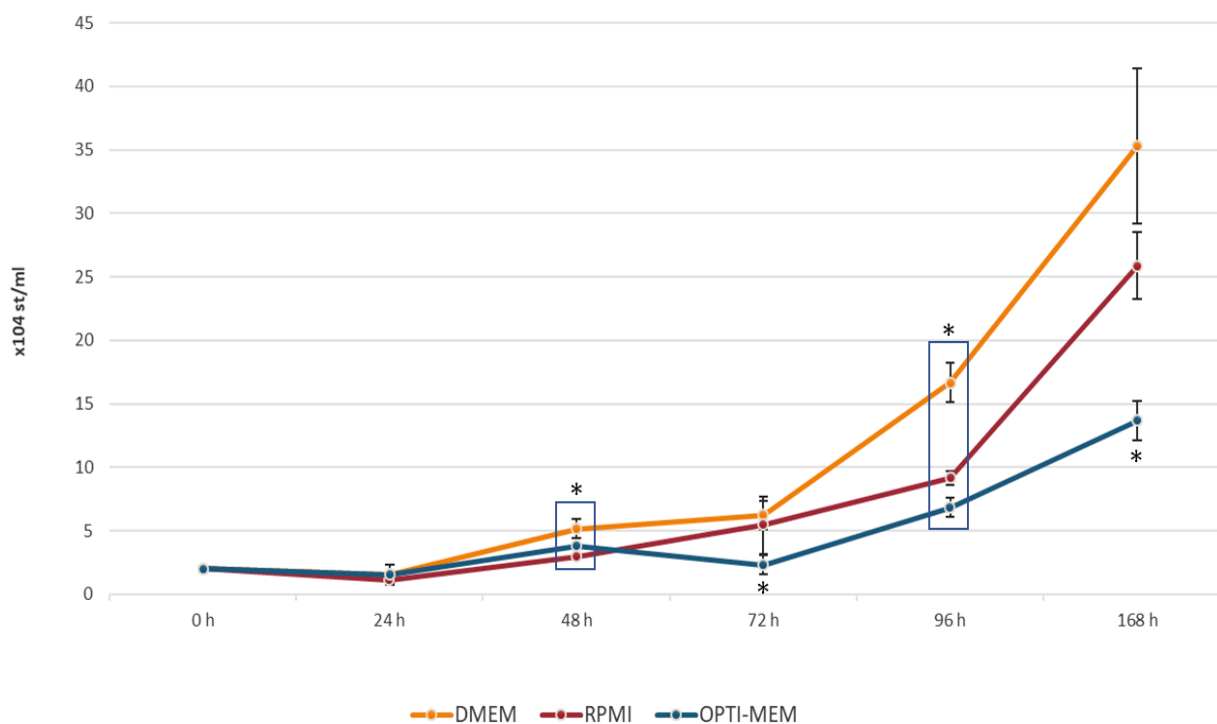


Slika 3. Rast stanica THP-1 u različitim medijima

Stanice nasađene u preporučeni medij (RPMI - slike a,b,c), zamjenski medij (DMEM – slike d, e, f) te specijalni medij (OptiMEM - slike (g,h, i) su slikane 24 sata (a,d,g), 72 sata (b,e,h) i 168 sati (c,f,i) nakon nasađivanja (Axiovert 25, Zeiss, povećanje 10x)

4.3. Krivulja rasta Caco-2 stanica u različitim medijima

Osim fotografski rast stanica smo pratili i brojanjem stanica u pravilnim vremenskim intervalima. Broj stanica koji je određen u preporučenom mediju je uspoređen s brojem stanica u ostalim medijima. U usporedbi RPMI medija s preporučenim medijem statistički značajnu razliku brzine rasta dobili smo u intervalima nakon 48 i 96 sati od nasađivanja ($p=0,008$ i $p=0,001$). Usporedba brzine rasta stanica u DMEM mediju (preporučeni medij) s OptiMEM medijem pokazala je statistički značajnu razliku u svim vremenskim intervalima osim 24 sata nakon nasađivanja kao što je prikazano na krivulji rasta na slici broj četiri.



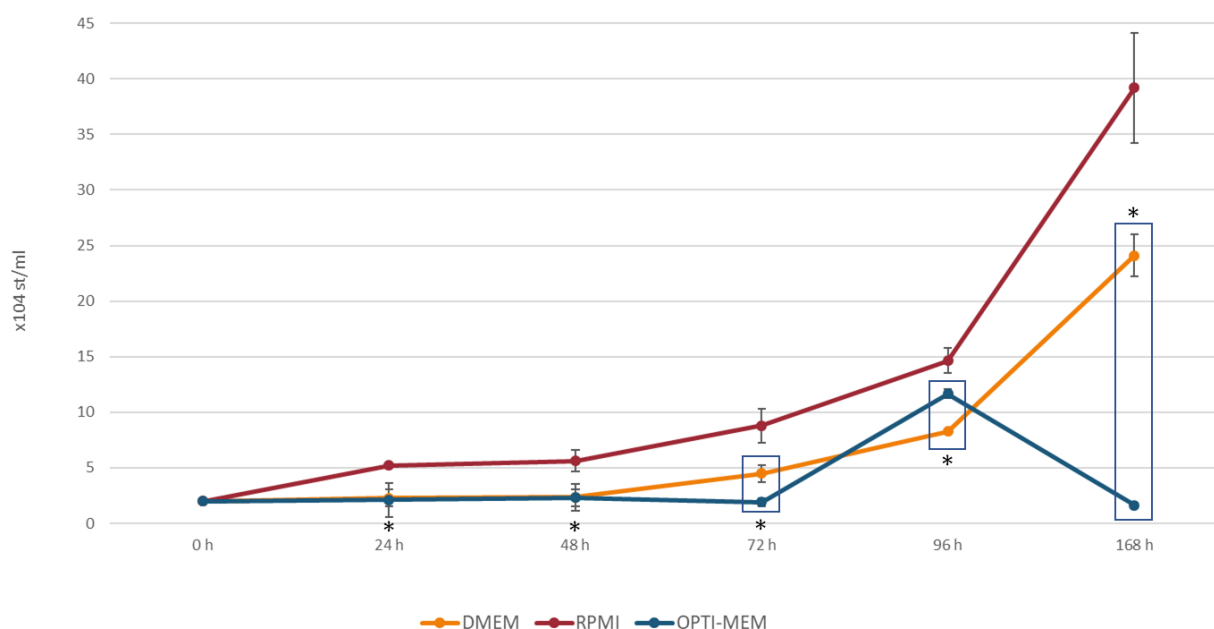
Slika 4. Krivulja rasta Caco-2 stanica u različitim medijima

Krivulja je dobivena brojanjem stanica u označenim vremenskim intervalima od nasađivanja.

Rezultati su prikazani srednjom vrijednosti sa standardnom devijacijom (* označava statistički značajnu razliku u usporedbi s preporučenim medijem $p < 0,05$)

4.4. Krivulja rasta suspenzijskih stanica u različitim medijima (THP-1)

Za stanice THP-1 koje rastu u suspenziji preporučeni medij je RPMI 1640. Obradom statističkih podataka i usporedbom rezultata koji su dobiveni rastom stanica u različitim medijima s rastom stanica u preporučenom mediju dobili smo da stanice THP-1 statistički značajno bolje rastu u preporučenom mediju u odnosu na DMEM medij tijekom cijelog promatranog perioda. Kako je brzina rasta stanica u DMEM mediju i OptiMEM mediju slična, statistički značajna razlika u svim vremenskim točkama pri usporedbi s RPMI medijem je nađena i kod usporedbe s OptiMEM medijem što je jasno vidljivo na krivulji rasta prikazanoj na slici broj pet.



Slika 5. Krivulja rasta THP-1 stanica u različitim medijima

Krivulja je dobivena brojanjem stanica u označenim vremenskim intervalima od nasađivanja.

Rezultati su prikazani srednjom vrijednosti sa standardnom devijacijom (* označava statistički značajnu razliku u usporedbi s preporučenim medijem $p < 0,05$)

5. RASPRAVA

Kultura stanica postala je nezaobilazna tehnika u raznim biomedicinskim istraživanjima, te se danas koristi u istraživanju raka, proizvodnji cjepiva, genskoj terapiji, proizvodnji i poboljšanju lijekova, istraživanju biologije matičnih stanica i u mnogim drugim primjenama (12). Najvažniji korak u kulturi stanica je odabir prikladnog medija potrebnog za rast stanica u *in vitro*. Medij za kulturu stanica je gel ili tekućina izrađena da podržava rast stanica, a sadrži odgovarajuće spojeve i izvore energije koji reguliraju stanični ciklus.

Životinjske stanice mogu se uzgajati u potpunom prirodnom mediju ili u umjetnom mediju zajedno s nekim prirodnim dodacima. Prirodni mediji sastoje se isključivo od prirodnih bioloških tekućina, a glavni nedostatak je njihova loša kvaliteta i neponovljivost zbog nepoznatog točno definiranog sastava. Umjetne podloge pripremaju se dodavanjem hranjivih tvari (organskih i anorganskih), vitamina, soli, plinova O₂ i CO₂, serumskih proteina, ugljikohidrata i kofaktora (13). Odabir podloge ovisi o vrsti stanica koje se uzgajaju, kao i o svrsi kulture i resursima dostupnim u laboratoriju (14). Različite vrste stanica imaju vrlo specifične zahtjeve za rast, stoga najprikladnija podloga za svaki tip stanice mora biti određena eksperimentalno (15).

U ovom radu proučavano je kako vrsta medija utječe na rast stanica. Osim vrste medija korišten je i medij kojem je istekao rok trajanja (OptiMEM). Za svaku staničnu liniju postoje eksperimentalno određeni medij za optimalni rast stanica te linije. U našem radu smo izabrali dvije stanične linije za koje su preporučeni različiti mediji. Svaka linija je uzgajana u oba medija kako bi vidjeli koliko sam medij utječe na rast stanica. Kako je jedina razlika u pripravi bio bazalni medij bilo koja razlika u rastu bi se mogla pripisati razlici u samom sastavu medija. Stanične linije Caco-2 i THP-1 uzgajane su u tri različita medija kroz 168 sati, a svaka 24 sata stanice su bile brojane. Caco-2 stanična linija pripada adherentnim stanicama, te je nakon 24 sata uzgoja u sva tri medija zabilježen podjednaki rast stanica, a nakon 48 sati vidljiva je adherencija stanica za površinu te blago prevladava broja stanica u DMEM mediju. U sljedećim danima stanice su očekivano najbrže rasle u DMEM mediju, a najsporije u OptiMEM-u. Ovo je očekivano ponašanje tijekom uzgoja jer je korišten OptiMEM medij onaj koji se najviše razlikuje po svom sastavu. Slično se dogodilo i sa THP-1 stanicama. One su također nakon 24 sata zabilježile rast u sva tri medija, a već na početku se izdvojio RPMI medij u kojem su stanica rasle brže nego u DMEM i OptiMEM mediju. Za

razliku od Caco-2 stanica kod kojih se broj stanica u niti jednom mediju nije smanjio tijekom istraživanja, kod THP-1 stanica nakon 96 sati boravka u kulturi u OptiMEM mediju postignuta je 100% konfluentnost i broj stanica je naglo pao. U RPMI i DMEM mediju nakon 168 sati stanice su i dalje rasle, a broj stanica i dalje je bio najveći u RPMI mediju.

Rezultati su pokazali da je preporučeni medij najviše potiče rast svake od testiranih staničnih linija, ali kao je sastav medija sličan (7 – 9), stanice mogu duže periode preživjeti i u mediju koji nije preporučen za njihov uzgoj. Iznimka je OptiMEM koji nije predviđen za uzgoj nego samo za eksperimentalni kratkotrajni rast (9). Sve ovo se poklapa s različitim istraživanjima koja su pokazala da su svi mediji koji se danas koriste u kulturi stanica po sastavu pogodni za uzgoj svih stanica (18). Pokazano je kako serum ima puno veći utjecaj na rast stanica nego sam kemijski sastav medija u kojem stanice rastu. Kako napreduje korištenje i primjena kutiviranih stanica u znanosti i industriji tako se sve više radi na definiranju točnog sastava medija kojem se posvećuje sve više pozornost kako bi se smanjila varijabilnost, i etička pitanja oko dobivanja najčešće korištenog fetalnog goveđeg seruma (18,19).

U konačnici možemo reći da je ovaj ekperiment pokazao kako u trenucima kada preporučeni medij nije dostupan stanice mogu rasti i u drugim medijima koji se neznatno razlikuju po svom sastavu. Također, iako medij nije preporučljivo koristiti nakon isteka roka trajanja, medij koji nije kompletiran dodatkom seruma ili antibiotika se može koristiti još neko vrijeme ako nemamo drugih mogućnosti.

6. ZAKLJUČAK

Iz provedenog istraživanja i dobivenih rezultata možemo zaključiti:

- Adherentne stanice iz Caco-2 stanične linije najbrže rastu u DMEM mediju, zatim u RPMI, a najsporije u OptiMEM mediju
- Suspenzijske stanice iz THP-1 stanične linije najbrže rastu u RPMI mediju, zatim u DMEM i najsporije, u OptiMEM mediju
- Stanice mogu preživjeti i rasti u različitim medijima, ali je rast sporiji u usporedbi s preporučenim medijem

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ciljevi istraživanja su odrediti brzinu rasta stanica u različitim najčešće korišćenim medijima i odrediti utjecaj promjene medija na brzinu rasta.

Nacrt studije: In vitro studija – kontrolirani pokus

Materijali i metode: Korištene su stanične linije Caco-2 i THP-1 kultivirane u tri različita medija: DMEM, RPMI i OptiMEM. Stanice smo brojali, bojanjem eritrozinom, svaka 24 sata tijekom trajanja istraživanja. Osim brojanja, rast stanica je praćen fotografiranjem kulture u pravilnim vremenskim razmacima.

Rezultati: Obje stanične linije najbolje rastu u preporučenom mediju. Brzina rasta u drugim medijima je sporija, ali se stanice u oba zamjenska medija dobro razvijaju. THP-1 stanice su osjetljivije na promjenu medija te je primjećena značajna razlika u broju stanica u usporedbi sa zamjenskim medijima, dok je razlika kod Caco-2 stanica vidljiva tek nakon dužeg uzgoja.

Zaključak: Iz provedenog istraživanja i dobivenih rezultata možemo zaključiti da promjena medija utječe na brzinu rasta stanica ali stanice mogu rasti u zamjenskim medijima neko vrijeme. Korištenje preporučenog medija osigurava najbrži rast stanica u kulturi.

Ključne riječi: *in vitro*, kultura stanica, medij, stanična linija

8. SUMMARY

Effect of media composition and freshness on cell growth

Objectives: The objectives of the research are to determine the growth rate of cells in various commonly used media and to determine the influence of media change on the growth rate.

Study Design: In vitro study - controlled experiment

Material and Methods: The used cell lines Caco-2 and THP-1 were cultured in three different media: DMEM, RPMI and OptiMEM. We counted the cells, by staining them with erythrosin, every 24 hours for the duration of the research. In addition to counting, cell growth was monitored by photographing the culture at regular intervals.

Results: Both cell lines grow best in the recommended medium. The growth rate in the other media is slower, but the cells grow well in both replacement media. THP-1 cells are more sensitive to media change, and a significant difference in the number of cells was observed compared to replacement media, while the difference in CaCO-2 cells is visible only after longer cultivation.

Conclusion: From the conducted research and the obtained results, we can conclude that the change of media affects the speed of cell growth, but cells can grow in replacement media for some time. Using the recommended medium ensures the fastest growth of cells in culture.

Keywords: *in vitro*, cell culture, media, cell line

9. LITERATURA

1. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6 th edition. Canada: Wiley-Blackwell;2010
2. Cell culture basics handbook. 2020. Dostupno na adresi:
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Handbooks/gibco-cell-culture-basics-handbook.pdf>. Datum pristupa: 17.06.2023.
3. Merten OW. Advances in cell culture: Anchorage dependence. Philosophical transactions of the royal society B. 2015. Datum pristupa: 17.07.2023. Dostupno na:
<http://doi.org/10.1098/rstb.2014.0040>
4. Wei-Shou Hu, James M. Piret: Mammalian cell culture processes, Current Opinion in Biotechnology, Volume 3, Issue 2, 1992, Pages 110-114, ISSN 0958-1669
5. Radošević, K. "Osvježimo znanje: Kulture životinjskih stanica." *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske* 69.9-10 (special issue) (2020): 561-562.
6. Meenakshi A.: Cell Culture Media: A Review, *MATER METHODS* 2013;3:175
7. Capricorn Scientific. DMEM s visokim sadržajem glukoze (4,5 g/l), s L-glutaminom. Dostupno na: <https://www.capricorn-scientific.com/en/shop/dmem-high-glucose-4-5-g-l-with-l-glutamine~p1126>. Datum pristupa: 27.06.2023.
8. Capricorn Scientific. RPMI 1640, s L-glutaminom. Dostupno na:
<https://www.capricorn-scientific.com/en/shop/rpmi-1640-medium-with-l-glutamine~p1146>. Datum pristupa: 27.06.2023.
9. Fisher scientific. Gibco™ Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium. Dostupno na:
<https://www.fishersci.com/shop/products/opti-mem-i-reduced-serum-medium-12/p-4919917>. Datum pristupa: 27.06.2023.
10. Johnson m. Fetal Bovine Serum. *Materials and Methods*. 2012;2:117
11. Reznikov B. [Incubation of Brucella on solid nutrient media with a phenol red indicator]. *Veterinariia*. 1972;7:109-10. Dostupno na:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4579994/>. Datum pristupa: 12.07.2023.
12. Berthois Y, Katzenellenbogen J, Katzenellenbogen B. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:2496-500. Dostupno na:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3458212/>. Datum pristupa: 12.07.2023

13. Švob Štrac, D. & Brdar, B. (2016) Stanične kulture kao zamjena istraživanja na pokusnim životinjama. Priroda 01-02/2016. Popularni rad. Dostupno na: <https://www.bib.irb.hr/845686>. Datum pristupa: 12.07.2023.
14. Nema R., Khare S. An animal cell culture: Advance technology for modern research. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 3 (2012) 219-226. Dostupno na: https://www.scirp.org/pdf/ABB20120300006_15154571.pdf. Pristupljeno: 26.06.2023.
15. Morgan J, Morton H, Parker R. Nutrition of animal cells in tissue culture; initial studies on a synthetic medium. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1950;73:1-8
Dostupno na adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15402504/>. Datum pristupa: 26.06.2023.
16. Yang H. [Selection of culture media for human and rabbit corneal epithelia]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 1991;27:351-3
Dostupno na adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1818825/>. Datum pristupa: 26.06.2023.
17. Sato JD, Hayashi I, Hayashi J, Hoshi H, Kawamoto T, McKeehan WL et al. Specific cell types and their requirements. In: Davis JM, editor. *Basic Cell Culture: A Practical Approach.* Oxford: Oxford University Press; 1994.
18. Yao, T, Asayama, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol.* 2017; 16: 99– 117. Datum pristupa: 17.7.2023. Dostupno na: <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>
19. J. van der Valk, D. Mellor, R. Brands, R. Fischer, F. Gruber, G. Gstraunthaler, L. Hellebrekers, J. Hyllner, F.H. Jonker, P. Prieto, M. Thalen, V. Baumans: The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture, *Toxicology in Vitro*, Volume 18, Issue 1, 2004

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Nikolina Kovačević

Datum i mjesto rođenja: 16. siječnja 2002., Osijek, Republika Hrvatska

Adresa: Zlatana Sremca 17a Antin, 32214 Tordinci

Telefon: 099/ 842-0946

E-mail: nikolinak092@gmail.com

Obrazovanje:

2020. Maturirala u Prirodoslovnoj gimnaziji Ruđera Boškovića u Osijeku

2020. Upisana na Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika u Osijeku