

Primarna kultura perifernih mononuklearnih stanica miša soja C57BL/6N

Skaramuca, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:962842>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-01**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Iva Skaramuca

**PRIMARNA KULTURA PERIFERNIH
MONONUKLEARNIH STANICA MIŠA
SOJA C57BL/6N**

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Iva Skaramuca

**PRIMARNA KULTURA PERIFERNIH
MONONUKLEARNIH STANICA MIŠA
SOJA C57BL/6N**

Završni rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentorica je rada: doc. dr. sc. Katarina Mišković-Špoljarić

Rad ima: 26 stranica, 11 slika

ZAHVALA

Veliku zahvalnost dugujem mentorici doc. dr. sc. Katarini Mišković-Špoljarić na pruženoj pomoći, utrošenom vremenu, pruženom znanju i prilici za suradnju pri izradi ovog rada i tijekom školovanja.

Također zahvaljujem doktorandu Miloradu Zjaliću na pruženoj pomoći, izdvojenom vremenu i znanju.

Hvala mojim kolegama i prijateljima koji su mi bili podrška tijekom školovanja i koji su mi studiranje učinili ljepšim.

Posebno hvala mojoj obitelji koja mi je omogućila školovanje. Hvala na razumijevanju i odricanju.

Sadržaj

1.	UVOD	1
1.1.	PRIMARNA KULTURA STANICA.....	1
1.1.1.	USPOSTAVLJANJE PRIMARNE KULTURE STANICA.....	2
1.2.	LIMFOCITI.....	6
1.2.1.	LIMFOCITI B	6
1.2.2.	LIMFOCITI T	7
1.3.	MIŠ SOJA C57BL/6N.....	9
2.	CILJ	10
3.	MATERIJALI I METODE	11
3.1.	MATERIJALI.....	11
3.1.1.	POKUSNE ŽIVOTINJE	11
3.1.2.	KEMIKALIJE	11
3.2.	METODE.....	12
3.2.1.	UZORKOVANJE KRVI IZ SRCA ŽIVOTINJE	12
3.2.2.	IZOLACIJA UKUPNIH LIMFOCITA METODOM GRADIJENTA GUSTOĆE – LYMPHOPREP.....	13
3.2.3.	KULTIVACIJA STANICA <i>IN VITRO</i>	13
3.2.4.	ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH STANICA U KULTURI.....	14
4.	REZULTATI.....	15
5.	RASPRAVA.....	19
6.	ZAKLJUČAK	21
7.	SAŽETAK.....	22
8.	SUMMARY	23
9.	LITERATURA.....	24
10.	ŽIVOTOPIS	26

POPIS KRATICA

APC – antigen predočne stanice (*engl. antigen presenting cells, APC*)

BCR – B-stanični receptor (*engl. B- Cell Receptor, BCR*)

DMEM – *engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

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

HEPA - *engl. high-efficiency particulate air, HEPA*

MEM – *engl. Eagle's Minimal Essential Medium*

MHC – glavni sustav tkivne snošljivosti (*engl. Major Histocompatibility Complex, MHC*)

MSC – mikrobiološki sigurnosni kabinet (*engl. Microbiological Safety Cabinet, MSC*)

PBMC – mononuklearne stanice periferne krvi (*engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC*)

PBS – fosfatni pufer (*engl. phosphate buffer solution, PBS*)

RPMI 1640 – *engl. Roswell Park Memorial Institute 1640*

TCR – T-stanični receptor (*engl. T- Cell Receptor, TCR*)

Th – pomoćnički T limfocit (*engl. T helper, Th*)

WT – divlji tip (*engl. wild type, WT*)

1. UVOD

Stanica je osnovna gradivna jedinica živog organizma. Stanična kultura uspostavlja se izuzimanjem tkiva iz živog organizma (humani, životinjski ili biljni uzorak) i uzgojem u kontroliranim uvjetima (1). Stanične se kulture dijele na primarne, sekundarne i stanične linije koje mogu biti konačne (imaju ograničeni broj dioba) i kontinuirane. Stanice koje se najčešće koriste za uzgoj u primarnoj kulturi su fibroblasti, keratinociti, epitelne stanice, melanociti te hematopoetske stanice. Primjena primarne kulture stanica u stalnom je porastu u području stanične i molekularne biologije omogućavajući razvoj izvrsnih sistemskih modela za proučavanje normalne fiziologije i biokemije stanica poput metaboličkih studija, studije starenja i stanične komunikacije. Također se primjenjuje za proučavanje učinka lijekova, toksičnih supstanci te studije mutageneze i karcinogeneze (2).

1.1. PRIMARNA KULTURA STANICA

Primarna kultura stanica dobiva se izolacijom stanica izravno iz tkiva. Primarna kultura prva je faza u kultiviranju stanica nakon izolacije do prvog presađivanja. Ovisno o porijeklu, stanice u kulturi mogu biti adherentne i stanice u suspenziji. Adherentne se stanice izoliraju iz tkiva ili organa u kojima su nepokretne te za rast zahtijevaju prijanjanje za podlogu. Obično tvore monoslojne kulture. Takve su stanice, npr. fibroblasti i epitelne stanice. Stanice u suspenziji ne prijanjaju za podlogu i mogu se uzgajati plutajući u mediju za kulturu. U suspenziji se mogu uzgajati, npr. hematopoetske matične stanice (3). Primarna kultura obično je heterogena populacija stanica odnosno sastavljena od različitih tipova stanica izoliranih iz izvornog tkiva. Daljnjim uzgojem i presađivanjem stanice u kulturi gube heterogenost, a gube i svoja diferencirana svojstva. Stanice u primarnoj kulturi još uvijek imaju diferencirana svojstva i upravo su zbog toga važan model za različita istraživanja (2).

1.1.1. USPOSTAVLJANJE PRIMARNE KULTURE STANICA

Osnovni koraci u uspostavi primarne kulture stanica su dobivanje uzorka, izolacija tkiva, disekcija ili razgradnja tkiva te kultivacija u posudicama za kulturu (4). Izolacija i pročišćavanje perifernih krvnih stanica lako se postiže diferencijalnim centrifugiranjem ili pozitivnim sortiranjem pomoću magnetskih zrnaca. Izolacija čiste populacije stanica iz primarnih tkiva otežana je i zahtijeva znanje kako razdvojiti stanične slojeve u suspenziju koja sadrži samo jedan dominantan tip stanica (5). Postoji nekoliko tehnika za obradu izoliranog tkiva potrebnog za primarnu kulturu, a to su mehanička razgradnja, enzimska razgradnja te primarna eksplantacija. Mehanička razgradnja pogodna je za meka tkiva poput slezene i mozga (6). Prilikom mehaničke razgradnje stanice mogu se prikupiti na nekoliko načina: sakupljanjem stanica koje su se izlile prilikom rezanja i struganja tkiva, pritiskanjem tkiva kroz niz sita čija se veličina mreže postupno smanjuje, potiskivanjem fragmenata tkiva kroz špricu i iglu ili pak uzastopnim pipetiranjem. Enzimskom razgradnjom može se prikupiti velik broj stanica, a najčešće se radi razgradnja kolagenazom te hladnim i toplim tripsinom. Za razgradnju kolagenazom najbolje je koristiti grubu ili sirovu kolagenazu. Njezina aktivnost može ovisiti o prisutnosti nespecifičnih proteaza. Najprikladnija je za uporabu kod tkiva koja su previše osjetljiva za obradu tripsinom. Obrada toplim tripsinom omogućuje razgradnju velike količine tkiva u kratkom vremenu osobito cjelovitih mišjih i pilećih embrija. Kada se tkivo izloži tripsinu na 37°C, disocirane stanice trebaju se skupljati svakih trideset minuta, a tripsin treba ukloniti centrifugiranjem i neutralizirati serumom iz medija. Ova metoda može uzrokovati oštećenja stanica, no to se može izbjeći obradom hladnim tripsinom. U ovoj se metodi tkivo izlaže tripsinu na 4°C tijekom 6 - 18 sati. Nakon toga, dovoljno je tkivo izložiti tripsinu na 37°C na 20 - 30 minuta za razgradnju (4). Metoda primarne eksplantacije prikladna je za razgradnju malih količina tkiva kao što su bioptati kože. Tkivo se u bazičnoj otopini soli reže i ispire taloženjem. Bazična otopina soli potom se uklanja, a komadi tkiva ravnomjerno rasporede na površini za rast. Nakon dodatka medija slijedi inkubacija 3 - 5 dana. Medij se mijenja u tjednim intervalima sve dok se ne opazi značajan broj stanica. Nakon toga se eksplantati prenose u novu posudu za kulturu. Nakon razgradnje, žive stanice odvajaju se od neživih prilikom prve promjene medija. Nežive stanice iz primarne kulture moguće je ukloniti centrifugiranjem. Mrtve stanice talože se na dnu epruvete (6).

Kako bi stanice proliferirale potrebni su im posuda za uzgoj stanica, definirani medij za rast te optimalni pH i temperatura (7). Većina normalnih stanica rastu *in vitro* kao monosloj i za proliferaciju trebaju supstrat za koji će prijanjati. Supstrati su obično izrađeni od

UVOD

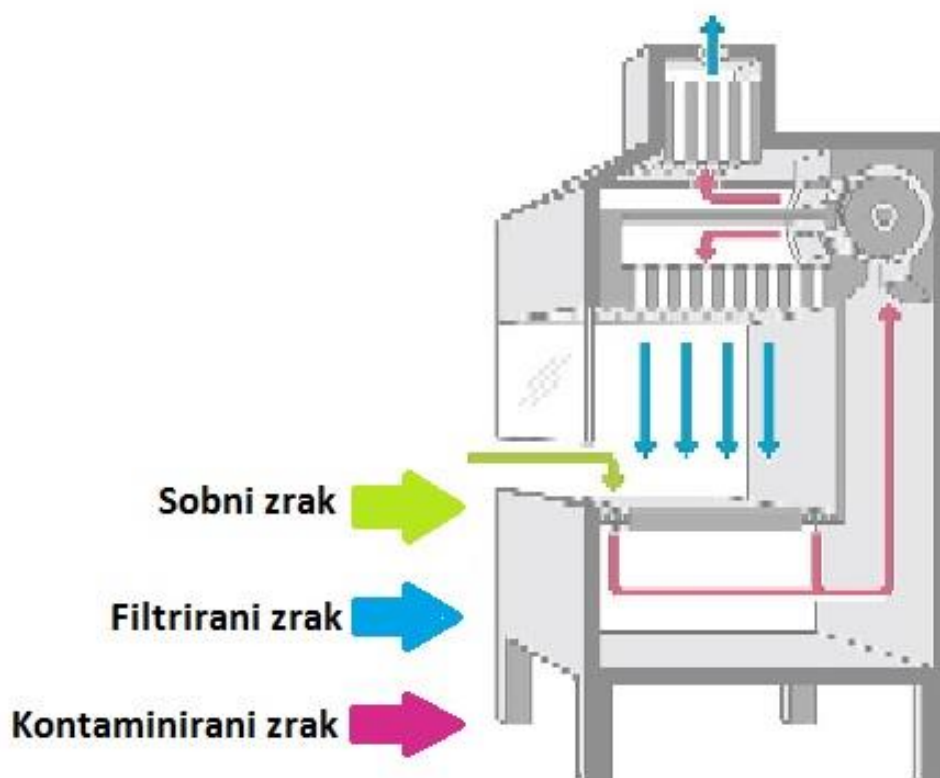
jednokratne plastike i stakla i mogu se tretirati polimerima, denaturiranim kolagenom ili želatinom. Nadalje, postoji velik izbor posudica za kultivaciju kao što su višestruke ploče, Petrijeve zdjelice i brojne druge. Većina staničnih linija dobro raste pri pH 7,4. Kao indikator koristi se fenol crveno koji je crven pri pH 7,4, narančast pri pH 7,0, žut pri pH 6,5 te ljubičast pri pH 7,8. Medij se mora puferirati kako bi se održao optimalni pH. Puferi koji se najčešće koriste su bikarbonatni pufer te HEPES pufer. Većina je kultiviranih stanica visoko tolerantna na osmotski tlak. Osmolalnost između 260 mOsm/kg i 320 mOsm/kg prihvatljiva je za većinu stanica. Optimalna temperatura za kultivaciju ovisi o temperaturi tijela životinje iz koje su stanice dobivene. Preporučena je temperatura za ljudske i toplokrvne životinjske stanične linije 37°C (4).

Postoje razne vrste medija za kulturu koji se dijele na prirodne i umjetne. Bez obzira na njihovu prirodu, svi moraju sadržavati osnovne sastojke koji omogućuju rast stanica. Prirodni mediji sastoje se uglavnom od prirodnih bioloških tekućina poput plazme, seruma, limfe ili amnijske tekućine. Umjetni mediji su: mediji koji sadrže serum, mediji bez seruma, kemijski definirani mediji te mediji bez proteina (7). Neke od esencijalnih aminokiselina za kultivirane stanice su cistein, glutamin, arginin i tirozin. Glutamin je potreban većini kultiviranih stanica kao izvor energije i ugljika. U mediju za kulturu glutamin je nestabilan i nakon nekog se vremena raspada te ga je potrebno dodavati u medij. Modifikacija u staničnoj kulturi je alanil-glutamin dipeptid koji je stabilan i koji se ne raspada stajanjem u mediju. Mediji mogu sadržavati vitamine topljive u vodi (vitamine grupe B, kolin, folna kiselina) te vitamine topljive u mastima (vitamini A, D, E i K). Soli koje su prisutne u medijima su natrijeve, kalijeve, magnezijeve, kalcijeve, kloridne, sulfatne, fosfatne te bikarbonatne soli. Glukoza u mediju služi kao izvor energije. Antibiotici se dodaju u medij kako bi spriječili kontaminaciju, ali njihova uporaba se ne preporučuje jer potiču razvoj rezistentnih mikroorganizama, mogu prikriti prisutnost mikroorganizama prisutnih u maloj količini i infekcije mikoplazmom. Serum sadrži faktore rasta, koji potiču staničnu proliferaciju, te adhezijske faktore koji potiču prihvaćanje stanica za uzgojnu površinu te djeluje kao inhibitor tripsina. Serum je izvor minerala, lipida te hormona, koji mogu biti vezani za protein. Neki su od najčešće korištenih seruma fetalni goveđi serum, goveđi serum, konjski serum te humani serum. Najčešće korišteni mediji koji sadrže serum su RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) i MEM (Eagle's Minimal Essential Medium) (4). RPMI 1640 medij, koji se koristi u ovom istraživanju, sadrži sve esencijalne i neesencijalne aminokiseline, vitamine (biotin, folna kiselina, riboflavin, vitamin

UVOD

B12, niacinamid i brojne druge), anorganske soli (kalcij nitrat, magnezij sulfat, kalij klorid, natrij klorid, natrij bikarbonat, natrij hidrogenfosfat) te druge komponente poput D-glukoze, reduciranog glutationa i fenol crvenila (8). Uporaba medija koji ne sadrže serum omogućuje lakše pročišćavanje, preciznu procjenu stanične funkcije, bolju kontrolu fizioloških reakcija te uzgoj specifičnog tipa stanica u odsutnosti seruma. Mediji koji ne sadrže serum sadrže hormone (somatotropin, inzulin), faktore rasta (heparin vezujuće faktore rasta), željezo, bakar te proteine poput goveđeg serumskog albumina (4). Kemijski definirani mediji sadrže izrazito čiste organske i anorganske sastojke, a mogu sadržavati i čiste proteinske dodatke poput faktora rasta. Mediji koji ne sadrže proteine potiču superiorni rast stanica i ekspresiju proteina, a primjer takvog medija je RPMI 1640 medij (7).

Pri radu sa stanicama moguća je pojava kontaminacije bakterijama, mikoplazmom, kvascima, plijesnima ili virusima. Kako bi se izbjegla moguća kontaminacija i svela na najmanju moguću pojavnost, primjenjuje se aseptična tehnika rada. Pravilna aseptična tehnika osigurava barijeru između okolišnih mikroorganizama i čiste, nekontaminirane kulture u posudici. Sterilni prostor postiže se uporabom kabineta za sterilan rad s vertikalnim protokom zraka i sterilizacijom radne površine pomoću ultraljubičastih zraka (UV) (Slika 1.). Prednost rada u kabinetu za sterilan rad je ta što je radni prostor zaštićen od prašine i kontaminacije kontinuiranim strujanjem filtriranog zraka preko radnih površina. Postoje dva tipa protoka zraka: horizontalni (puhanje zraka paralelno je s radnom površinom) i vertikalni (puhanje zraka okomito je na radnu površinu). Kabinet s horizontalnim protokom osigurava najbolju sterilnu zaštitu, ali neprikladan je za rad s materijalima koji su potencijalno opasni za ljudsko zdravlje ili toksični. Kod takvih materijala najbolju zaštitu pruža kabinet s vertikalnim protokom zraka klasificiran kao mikrobiološki sigurnosni kabinet 2. razreda (*engl. Microbiological Safety Cabinet, Class II, MSC*). Takvi kabineti filtriraju zrak pomoću takozvanog HEPA filtera (*engl. high-efficiency particulate air, HEPA*). Prije i nakon rada sa stanicama, radni prostor se sterilizira UV zračenjem. Prije, za vrijeme i nakon rada, radne površine i sav pribor steriliziraju se sa 70%-tnim alkoholom (4).



Slika 1. Kabinet za sterilan rad s vertikalnim protokom zraka. Preuzeto i prilagođeno (9).

1.2. LIMFOCITI

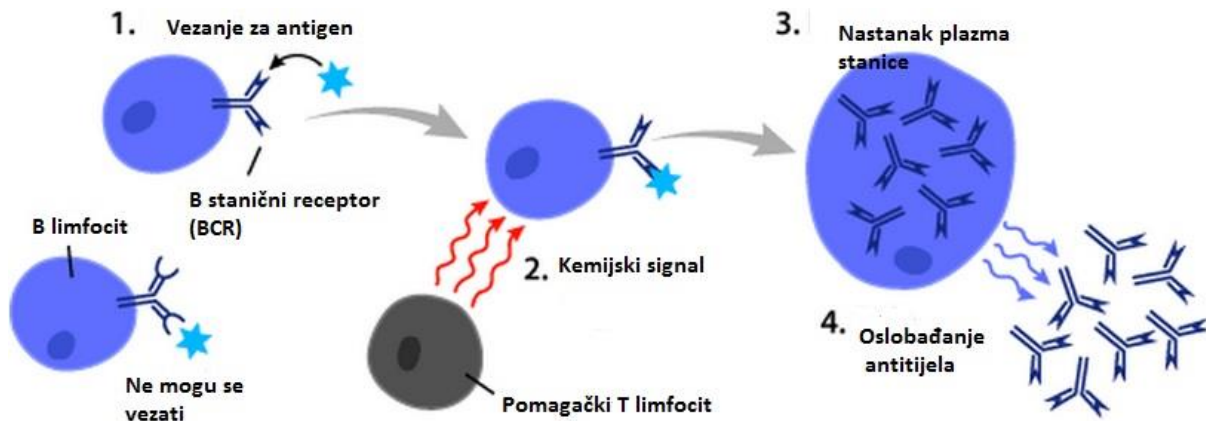
Limfociti su bijele krvne stanice koje su dio stečene imunosti i nastaju iz pluripotentne hematopoetske matične stanice. Prvo nastaju u žumančanoj vreći, zatim fetalnoj jetri te na kraju u koštanoj srži (10). Prema funkciji i bjelančevinama koje stvaraju limfocite možemo podijeliti u dvije glavne skupine: limfociti B (naziv dobili po ptičjem organu nazvanom Fabricijeva burza gdje sazrijevaju) i limfociti T. Limfociti prolaze složene stadije razvoja i poprimaju karakteristike zrelih stanica. Generativni su limfni organi mjesta gdje se odvijaju glavni stadiji razvoja limfocita, a to su koštana srž gdje sazrijevaju limfociti B te timus gdje sazrijevaju limfociti T. Novonastali limfociti nazivaju se naivnim limfocitima. Oni se nalaze u perifernim limfnim organima i cirkulaciji, a nazivaju se naivni jer se nikada nisu susreli s antigenom za koji su specifični. Naivni se limfociti nakon aktivacije povećavaju, klonalno proliferiraju, te diferenciraju u izvršne pomoćničke i citotoksične T stanične linije, odnosno plazma stanice (11). Uz naivne limfocite, funkcijski mirujuće stanice su i memorijski limfociti, dugovjeke stanice, koje omogućuju brzi imunski odgovor pri ponovnom susretu s istim antigenom (12).

1.2.1. LIMFOCITI B

Limfociti B posrednici su humoralne imunosti. Tijekom primarne diferencijacije limfocita B dolazi do preuredbe gena za antigenski receptor. Može se razlikovati nekoliko stadija sazrijevanja limfocita B: pro-B-stanica, pre-B-stanica, nezreli limfocit B, zreli limfocit B te memorijske i plazma stanice (13). Tijekom sazrijevanja u koštanoj srži na membrani razvijaju receptor koji je, u stvari, molekula imunoglobulina. Nakon sazrijevanja u koštanoj srži, limfociti B ulaze u periferno limfno tkivo gdje stupaju u reakciju sa stranim antigenima. B stanični receptor (*engl. B-cell receptor*, BCR) prepoznaje i veže određenu antigensku determinantu (14). Za potpunu aktivaciju, limfociti B zahtijevaju pomoć pomoćničkih T limfocita, nakon čega se limfocit B počinje dijeliti i stvarati klonove te diferencirati u plazma stanice ili memorijske stanice. Plazma stanice stvaraju velike količine protutijela (Slika 2.). Subpopulacije limfocita B folikularne su stanice B, B1 limfociti i stanice B marginalne zone. Folikularni su B limfociti većinom zreli B limfociti koji neprekidno recirkuliraju u krvi i migriraju iz jednog sekundarnog limfoidnog organa u drugi u potrazi za antigenima. B1

UVOD

limfociti nastaju iz hematopoetske matične stanice podrijetlom iz fetalne jetre i izražavaju antigenske receptore ograničene raznolikosti. Spontano izlučuju IgM protutijela, koja reagiraju s polisaharidima i lipidima mikroorganizama, a nazivaju se i prirodnim protutijelima jer se u jedinkama nalaze i bez poznate imunizacije. Stanice B marginalne zone nalaze se u blizini marginalnih sinusa slezene. Također imaju ograničenu raznolikost, odgovaraju na polisaharidne antigene te stvaraju prirodna protutijela. Izražavaju IgM i koreceptor CD21. U miševa postoje samo u slezeni, a u ljudi u slezeni i limfnim čvorovima (11).



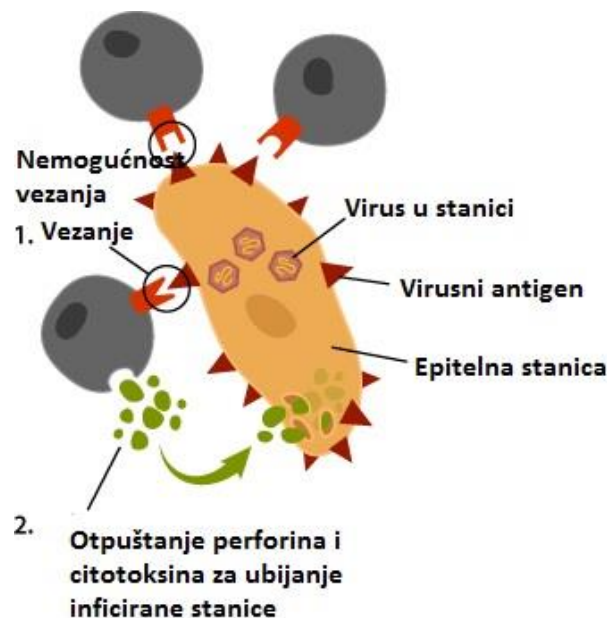
Slika 2 .Stvaranje protutijela. Preuzeto i prilagođeno (15).

1.2.2. LIMFOCITI T

Limfociti T posrednici su stanične imunosti. Prekursori T limfocita prelaze iz koštane srži u timus gdje završavaju proces sazrijevanja te prolaze kroz pozitivnu i negativnu selekciju. Prva su dva stadija u razvoju limfocita T dvostruko negativni timociti ($CD4^-CD8^-$) i dvostruko pozitivni timociti ($CD4^+CD8^+$) (13). Pozitivnom selekcijom naprije se uklanjaju stanice koje ne prepoznaju molekule glavnog sustava tkivne snošljivosti (*engl. Major Histocompatibility Complex, MHC*), a potom se negativnom selekcijom uklanjaju limfociti koji snažnim afinitetom vežu vlastite MHC molekule ili kompleks MHC molekule i vlastitih antigena (16). Nakon timusne selekcije preostaju jednostruko pozitivne stanice $CD4^+CD8^-$ ili $CD4^-CD8^+$ (13). Kako bi uspješno djelovali, limfociti T moraju surađivati s antigen predložnim stanicama (*engl. antigen presenting cells, APC*) kao što su dendritične stanice,

UVOD

makrofagi i limfociti B. Molekule MHC prezentiraju antigene različitim podvrstama limfocita T. One razvrstavaju antigene prema podrijetlu, odnosno jesu li porijeklom izvan stanice ili unutar stanice. MHC I molekule prezentiraju antigene citotoksičnim T limfocitima dok MHC II molekule prezentiraju antigene pomoćničkim T limfocitima. Podvrste pomoćničkih T limfocita (*engl. T-helper, Th*) su Th1, Th2, i Th17 limfociti te folikularne pomoćničke stanice T i regulatorne T stanice. Folikularne pomoćničke stanice T imaju važnu ulogu u razvoju plazma stanica, dok regulatorni limfociti T posreduju supresivne učinke te inhibiraju razvoj imunskog odgovora na vlastite antigene. Th1 stanice proizvode interferon γ . Th2 potiču imunoreakcije protiv helminata koje su posredovane IgE protutijelima, mastocitima i eozinofilima, a glavni citokini koje luče su interleukin 4, interleukin 5 i interleukin 13. Uloga je Th17 novačenje leukocita i započinjanje upale, a glavni citokini koje luče su interleukin 17 i 22. Citotoksični T limfociti ubijaju stanice zaražene mikroorganizmima (Slika 3.). Vežanjem T staničnog receptora (*engl. T cell receptor, TCR*) za strani antigen na površini stanice, citotoksični limfociti T počinju izlučivati granule s bjelančevinama koje uzrokuju oštećenje stanične membrane ciljne stanice što dovodi do njezine smrti. Glavne citotoksične bjelančevine, koje se nalaze u tim granulama, su perforin i granzimi. Citotoksični limfociti luče i interferon γ i potiču aktivaciju okolišnih imunskih stanica i širenje imunološke reakcije (11).



Slika 3. Djelovanje citotoksičnog limfocita T. Preuzeto i prilagođeno (17).

1.3. MIŠ SOJA C57BL/6N

Soj miševa C57BL/6N razvio je 1921. godine Clarence Little (18). Miš soja C57BL/6N ima crno krzno i koristi se u istraživanjima u području genetike, razvojne biologije, imunologije, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, pretilosti i brojnim drugim. Budući da pokazuje preferencije za alkohol i narkotike koristi se u genetskim studijama zlouporabe supstancija. Otporan je na zračenje te anafilaktički šok. Sklon je razvoju ateroskleroze uzrokovane prehranom te ovisnosti o morfinu. Osjetljiv je na gubitak sluha izazvan šumom. Gubitak sluha čest je u dobi od 12 do 18 mjeseci (19). Soj C57BL/6N nosi genetičku informaciju za divlji tip (engl. *wild type*, WT) genskog lokusa koji kodira enzim nikotinamid nukleotid transhidrogenazu. Također posjeduje mutaciju nazvanu degeneracija mrežnice 8 (engl. *retinal degeneration 8*, rd8) u genu homologa 1 (Crb1^{rd8}) (20).

CILJ

2. CILJ

Cilj je ovog istraživanja:

- Uspostava primarne kulture mononuklearnih stanica miša
- Odrediti uvjete potrebne za njihov uzgoj

3. MATERIJALI I METODE

Rad je napravljen u okviru projekta "Lokalizacija i funkcija CD45 signalnih molekula u T limfocitima knockout miševa s poremećenom sintezom lipidnih splavi" voditeljice doc. dr. sc. Stane Tokić. Za navedeni projekt Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta izdalo je suglasnost 6. lipnja 2018. (red.br. 2158-61-07-18-90).

3.1. MATERIJALI

3.1.1. POKUSNE ŽIVOTINJE

U istraživanju je korištena krv iz srca triju ženki soja C57BL/6N koje smo pulirali. Miševi su bili starosti deset mjeseci i prosječne mase 25,86 grama. Dobivena su ukupno dva mililitra krvi iz tri životinje.

3.1.2. KEMIČALIJE

Za pokus su uporabljeni:

- Anestetik sevofluran (BAXTER, Švicarska)
- Lymphoprep otopina (Fresenius Kabi, Norveška)
- NaCl 0,9% otopina (Braun, Njemačka)
- Roswell Park Memorial Institute 1640 definirani medij sa stabilnim glutaminom (Capricorn, Njemačka)
- Fetalni goveđi serum (FBS) (BIOSERA, Francuska)
- penstrep 100x(GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija)
- Tripansko plavilo 0.4%, 0.8 % NaCl, sterilno filtriran, Lonza (Basel, Švicarska)
- Fosfatni pufer PBS (engl. PhosphateBufferedSaline, smjesa NaCl-a, KCl-a, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 ; pH 7.4)

3.2. METODE

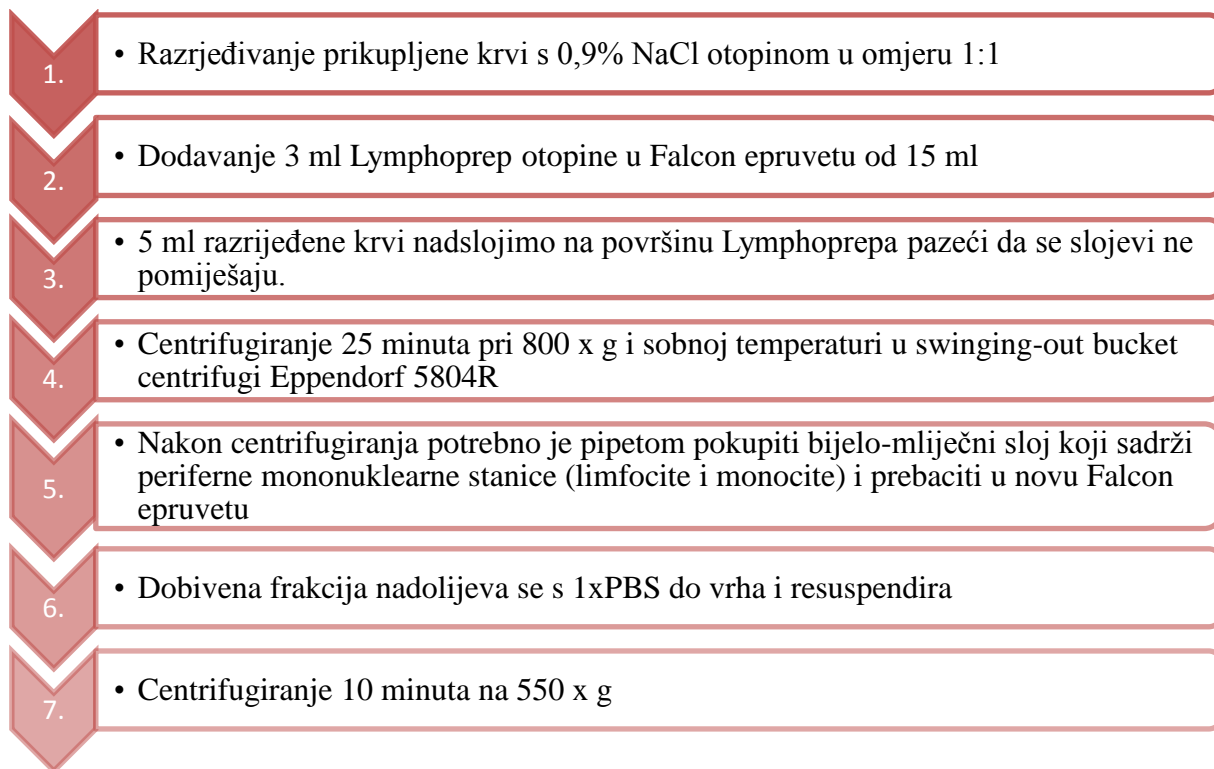
3.2.1. UZORKOVANJE KRVI IZ SRCA ŽIVOTINJE

Životinje su prvotno anestezirane sevofluranom u komorici za anesteziranje. Uzorak krvi dobiva se punkcijom srca (Slika 4.). Za uzorkovanje se rabe male šprice od 1 ml za izvlačenje te igle od 20G i 23G (Becton Dickinson). Krv se uzorkuje u epruvete s heparinom (Becton Dickinson). Prije vađenja krvi, šprice i igle provlače se kroz antikoagulans kako ne bi došlo do zgrušavanja. Krv se prenosi u epruvete s heparinom bez igle kako bi se izbjeglo raspadanje stanica. Krv u epruveti s heparinom potrebno je odmah promiješati kako ne bi došlo do zgrušavanja.



Slika 4 .Uzorkovanje krvi iz srca životinje.

3.2.2. IZOLACIJA UKUPNIH LIMFOCITA METODOM GRADIJENTA GUSTOĆE – LYMPHOPREP



Slika 5. Protokol za izolaciju ukupnih limfocita metodom gradijenta gustoće - Lymphoprep.

3.2.3. KULTIVACIJA STANICA *IN VITRO*

Izolacijom su dobiveni ukupni limfociti iz periferne krvi. Izolirane su stanice resuspendirane u 3 ml svježeg medija i prebačene u sterilnu Petrijevu posudicu promjera 6 cm i ostavljene u CO₂ inkubatoru (SHEL LAB, SAD) u atmosferi 5% CO₂/37°C na daljnje promatranje. Za održavanje primarne kulture primijenjen je RPMI 1640 medij uz dodatak glutamina, fenol crvenila, 10% FBSa i kombinaciju penicilina/streptomicina u koncentraciji 100U/0,1 mg koji sprječava razvoj mikroorganizama. Nisu dodani nikakvi dodatni faktori rasta ni tvari koje potiču diobu.

3.2.4. ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH STANICA U KULTURI

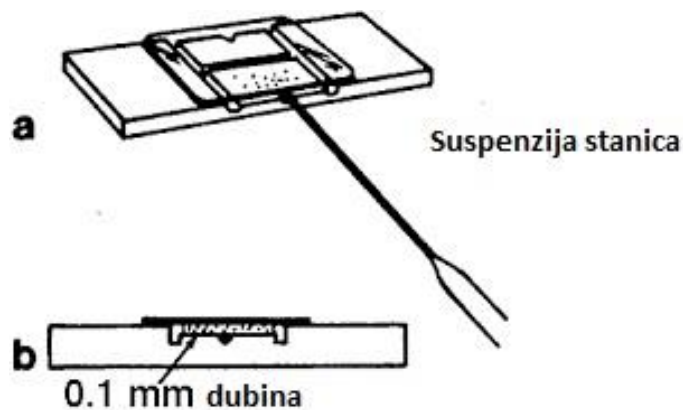
Broj živih stanica određuje se testom vijabilnosti bojom koja se zove tripansko plavilo u Bürker-Türk-ovoj komorici (Slika 6.). Mrtve stanice poprimaju plavu boju koja ulazi kroz oštećenu membranu. Broj stanica određen je brojanjem u hemocitometru (Slika 7.) pod invertnim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka) te izračunat prema formuli:

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

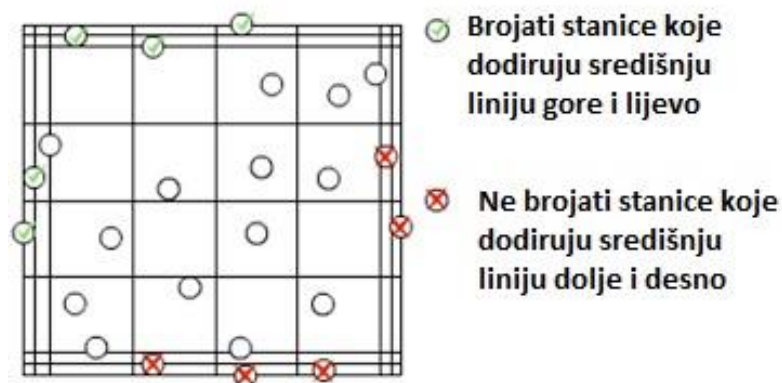
Gdje je: N - broj stanica

4 - broj polja u komorici

3 - faktor razrjeđenja



Slika 6 . Bürker-Türk-ova komorica. Preuzeto i prilagođeno (21).

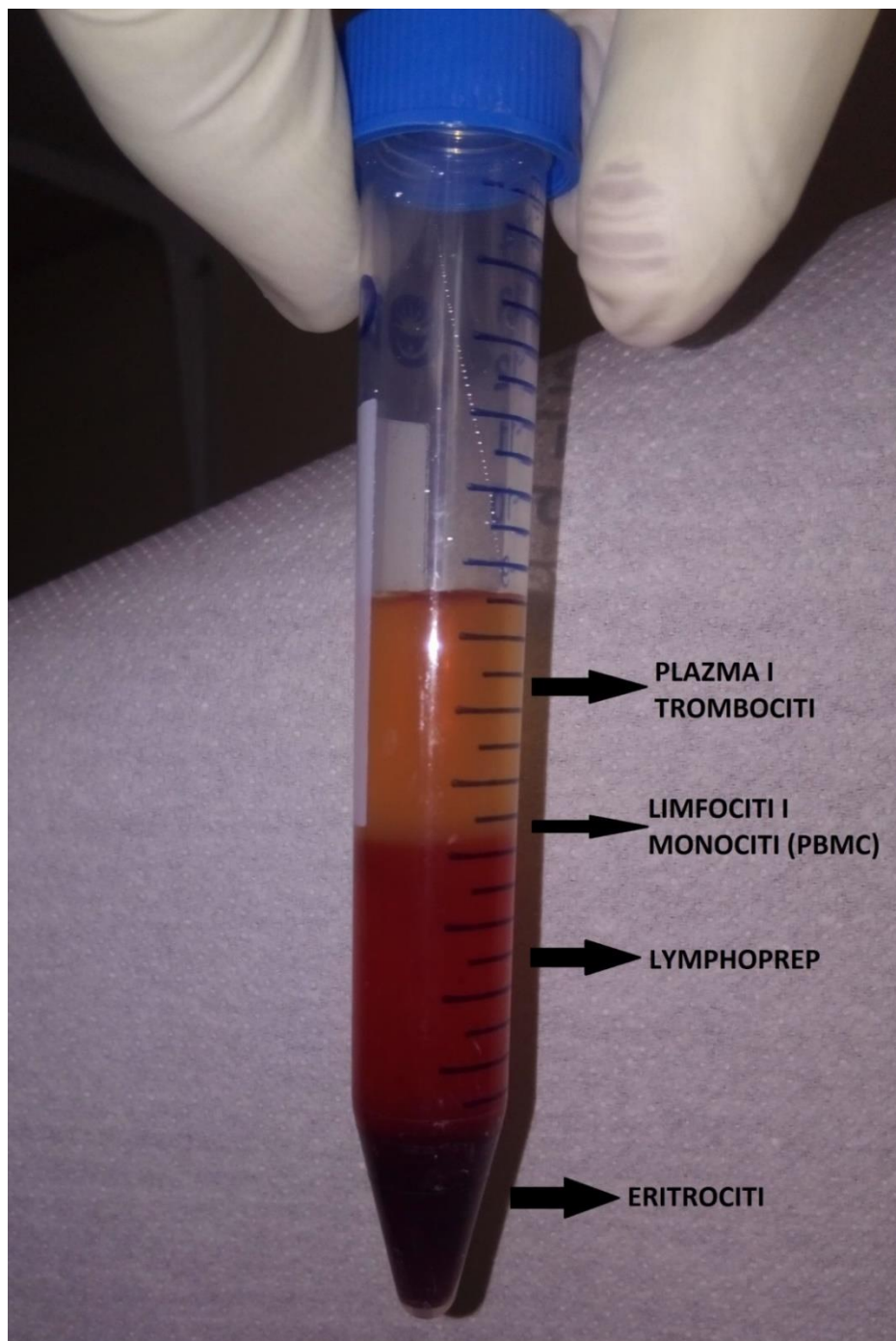


Slika 7 . Brojanje stanica pod mikroskopom. Preuzeto i prilagođeno (22).

REZULTATI

4. REZULTATI

Centrifugiranjem u gradijentu gustoće tijekom 25 minuta pri 800 x g i sobnoj temperaturi razvijaju se četiri sloja: sloj plazme i trombocita na vrhu, bijelo-mliječni sloj koji sadrži mononuklearne stanice periferne krvi (*engl. peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) (limfociti i monociti), sloj Lymphoprep otopine te eritrociti na dnu (Slika 8.).



Slika 8 . Prikaz slojeva dobivenih nakon centrifugiranja u gradijentu gustoće.

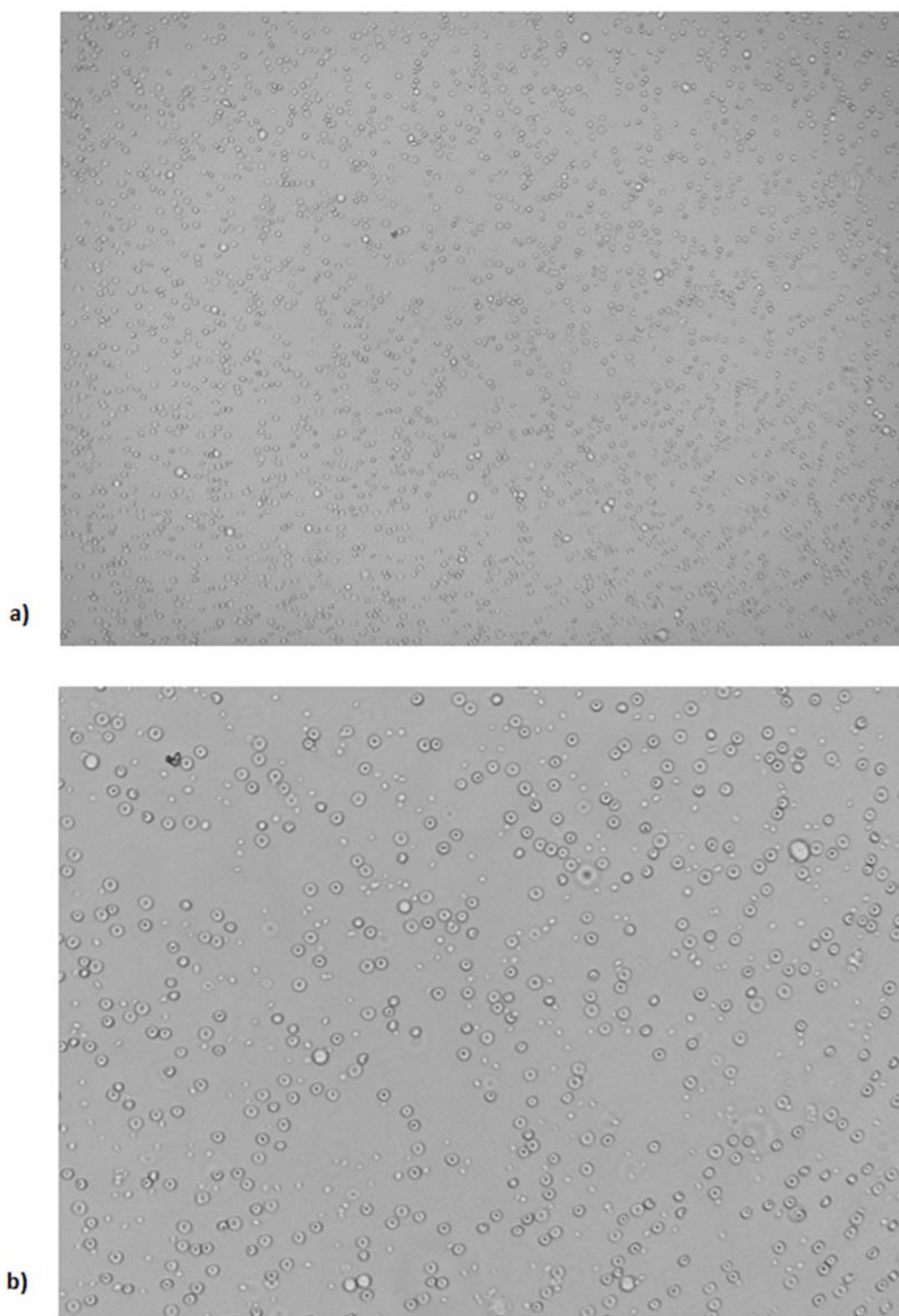
REZULTATI

Broj živih stanica u kulturi koje smo brojali u hemocitometru pod mikroskopom i izračunali prema formuli bio je $213,75 \times 10^4$ stanica / ml.

U kulturi su stanice preživjele osam dana s neznatnim razlikama u broju (podaci nisu prikazani), nakon čega su počele brzo umirati.

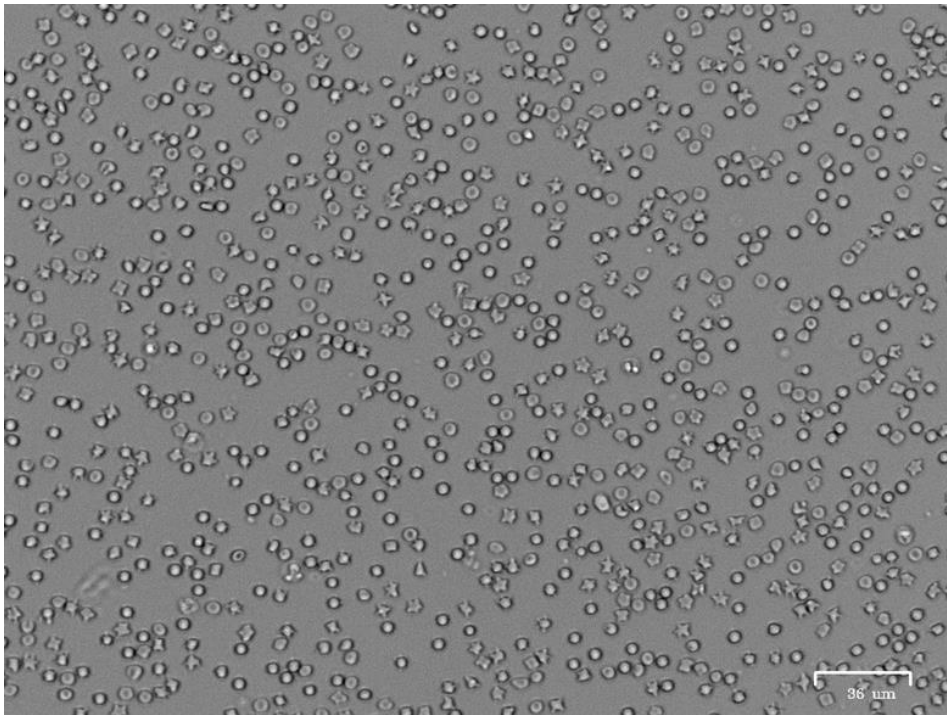
Primarna kultura stanica slikana je netom nakon izolacije na ZOE fluorescentnom staničnom imageru tvrtke Biorad (Slika 9 a). i 9 b.) te peti i osmi dan nakon izolacije (Slika 10. i 11.).

REZULTATI

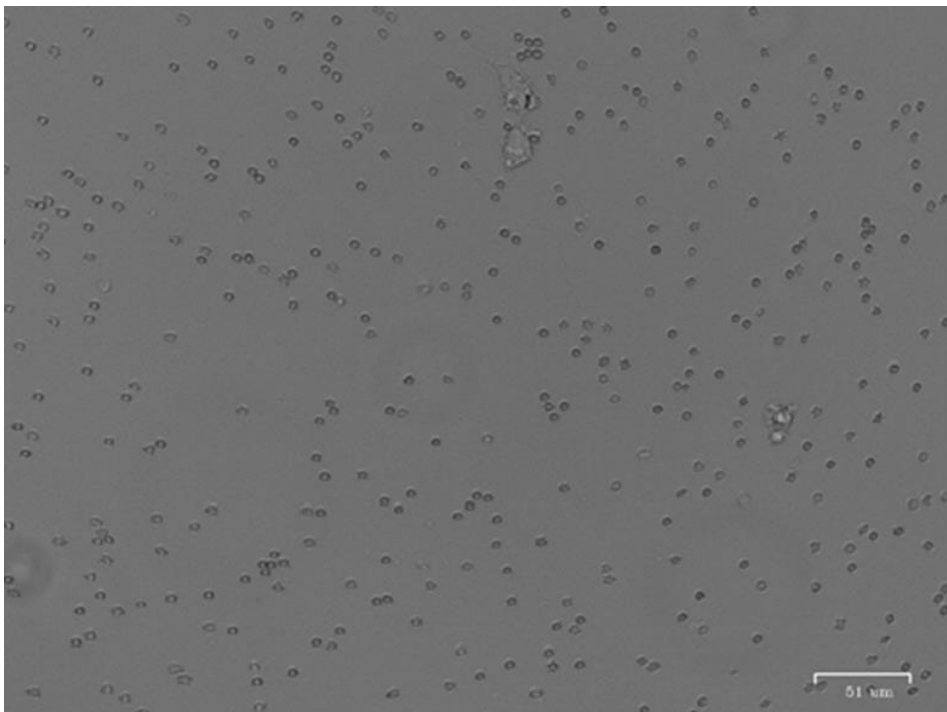


Slika 9. Primarna kultura perifernih mononukleara neposredno nakon izolacije u posudici za uzgoj. Stanice su snimljene 1. dan uzgoja ZOE fluorescentnim staničnim imagerom (Biorad) pod dva povećanja: a) 2x i b) 40x.

REZULTATI



Slika 10. Primarna kultura perifernih mononukleara. Stanice su snimljene 5.dan uzgoja ZOE fluorescentnim staničnim imagerom (Biorad) pod povećanjem 2,8x.



Slika 11. Primarna kultura perifernih mononukleara. Stanice su snimljene 8. dan uzgoja ZOE fluorescentnim staničnim imagerom (Biorad) pod povećanjem 2x.

5. RASPRAVA

Stanična kultura metoda je koja omogućuje proučavanje staničnih mehanizama *in vitro*. Desetljećima su stanične linije igrale ključnu ulogu u znanstvenim istraživanjima, međutim, mogućnost pogrešne identifikacije i kontaminacije staničnih linija te činjenica da se stanice mogu genotipski i fenotipski razlikovati od tkiva iz kojeg potiču, pobuđuje veći interes za stanicama primarne kulture (23).

Primarne stanične kulture pobliže oponašaju fiziološko stanje stanica *in vivo* pa su pogodne za proučavanje procesa stanične biologije i biokemije. Stanice primarne kulture mogu se izložiti zračenju, kemikalijama ili virusima kako bi postale kancerogene te kao takve mogu poslužiti za proučavanje mehanizama nastanka raka, za proučavanje citotoksičnosti novih lijekova te proizvodnju virusnih cjepiva. Primarna kultura stanica primjenjuje se i u genetičkom inženjerstvu za proizvodnju monoklonskih protutijela, inzulina ili pak hormona (2).

Uvjeti u primarnoj kulturi poput pH, temperature, osmolalnosti, razine otopljenih plinova, hormona i hranjivih tvari mogu se lako kontrolirati u *in vitro* sustavu (4). Nadalje, primjenom primarne kulture moguće je izbjeći brojne etičke primjedbe protiv testiranja na životinjama te omogućuje istraživanja na ljudskim tkivima koja nisu moguća *in vivo*. Rad sa stanicama primarne kulture isplativ je budući da pomaže smanjiti troškove za životinjske modele potrebne za *in vivo* studije (2).

Ipak, za rast stanica u primarnoj kulturi potrebno je više vremena i imaju ograničen životni vijek usprkos optimalnim uvjetima. Trošak izolacije je velik, a sama izolacija ponekad nije moguća. Karakteristike stanica primarne kulture mogu se mijenjati ukoliko se ne održavaju optimalni uvjeti (2). Održavanje sterilnih uvjeta najteži je dio primarne kulture. Za razliku od staničnih linija, stanice primarne kulture iznimno su osjetljive te zahtijevaju dodatne hranjive tvari koje se ne nalaze u običnom mediju. Kako bi primarne stanice što bolje rasle potrebna je optimizacija medija i koncentracije hranjivih tvari za svaku pojedinu vrstu primarnih stanica (23).

Mononuklearne stanice periferne krvi sastoje se uglavnom od monocita i limfocita. PBMC su primarne stanice i ne mogu se kultivirati više od jednog puta u normalnim uvjetima (24). Ove se stanice mogu ekstrahirati iz pune krvi koristeći hidrofilni polisaharid Ficoll, koji odvaja slojeve krvi, nakon čega slijedi centrifugiranje u gradijentu gustoće što će odvojiti krv

RASPRAVA

u gornji sloj plazme, sloj koji sadrži PBMC, dio frakcije polimorfonuklearnih stanica kao što su neutrofili i eozinofili te na kraju donji sloj eritrocita (25). Pročišćene PBMC koriste se *in vitro* za procjenu različitih funkcija limfocita poput proliferacije potaknute stimulacijom mitogenima i imunofenotipizacije površinskih markera kao i unutarstaničnih molekula (24). Nadalje, PBMC se mogu koristiti za procjenu stanično posredovane imunosti, za otkrivanje prethodne izloženosti različitim antigenima ili alergenima preko antigen specifične stimulacije i za praćenje odgovora na imunoterapiju (26).

Izolacija perifernih mononukleara iz krvi miša pruža mogućnost boljeg razumijevanja vremenskih ograničenja i hranidbenih uvjeta koji su potrebni za preživljenje ovih stanica u uvjetima *in vitro*. U ovom istraživanju osigurani su optimalni uvjeti za primarnu kulturu perifernih mononuklearnih stanica miša soja C57BL/6N. Ti uvjeti podrazumijevali su uzgoj stanica u CO₂ inkubatoru uz atmosferu od 5% CO₂ i temperaturu od 37°C. Medij koji se koristio bio je RPMI 1640 s dodatkom fetalnog goveđeg seruma FBS koji je stanicama osigurao potrebne faktore rasta. Zabilježeni rezultati navode na zaključak da navedeni uvjeti stanične kulture osiguravaju preživljenje perifernih mišjih leukocita u periodu od maksimalno osam dana. Poznavanje vremenskog ograničenja primarne kulture mišjih perifernih mononukleara, čini važan preduvjet za optimizaciju budućih eksperimenata.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

- Uspostava primarne kulture perifernih mononuklearnih stanica miša moguća je primjenom postupaka i tehnika rada koje osiguravaju aseptične uvjete za rast stanica u kulturi i uzgojem u strogo kontroliranim uvjetima: atmosfera od 5% CO₂ i temperatura od 37°C, upotreba RPMI 1640 definiranog medija koji sadrži 10% fetalni goveđi serum FBS i glutamin te penicilin/streptomycin kombinaciju antibiotika u koncentraciji 100 U/0,1 mg koji sprječava razvoj mikroorganizama.
- U takvim uvjetima, unatoč ograničenom životnom vijeku, stanice uspijevaju preživjeti i do osam dana.

7. SAŽETAK

Uvod: Primarna kultura stanica dobiva se izolacijom stanica izravno iz tkiva. Uzgojem u odgovarajućim uvjetima, primarne stanice rastu i proliferiraju, ali imaju ograničen životni vijek. Osnovni koraci u uspostavi primarne kulture stanica su dobivanje uzorka, izolacija tkiva, disekcija ili razgradnja tkiva te kultivacija u posudicama za kulturu.

Cilj: Uspostava primarne kulture mononuklearnih stanica miša te određivanje uvjeta potrebnih za njihov uzgoj.

Materijali i metode: U istraživanju je korištena krv iz srca triju ženki soja CB7BL/6N koje smo pulirali. Miševi su uzgojeni u vivariju Medicinskog fakulteta Osijek. Limfociti su iz krvi izolirani metodom gradijenta gustoće pomoću Lymphoprep otopine. Kultivirane stanice čuvaju se u CO₂ inkubatoru (Shel lab) uz atmosferu od 5% CO₂ i temperaturu od 37°C. Za održavanje primarne kulture mononuklearnih stanica koristi se RPMI 1640 definirani medij. Broj živih stanica u kulturi određen je u testu vijabilnosti s bojom tripansko plavilo u Bürker-Türk-ovoj komorici.

Rezultati: Uspostavljena je primarna kultura perifernih mononuklearnih stanica. Broj živih stanica u kulturi 0.dan bio je $213,75 \times 10^4$ stanica/ml.

Zaključak: Uspostava primarne kulture perifernih mononuklearnih stanica miša moguća je pridržavanjem pravila aseptične metode i uzgojem u strogo kontroliranim uvjetima u kojima stanice mogu preživjeti i do osam dana.

Ključne riječi: limfociti, stanična kultura, primarna kultura stanica, miš

8. SUMMARY

Introduction: Primary cell culture is obtained by isolation of cells directly from the tissue. By cultivation under appropriate conditions, primary cells grow and proliferate, but have a limited life span. The basic steps in establishing a primary culture cell include obtaining a sample, tissue isolation, dissection or tissue degradation and cultivation in culture vessels.

Objective: The aim of the study is to establish the primary culture of mononuclear mouse cells and to determine the conditions necessary for their growth.

Materials and methods: The blood from three female CB7BL/6N strains was used in the study. The mice were raised at the vivarium of Faculty of Medicine in Osijek. Lymphocytes were isolated from the blood by the density gradient method using a Lymphoprep solution. Cultivated cells are stored in a CO₂ incubator (Shel lab) under a 5% CO₂ atmosphere and a temperature of 37 ° C. An RPMI 1640 defined medium was used to maintain the primary culture of mononuclear cells. The number of viable cells was determined in a viability test with Trypan blue color in the Bürker-Türk chamber.

Results: Primary culture of peripheral mononuclear cells was established. The number of viable cells in culture on the first day was $213,75 \times 10^4$ cells/ ml.

Conclusion: The establishment of primary culture of peripheral mononuclear cells of a mouse is possible by adhering to the rules of aseptic technique and cultivation under strictly controlled conditions in which cells can survive up to eight days.

Key words: lymphocytes, cell culture, primary cell culture, mouse

9. LITERATURA

1. Hudu SD, Alshrari AS, Syahida A, Sekawi Z. Cell Culture, Technology: Enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(3):DE01-5.
2. Sigma-Aldrich. Primary cell culture. Dostupno na adresi: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/primary-cell-culture.html> Datum pristupa: 23.7.2018.
3. GIBCO. *CellCultureBasics*. Nashville: Vanderbilt University; 2016.
4. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 6th edition. Canada: Wiley-Blackwell;2010.
5. ATCC. *PrimaryCellCultureGuide*. Manassas:UniversityBlvd; 2012.
6. Biology discussion. Primary cell culture: 3 techniques(with diagram). Dostupno na adresi:<http://www.biologydiscussion.com/cell/primary-cell-culture/primary-cell-culture-3-techniques-with-diagram/10527> Datum pristupa: 24.7.2018.
7. Arora M. Cell Culture Media- A review. *MATER METHODS.* 2013;3:175.
8. Termofisher scientific. 61870 - RPMI 1640, GlutaMAX(TM). Dostupno na: <http://www.thermofisher.com/hr/en/home/technical-resources/media-formulation.122.html> Datum pristupa: 17.9.2018.
9. Web 1: <https://www.pinterest.com/pin/580190364466147471/> Datum pristupa: 17.9.2018.
10. Schuurman, Henk-Jan & Quesniaux, VFJ. Development and maturation of T and B cells. 1999; 23-40.
11. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Stanična i molekularna imunologija*. 8.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
12. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjčić D. *Imunologija*. 7. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
13. Marti, Luciana & Strachman Bacal, Nydia & Camerão, Laiz & Correia, Rodolfo & Agostini, Fernanda. Lymphoid Hematopoiesis and Lymphocytes Differentiation and Maturation. 2017; 1-31. DOI: 10.5772/intechopen.69058
14. Yam-Puc JC, Zhang L, Zhang Y and Toellner KM. Role of B-cell receptors for B-cell development and antigen-induced differentiation [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research* 2018, 7(F1000 Faculty Rev):429.

LITERATURA

15. Web 2: Pediaa. Difference between T cells and B cells. Dostupno na: <http://pediaa.com/difference-between-t-cells-and-b-cells/> Datum pristupa: 17.9.2018.
16. Labar B, i sur. Hematologija. Zagreb: Školska knjiga; 2017.
17. Web 3: Ask a biologist. T cells. Dostupno na: <https://askabiologist.asu.edu/t-cell> Datum pristupa: 17.9.2018.
18. Fontaine DA, Davis DB. Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium. *Diabetes* 2016; 65(1): 25-33.
19. Horizon. C57BL/6 Inbred Mouse. Dostupno na adresi: <https://www.horizondiscovery.com/c57bl-6-inbred-mouse-tgmcw> Datum pristupa: 24.7.2018.
20. Sacca R, Elder B, Wasson K. The Role of the C57BL/6N Mouse in the Creation of Future Genetically Engineered Models. Charles River. 2013.
21. Web 4: http://neuron.mefst.hr/docs/katedre/imunologija/2016-17/Englezi/Practical1_Leukocytes.pdf Datum pristupa: 17.9.2018.
22. Web 5: <https://www.ltu.edu/blogs/biomedstudents/wp-content/uploads/2013/03/Cell-Splitting.pdf> Datum pristupa: 17.9.2018.
23. Welser-Alves J. The advantages and difficulties of working with primary cells. *Ascb.* 2015. Dostupno na adresi: <https://www.ascb.org/newsletter/2015-november-newsletter/advantages-difficulties-working-primary-cells/> Datum pristupa: 26.7.2018.
24. Panda, S. K., Ravindran, B. In vitro Culture of Human PBMCs. *Bio-protocol* 2013; 3(3): e322. DOI: 10.21769/BioProtoc.322.
25. Pourahmad J, Salimi A. Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iran J Pharm Res.* 2015; 14 (4): 679-980.
26. Raulf-Heimsoth M. T cell - primary culture from peripheral blood. *Methods Mol Med.* 2008;138:17-30. doi: 10.1007/978-1-59745-366-0_2.

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i prezime: Iva Skaramuca

Datum rođenja: 24. listopada 1996.

Adresa: Pavla Šubića 10, Vinkovci

e-pošta: iva.skaramuca5@gmail.com

Obrazovanje:

2011. – 2015. Jezična gimnazija u Srednjoj školi Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2015. – 2018. Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku