

Utvrđivanje diferencijskog potencijala taurina na mišjim mioblastima

Vukić, Marko

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:638740>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijediplomski studij Biotehnologija**

**Marko Vukić
0058220016**

**UTVRĐIVANJE DIFERENCIJSKOG POTENCIJALA
TAURINA NA MIŠJIM MIOBLASTIMA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Tehnologija vitamina i hormona

Mentor: prof. dr. sc. Igor Slivac

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Utvrđivanje diferencijskog potencijala taurina na mišjim mioblastima

Marko Vukić, 0058220016

Sažetak:

Taurin je neproteinska aminokiselina široko rasprostranjena u živom svijetu koja ima važnu ulogu u normalnoj funkciji organizma, a povezuje se s rastom i diferencijacijom mišića. Cilj ovog rada je utvrditi diferencijski potencijal i utjecaj na rast koji taurin ima na staničnu kulturu mišjih mioblasta C2C12e. Stanice su tretirane 0,75 mM i 7,5 mM koncentracijom taurina tijekom 264 sata. Broj stanica određivan je metodom bojanja tripan-plavo, dok je diferencijacija stanica praćena hematoksilin-eozin bojanjem, pri čemu su dobiveni podaci obrađeni u programu *ImageJ*. Stanice pri 0,75 mM pokazale su trend rasta u prvih 168 sati uzgoja nakon čega im se broj smanjiva pri čemu konačni prinos stanica iznosi $63,06 \times 10^4$ stanica. Prinos u uvjetima 7,5 mM taurina iznosi $134,43 \times 10^4$ stanica. Morfološka analiza stanica pokazala je porast diferencijacijskog stupnja tijekom vremena i s povećanom koncentracijom taurina. Nakon 120 sati uzgoja u mediju za diferencijaciju 37,24 % stanica je diferenciralo u uvjetima 0,75 mM taurina dok nakon 264 sata njih 83,03 %. 7,5 mM koncentracija pokaziva postotak od 41,84 % nakon 120 sati, dok 90,91 % nakon 264 sata. Zbog otežanog očitavanja rezultata uslijed prerasle površine stanicama i odstupanja u odnosu na određene literaturne podatke potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se dobili jednoznačni rezultati za utjecaj taurina na rast i diferencijaciju C2C12 stanica.

Ključne riječi: C2C12 stanice, diferencijacija mioblasta, taurin

Rad sadrži: 29 stranica, 8 slika, 1 tablica, 31 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Igor Slivac

Datum obrane: 8.9.2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Technology and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Determination of the differentiation potential of taurine on mouse myoblasts

Marko Vukić, 0058220016

Abstract:

Taurine is a widely present non-proteogenic amino acid found in most living organisms and plays an important role from early development. It is believed that taurine effects muscle cell growth and differentiation. The aim of this study is to determine the differentiation potential of taurine on mouse myoblasts C2C12 *in vitro*. The cells were treated with 0,75 mM and 7,5 mM taurine concentration for 264 hours. The number of cells was determined by the trypan-blue method, while cell differentiation by hematoxylin-eosin method, whereby the obtained data were processed in the *ImageJ* program. Cells at 0,75 mM taurine showed a growth trend in the first 168 hours of cultivation, after which their number decreases, with the final yield being $63,06 \times 10^4$ cells. The yield under 7,5 mM conditions of 7,5 mM taurine is $134,43 \times 10^4$ cells. Morphological analysis of the cells showed an increase in the degree of differentiation over time and with increased taurine concentration. After 120 hours of cultivation in the differentiation medium 37,24 % of cells differentiated in conditions of 0,75 mM taurine, while after 264 hours 83,03 % of them differentiated. 7,5 mM concentration showed a percentage of 41,84 % after 120 hours, while 90,91 % after 264 hours. Due to the difficulty in reading the results because of the overgrown surface with cells and deviations from certain literature data, it is necessary to conduct additional research in order to obtain unequivocal results for the influence of taurine on the growth and differentiation of C2C12 cells.

Keywords: C2C12 cells, taurine, myoblasts differentiation

Thesis contains: 29 pages, 8 figures, 1 table, 31 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Igor Slivac, Ph.D. Full Professor

Thesis defended: 8.9.2023.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Mišićni sustav	2
2.2. Kultura životinjskih stanica	3
2.2.1. Definicija i povijest	3
2.2.2. Podjela životinjskih kultura.....	3
2.2.3. Uvjeti uzgoja	4
2.2.4. Postupci vizualizacije stanica bojanjem	5
2.2.5. Primjena stanica	7
2.3. Mioblasti.....	7
2.3.1. C2C12 stanice	8
2.3.2. Diferencijacija C2C12 stanica i regulacija procesa.....	9
2.4. Taurin.....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	13
3.1. Materijali	13
3.1.1. Kemikalije	13
3.1.2. Otopine	13
3.1.3. Uređaji i oprema.....	14
3.1.4. Stanična linija C2C12.....	14
3.2. Metode rada	15
3.2.1. Uzgoj C2C12 stanica i tretman taurinom	15
3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo	16
3.2.3. Bojanje stanica metodom hematoksilin-eozin.....	17
3.2.4. Obrada rezultata	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. Učinak taurina na rast C2C12 stanica.....	19
4.2. Utvrđivanje stupnja diferencijacije te morfoloških promjena uslijed tretmana C2C12 stanica taurinom.....	20
5. ZAKLJUČCI	25
6. POPIS LITERATURE	26

1. UVOD

Kultura stanica podrazumijeva izuzimanje stanica, tkiva ili organa iz organizma i njihov uzgoj u kontroliranom umjetnom okruženju. Uzgoj je omogućen upotrebom odgovarajućeg medija koji sadrži dovoljno hranjivih tvari za rast te osiguravanjem povoljnih fizikalno-kemijskih uvjeta. Početci primjene mogu se pronaći u 20. stoljeću kada je kultura stanica uvedena za proučavanje rasta i razvoja tkiva, biologije virusa, razvoja cjepiva i proizvodnje biofarmaceutika. U kliničkom kontekstu stanična kultura predstavlja model za istraživanje osnovne stanične biologije, mehanizama bolesti, proizvodnju cjepiva, monoklonskih protutijela, cjepiva i stanica za transplataciju.

U ovom radu korištena stanična linija su C2C12 mioblasti, uspostavljeni iz bedrenog mišića ženke miša nakon ozljede prignječenja. Stanice imaju mogućnost *in vitro* diferencijacije u uvjetima smanjene koncentracije faktora rasta. Očituje se kao izduživanje i stanjivanje stanica pri čemu stanice fuzioniraju u višejezgrene oblike koji se nazivaju miotube. Kao takve stanice su model za istraživanja diferencijacije i fiziologije mišićnih stanica, lijekova i testiranje toksičnosti, biomedicinskog i tkivnog inženjerstva, bolesti kao što je mišićna distrofija i dr.

Taurin je β -sulfonska aminokiselina prisutna u organizmu od začeca. Najviša koncentracija taurina zabilježena je u mišićima, srcu, mrežnici oka i mozgu gdje igra važnu ulogu u neurotransmisiji. Nedostatak taurina može rezultirati medicinskim problemima kao što su bolesti srca i jetre. Pretpostavlja se antipsihotična aktivnost taurina kao i stabilizacija raspoloženja. Utjecaj taurina na stanice je predmet raznih istraživanja, međutim, cilj ovog istraživanja je proširiti znanje o utjecaju taurina na rast i diferencijaciju C2C12 stanica. Naš odabir testnih koncentracija taurina oslanja se na literaturne podatke prema kojima mišja plazma sadrži 740 do 770 μM (Froger i sur., 2014).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Mišićni sustav

Mišić se definira kao tkivo koje se sastoji od specijaliziranih stanica sposobno kontrahirati se s ciljem postizanja pokreta. Ljudsko tijelo se sastoji od preko 600 mišića, a zajedno s kostima pokreću ljudsko tijelo i čine sustav organa za kretanje. Rad mišića kontroliran je središnjim živčanim sustavom. Skup svih mišića čini 40 % tjelesne mase čovjeka, dok je mišićna masa muškarca u prosjeku 15 % veća nego kod žena.

Glavna svojstva mišićnog tkiva su podražljivost, kontraktilnost, rastezljivost i elastičnost. Podražljivost podrazumijeva odgovor na stimulanse, dok kontraktilnost sposobnost kontrakcije. Rastezljivošću je mišić u mogućnosti postići istežanja bez opasnosti od kidanja te nakon prestanka napora poprima svoj početni izgled. Kao takav, mišićni sustav obavlja jako važne funkcije u ljudskom organizmu što podrazumijeva proizvodnju sile, pokret, podršku položaju tijela, stabilnost zglobova, održavanje normalne tjelesne temperature, davanje forme tijelu itd.

Bez obzira na morfologiju i tip mišićno tkivo se sastoji od specijaliziranih stanica nazvanih mišićne stanice ili miociti, ali poznatih i kao mišićna vlakna zbog velike duljine i izgleda. Miociti su karakterizirani aktinom i miozinom koji nose zajednički naziv proteinski filamenti. Klizajući jedan pored drugog proizvode kontrakcije koje pokreću dijelove tijela, uključujući unutarnje organe. Navedeni proteini nisu specifični za mišićne stanice nego se mogu pronaći i u drugim vrstama stanica. Međutim, miocite karakterizira obilje aktina i miozina unutar citoplazme do te mjere da zauzimaju veći dio unutrašnjosti. Filamenti su orijentirani duž jedne osi čime se omogućuje kretanje na linearan način (Cooper, 2013)

Mišići se kod većine kralježnjaka dijele na poprečno-prugaste (skeletalni), glatke i srčani mišić. Svaka vrsta sadrži jedinstvene komponente, funkcije i patologiju. Skeletni mišići su u potpunosti vezani na kostur i čine većinu mišićnog tkiva organizma. Višejezrena vlakna su pod kontrolom somatskog živčanog sustava i izazivaju kretanje. Ritmička kontrakcija srčanog mišića regulirana je sinoatrijskim čvorom, srčanim stimulatorom. Bez obzira što je specijaliziran, poprečno-prugasti mišić nije pod kontrolom volje. Glatki mišić oblaže utrobu, krvne žile i dermis i njime upravlja autonomni živčani sustav zbog čega, također, ne podliježe kontroli volje (Alexander McNeill i sur., 2023)

2.2. Kultura životinjskih stanica

2.2.1. Definicija i povijest

Kultura stanica odnosi se na *in vitro* održavanje i razmnožavanje eukariotskih stanica tkiva ili organa u odgovarajućem umjetnom okruženju. Pod definiranim uvjetima je moguće mnoge životinjske stanice potaknuti na rast izvan ishodišnog tkiva ili organa uz dodatak medija koji sadrži hranjive tvari i faktore rasta. Stanice se mogu ukloniti direktno iz tkiva ili razdvojiti enzimski ili mehaničkim putem prije kultivacije. Također, mogu potjecati iz stanične linije ili staničnog soja koji je već prije uspostavljen (Verma i sur., 2020). Rast je karakteriziran diobom stanica (mitoza) ili drugim procesima, poput diferencijacije, tijekom kojih stanice formiraju oblike sposobne funkcionirati analogno tkivima ili organima u organizmu (Lynn, 2009).

Sredinom 1900-ih kultura životinjskih stanica je postala uobičajena laboratorijska tehnika, ali koncept održavanja živih staničnih linija izvan izvornog tkiva je otkriven u 19. stoljeću. Kultura životinjskih stanica danas predstavlja važan alat u području znanosti o životu, ekonomije te komercijalizacije (Verma i sur., 2020). Kulture stanica se koriste za *in vitro* testiranja, za proizvodnju bioloških spojeva kao što su rekombinantni proteini ili antitijela. Razvoj tehnologije uzgoja eukariotskih stanica pod definiranim laboratorijskim uvjetima u kasnim 1940-ima omogućio je velike napretke u karakterizaciji virusnih patogena kao i razvoja virusnih cjepiva npr. cjepiva protiv dječje paralize (Sykes, 2023).

2.2.2. Podjela životinjskih kultura

Precijepljivanje je proces subkulturiranja stanica kako bi se proizveo velik broj stanica iz postojećih. Subkulturiranjem se dobiva homogenija stanična kultura te se izbjegava starenje izazvano visokom gustoćom stanica. Cijepanje stanica uključuje prijenos manjeg broja stanica u novu posudu gdje se mogu razmnožavati, karakterizirati i pohraniti. Prilijepljene stanične kulture treba odvojiti od površine posude. Proteini koji se izlučuju stvaraju čvrstu vezu između stanica i površine. Za razbijanje takvih proteinskih mostova koristi se mješavina tripsina i EDTA. Tripsin razgrađuje proteine te djeluje kao proteolitički enzim koji hidrolizira peptidne veze proteina, dok EDTA izdvaja metalne ione koji mogu inhibirati i ometati

aktivnost tripsina (Verma i sur., 2020).

Ovisno o potrebi stanica za čvrstom površinom za rast one se dijele na adherentne i suspenzijske. Stanice ovisne o usidrenju/adherentne zahtijevaju stabilnu netoksičnu i biološki inertnu površinu za pričvršćivanje i rast. Stanice neovisne o usidrenju/suspenzije ne zahtijevaju čvrstu površinu. Izvor takvih stanica je odlučujući faktor načina uzgoja npr. krvne stanice su suspendirane u plazmi te je lako uspostaviti njihovu suspenzijsku kulturu (Gaurina Srček i sur., 2020).

Primarnu kulturu predstavljaju stanice izolirane iz tkiva i organa te proliferirane pod odgovarajućim uvjetima mehaničkom ili kemijskom dezintegracijom ili enzimskom digestijom. Takve stanice se potiču na rast u prikladnim staklenim ili plastičnim posudama sa složenim medijem. Kulture su obično heterogene, ali i dalje reprezentativne za tipove stanica u tkivima iz kojih potječu. Veliki nedostatak primarnih kultura su ograničeni životni vijek te moguće kontaminacije. U ovoj fazi, stanice se obično moraju subkulturirati (tj. presaditi) u nove posude sa svježim medijem za rast kako bi se osigurao dovoljan prostor za daljnji rast. Nakon prvog subkloniranja, primarna kultura postaje stanična linija ili subklon (sekundarna linija). Stanične linije izvedene iz primarne kulture imaju ograničen, ali dugotrajan životni vijek. Procesima njihova presađivanja dominiraju stanice s najvećim kapacitetom rasta, što rezultira određenim stupnjem genotipske i fenotipske uniformnosti u populaciji. Stanice u ovom sustavu imaju tendenciju generiranja aberantnih stanica i diferencijacije tijekom određenog vremenskog razdoblja. Kada je subpopulacija stanične linije odabrana iz kulture kloniranjem ili nekom drugom genetičkom metodom postaje stanični soj. Stanični soj često dobiva dodatne genetičke promjene prije uspostavljanja roditeljske linije. Normalne stanice se obično dijele ograničen broj puta prije gubitka sposobnosti proliferacije, što je genetski određen slučaj zvan starenje, stoga su poznate kao konačne stanične linije. Međutim, neke stanične linije postaju besmrtno kroz proces transformacije, koji može biti spontan ili kemijski ili virusno izazvan. Kada se konačna stanična linija podvrgne transformaciji te stekne sposobnost diobe na neodređeno vrijeme, postaje kontinuirana stanična linija (Thermo fisher scientific, 2020, Verma i sur., 2020)

2.2.3. Uvjeti uzgoja

Uvjeti uzgoja variraju za svaki tip stanica, ali umjetno okruženje u kojem se stanice uzgajaju uvijek se sastoji od prikladne posude koja sadrži supstrat ili medij koji opskrbljuje esencijalnim hranjivim tvarima (aminokiseline, ugljikohidrati, vitamini, minerali), tvarima

rasta, hormonima i plinovima (O₂, CO₂) te regulira fizikalno-kemijski okoliš (pH, osmotski tlak, temperatura). Kako je prije spomenuto, većina stanica ovisna je o površini uzgoja, te u skladu s tim moraju se uzgajati pričvršćene na čvrsti ili polučvrsti supstrat (adherentna ili jednoslojna kultura), dok se druge mogu uzgajati plutajući u mediju (suspenzijska kultura) (Thermo fisher scientific, 2020)

Za *in vitro* rast i održavanje životinjskih stanica nužno je što vjernije oponašati *in vivo* uvjete. Važni okolišni faktori su mediji u kojem se stanice nalaze, supstrat u kojem rastu, temperatura, koncentracija kisika i ugljikovog dioksida, pH, osmolalnost. (Verma i sur., 2020). Medij omogućuje preživljavanje, funkcioniranje stanice i proliferaciju pri čemu kvaliteta i vrsta medija direktno utječu na uspješnost spomenutog. Prirodni mediji se sastoje isključivo od prirodnih bioloških tekućina. Korisni su i primjenjivi za širok raspon kultura životinjskih stanica. Glavni nedostatak je loša reproducibilnost zbog nepoznavanja točnog sastava. U prirodne medije ubrajaju se limfa, ekstrakti kokošnjeg embrija, jetre, amnijska tekućina itd. Umjetni ili sintetički mediji se pripremaju dodatkom hranjivih tvari (organskih i anorganskih), vitamina, soli, O₂ i CO₂ plinovite faze, proteina, ugljikohidrata i kofaktora. Sintetski mediji dijele se u četiri podskupine koje su: medij koji zadrži serum, medij koji ne sadrži serum, kemijski definirani i medij koji ne sadrži proteine. Fetalni goveđi serum (*engl. Fetal Bovine Serum, FBS*) je najkorišteniji serum koji se dodaje medijima za uzgoj životinjskih stanica. Serum osigurava nosače za labilne i u vodi netopljive hranjive tvari, hormone i faktore rasta te veže i neutralizira toksične dijelove. Prisutnost seruma ima svoje nedostatke i može doći do pogrešaka u tumačenju kod imunoloških istraživanja. Mediji bez seruma su općenito formulirani za uzgoj kulture jedne vrste stanica kao što je DMEM (*engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium*) za matične stanice koji uključuje definirane količine faktora rasta, lipoproteina i drugih proteina koje inače osigurava serum. Kemijski definirani mediji sadrže čiste anorganske i organske supstancije bez kontaminacije. S obzirom kako medij bez proteina potiče intenzivan rast stanica, ekspresiju proteina i olakšava daljnje pročišćavanje bilo kojeg produkta razvijeni su mediji koji ne sadrže proteine kao što je MEM (*engl. Minimum Essential Medium*) kojemu se proteinski dodatak dodaje samo kada je potrebno. (Barnes i sur., 1984).

2.2.4. Postupci vizualizacije stanica bojanjem

Potreba za bojanjem stanica i tkiva proizlazi iz nemogućnosti razlikovanja određenih strukturnih jedinica. Bojanje se temelji na različitim fizikalno-kemijskim svojstvima i

interakcijama boje, otapala i staničnih struktura. Zadržavanje boje u biološkom materijalu ovisi o afinitetu boje prema staničnim strukturama tj. afinitetu boje prema otapalu. Ovisno o selektivnosti boje prema dijelovima stanice moguće je postići različita obojenja različitih staničnih struktura. Većina boja su neutralne soli s kiselim ili bazičnim radikalima zbog čega se kao osnova bojanja često koriste svojstva kiselosti odnosno bazičnosti. Anioni kiselih boja imaju visok afinitet za bazične dijelove stanice (npr. citoplazma, proteini u kiselom okruženju), dok kationi bazičnih boja boje kisele dijelove (npr. jezgra, hrapavi ER, ribosomi). Struktura bojana bazičnom bojom naziva se bazofilnom, dok ona kiselom bojom acidofilnom. Vrsta interakcije koja omogućava bojanje je i metakromazija. To je metoda nakupljanja boje koja dobiva drugu nijansu u odnosu na monomerni oblik. Kod transmisijske elektronske mikroskopije preparati se boje atomima teških metala (osmij, tungsten, krom itd.) koji u odnosu na atome organskih spojeva raspršuju elektrone (Suvarna i sur., 2012).

Klasični primjer bojanja na osnovu kiselosti i bazičnosti je hematoksilin-eozin bojanje. Hematoksilin je neutralna boja, ali komponenta koja daje boju (kromofor) nalazi se u kationskom ili bazičnom središtu molekule što je izvor afiniteta prema kiselim strukturama. Boji uglavnom stanične jezgre jer sadrže nukleinske kiseline nijansama tamnoplave i ljubičaste boje. Za svoj aktivni oblik mora biti u oksidiranom stanju i vezan za metal. Eozin je crveno-ružičasta boja koja se priprema u alkoholu (95 %-tni etanol) zbog netopljivosti u vodi. Negativno je nabijen, dakle boji bazične strukture kao što je citoplazma. Metoda bojanja se najčešće koristi u histologiji i omogućuje lokalizaciju jezgre i izvanstaničnih proteina (Cooper i sur., 2013)

Postoje i mnogo složenije vrste bojanja kao što su trikromne, tetrakromne, pentakromne koje zahtijevaju uporabu tri, četiri, odnosno pet različitih boja. Prikadne su za razlučivanje određenih podjedinica sustava koji se standardnom metodom ne razlikuju od okolnog tkiva. Prednost takvih bojanja je razlikovanje vezivnog i mišićnog tkiva koja se u standardnoj hematoksilin-eozin metodi boje eozin ružičastom nijansom. Moguće je različito obojati i različite vrste vezivnih vlakana. Histokemijske metode osnivaju se na kemijskim reakcijama boje i sastojaka tkiva čime se detektira prisutnost konkretnih polisaharida, oligosaharida, lipida, različitih enzima. Podvrste takvog bojanja su imunohistokemijska i imunofluorescencijska bojanja koja koriste protutijela u kombinaciji sa drugim biljezima što mogu biti enzimi i fluorescentne molekule. Preparati bojani fluorescentnim bojama promatraju se na posebnom tzv. fluorescentnom mikroskopu kojemu je izvor svjetlosti ultraljubičasta lampa. Fluorescentna boja obasjana UV-svjetlom emitira svjetlost određene boje u vidljivom dijelu spektra (Dykstra, 1992).

2.2.5. Primjena stanica

Uklanjanjem tkiva ili stanica iz organizma moguće je odrediti utjecaj točno određenih spojeva na njih. Također, kulture stanica je moguće koristiti za istraživanje raznih patogena jer je to često jedini način uzgoja izvan domaćina, čime se olakšava njihovo proučavanje (Lynn, 2009). Mnogi biotehnološki proizvodi (npr. virusna cjepiva) ovisni su o masovnom uzgoju životinjskih staničnih linija. Mnogi jednostavniji proteini proizvode se pomoću rDNA u bakterijskim kulturama, međutim, složeniji proteini koji su glikozilirani moraju se proizvoditi tehnologijom životinjskih stanica. Tehnologija životinjskih stanica pronalazi primjenu u raznim područjima istraživanja kao što su: ispitivanje toksičnih učinaka novih lijekova, proizvodnja cjepiva i farmaceutskih lijekova, genska terapija, karakterizacija stanica raka, uloga raznih kemikalija, virusa i zračenja na stanice itd. Kultura stanica sisavaca danas predstavlja osnovu za proizvodnju biološki značajnih proizvoda kao što su hormoni, antitijela, interferoni, faktori zgrušavanja i cjepiva (Verma i sur., 2020).

2.3. Mioblasti

Bez obzira što se sastoji od visokodiferenciranih mišićnih vlakana s periferno smještenim postmitotskim jezgrama mišićno tkivo je sposobno regenerirati se. Mogućnost mišićne regeneracije proizlazi iz stanica smještenih između sarkoleme i bazalne membrane mišićnog vlakna. Takve stanice zbog svog perifernog položaja nazvane su satelitske stanice i odgovorne su za stvaranje novih mišićnih stanica, tj. mioblasta. Satelitske stanice su mitotski mirne stanice koje mogu biti aktivirane traumom, bolešću ili nekim promijenjenim stanjem. Nakon aktivacije dolazi do proliferacije kojom nastaju mioblasti (Bajek i sur., 2015).

Mioblasti su postmitotičke, mononuklearne stanice sposobne za fuziju i kontraktilnu sintezu proteina. Mioblasti su embrionalni prekursori miocita i diferenciraju u mišićne stanice procesom koji se naziva miogeneza. Tijekom miogeneze mioblasti fuzioniraju u višejezgrene miotube, koje kasnije postaju mišićna vlakna. Prema *in vitro* istraživanjima većina mioblasta će se mitotski dijeliti kada postoji dovoljna koncentracija faktora rasta. Nasuprot tome, nedovoljna količina faktora rasta dovodi do prestanka stanične diobe. To na kraju rezultira diferencijacijom mioblasta u miotube. Miotube su višejezgreni cilindrični oblici stanica koji nastaju spajanjem mioblasta i često se nazivaju sincicijalne stanice. Mioblasti se klasificiraju

kao mioblasti skeletnih mišića, mioblasti glatkih mišića i mioblasti srčanog mišića, ovisno o vrsti mišićne stanice u koju će se diferencirati. (Birbrair i sur., 2013, Rolak, 2011)

2.3.1. C2C12 stanice

C2C12 je subklon iz linije mioblasta koje su generirali Blau, Chiu i Webster (1983.) iz linije mioblasta C2 koju su izolirali Yaffe i Saxel (1977). C2 linija izvorno je izvedena iz satelitskih stanica bedrenog mišića C3H ženke miša stare 2 mjeseca, 70 sati nakon ozljede prignječenja, s ciljem proučavanja mišićnih distrofija *in vitro*. (Diokmetzidou i sur., 2016).

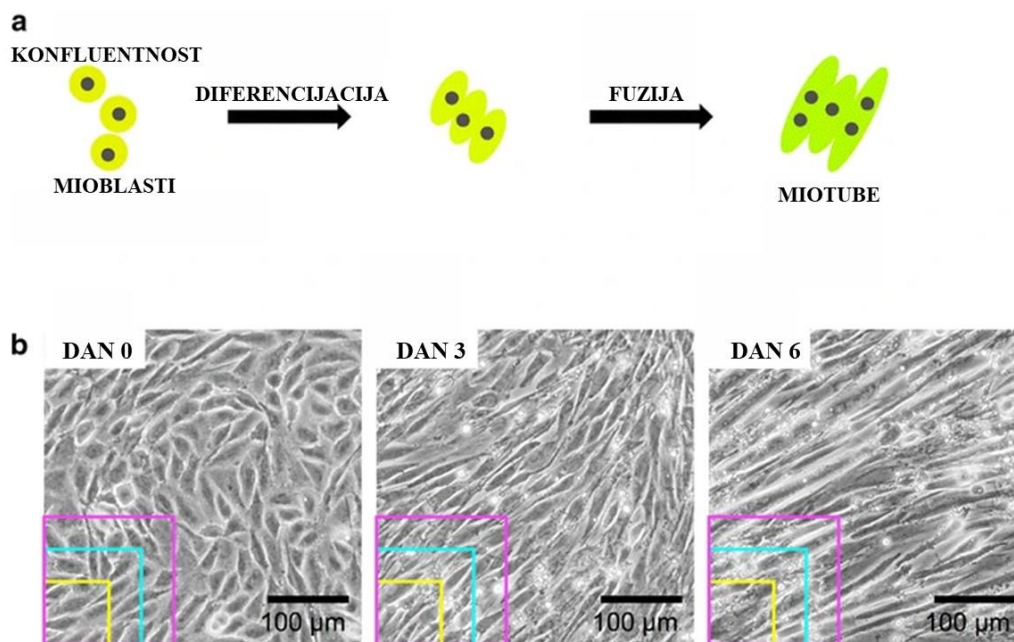
Mišićna distrofija je nasljedni poremećaj koji se očituje progresivnim trošenjem skeletnih mišića, te kao takva je zahtjevna za istraživanja u *in vivo* uvjetima zbog složene interakcije između tkiva. Rješenja problematike tražili su se u ljudskim ili životinjskim kulturama distrofičnih mišića. Tkivni eksplantati i monoslojne primarne stanične kulture sadrže heterogenu staničnu populaciju, pri čemu se sastav može razlikovati u normalnim i distrofičnim mišićnim kulturama. U takvim eksperimentima teško je razlikovati intrinzična svojstva miogenih stanica od učinaka drugih stanica. Takvi eksperimenti su, doista, davali proturječne rezultate. Stoga su uslijedili pokušaji dobivanja staničnih kultura čistih populacija miogenih stanica iz distrofičnih mišića. (Yaffe i Saxel, 1997). Od tada je subklon C2C12 naširoko korišten kao model stanične kulture na području skeletnih mišića. U uvjetima visokog sadržaja seruma lako proliferiraju, dok u uvjetima niskog sadržaja seruma diferenciraju i stapaju se u sincicij s više jezgara koji se naziva miotubom. Međutim, stanice ne oponašaju savršeno *in vivo* mišićna vlakna. Kontraktilni proteini prisutni u stanicama su obično neorganizirani i rijetko tvore poravnate sarkomere, a proučavani biološki putovi često ne predstavljaju zrele mišiće (Denes i sur., 2019). Stanice osiguravaju *in vitro* model za sljedeće skupine istraživanja: diferencijacija mišićnih stanica, fiziologija mišića, odabir lijekova i testiranje toksičnosti, biomedicinsko i tkivno inženjerstvo te studije kultiviranog mesa. Stanice je moguće potaknuti na diferencijaciju u zrele mišićne stanice što omogućuje istraživanje molekularnih i staničnih mehanizama bitnih za razvoj stanice. C2C12 stanice su bitne za proučavanje miogeneze, proces razvoja mišića, i faktora koji je reguliraju kao što su MyoD i miogenin. Kao model za istraživanja mišićne fiziologije moguće je potaknuti ponašanje stanica kakvo je u uvjetima bolesti i zatim istraživati potencijalna terapijska sredstva. C2C12 stanice je moguće koristiti kako bi proširili znanje o metaboličkim procesima koji se pojavljuju u mišićnim stanicama, što uključuje proizvodnju energije, metabolizam lipida i korištenje glukoze. Moguće je utvrđivati efekte uzrokovane lijekovima i toksičnost

koju oni izazivaju na stanice mišića. U tkivnom inženjerstvu služe za razvoj mišićnog tkiva u svrhu regenerativne medicine te kao test kompatibilnosti biomaterijala sa mišićnim stanicama. Iako se direktno ne koriste za proizvodnju kultiviranog mesa moguće ih je koristiti za poboljšanje aspekta mišićnog tkiva kultiviranog mesa (Jang i sur., 2022, Abdelmoez i sur., 2020, Chen i sur., 2019)

C2C12 stanice predstavljaju vrijedan alat u istraživanjima mišićne biologije, diferencijacije stanica, molekularne signalizacije i raznih drugih aspekta biologije i medicine. Međutim, najčešće su korištene za istraživanja razvoja mišića i uz to vezanih bolesti.

2.3.2. Diferencijacija C2C12 stanica i regulacija procesa

Diferencijacija mišićnih miooblata je strogo kontroliran, višestupanjski proces tijekom kojeg se pojedinačne stanice u početku slobodno dijele, zatim poravnavaju i spajaju kako bi formirale višejezgrene miotube. Takvo ponašanje stanica prikazano je shematski i uslikano laboratorijskom opremom na Slici 1. Proces je *in vivo* složen reguliran širokim spektrom faktora rasta, trofičnosti i drugih čimbenika (Das i sur., 2007).



Slika 1. a) Shematski prikaz procesa stvaranja višejezgrenih miotuba; b) Diferencijacija stanica u laboratoriju praćena mikroskopiranjem tijekom 6 dana (Niioka i sur., 2018)

Miogeni regulatorni čimbenici (engl. *myogenic regulatory factors*, MRF), miogeni faktor 5 (engl. *myogenic factor 5*, MF5), miogeni diferencijacijski antigen (engl. *myogenic*

differentiation antigen, MyoD), miogenin (engl. *myogenin*, MYOG) i miogeni faktor 4 (engl. *myogenic factor*, MRF4) članovi su osnovne obitelji transkripcijskih faktora koji kontroliraju diferencijaciju stanica skeletnih mišića. Teški lanci miozina (engl. *myosin heavy chains*, MyHCs) su čimbenici koji utječu na funkciju, rast i razvoj mišića. Desmin je član intermedijarnih filamenata (engl. *intermediate filament*, IF), specifičan je za mišiće te poznat kao miogeni marker u skeletnim mišićima. Proliferacija i diferencijacija C2C12 stanica su, također, regulirane složenim signalnim putovima kao što su mTOR, Notch i transformirajući faktor rasta (engl. *transforming growth factor*, TGF- β). Obitelj TGF- β polipeptidnih citokina djeluje na stanicu vezanjem faktora na TGF- β receptore (T β R) na staničnoj membrani. Uslijed vezanja liganda iz okoline na T β R receptore, uključujući tip 1 (T β R-1), tip 2 (T β R-2) i tip 3 (T β R-3), dolazi do fosforilacije Smad2 i Smad3 proteina. Aktiviran jednim od T β R receptora, protein Smad2/3 stvara kompleks sa Smad4 koji translocira unutar jezgre stanice gdje regulira transkripciju ciljnih gena vezanih za proces diferencijacija, ali i rasta, apoptoze i migracije. Miocilin (engl. *myocilin*, MYOC) je glikoprotein koji se eksprimira pri jako visokoj koncentraciji skeletnih mišića. Lokaliziran je na membrani i uslijed povećane fuzije stanice tijekom diferencijacije povećana je i ekspresija MYOC. Dakle, MYOC je sposoban promovirati C2C12 diferencijaciju mioblasta u miotube. Regulacija se odvija uz pomoć kaveolin-1 (engl. *Caveolin-1*, CAV1) proteina. CAV1 je 22 kDa velik membranski protein koji regulira aktivnost receptora i pomaže pri organizaciji i sastavljanju ostalih proteina u signalnom putu. Kao takav CAV1 vezan s MYOC kontrolira fosforilaciju Smad2 i Smad4 proteina čime ima utjecaj na cijeli TGF- β put i aktivaciju procesa diferencijacije C2C12 stanica. Povećanu ekspresiju MYOC prati i ekspresija MYH2 (engl. *myosin heavy chain 2*) i MYOG regulatora. (Zhang i sur., 2021) *In vitro* diferencijacija je određena potrebom za optimalnom gustoćom kulture kako bi došlo do potpuno ekspresije mišićnih gena. Potrebno je osigurati površinu preraslu stanicama kako bi se signali mogli prenositi između stanica. Takav stanica-stanica kontakt ovisi o međudjelovanju površinskih molekula. Funkcije molekula su važne za organizaciju tkiva te u odgovorima na podražaje iz okoline.

2.4. Taurin

Taurin (Tau) je β -sulfonska aminokiselina (2-aminoetansulfonska kiselina) koja ne ulazi u sastav proteina te se u tkivima može pronaći u slobodnom obliku (Hamper, 2016). Često se svrstava u skupinu osnovnih aminokiselina, iako u najstrožem smislu ne pripada toj skupini, te je produkt metabolizma cisteina, standardne aminokiseline. Neesencijalan je

nutrijent koji stvara jetra (Kapalka, 2010).

Najviša koncentracija taurina je u srcu, mišićima, mozgu i mrežnici oka. S obzirom na sudjelovanje u nekoliko metaboličkih putova poznat je širok raspon bioloških uloga taurina. Sudjeluje u osmoregulaciji, stvaranju žučnih soli, antioksidaciji, uspostavljanju stabilnosti stanične membrane, regulaciji staničnog volumena, glutamata, funkciji neurotransmitera, glikolizi, modulaciji rasta, vida i održavanju homeostaze kalcija. Široko je rasprostranjen u svim životinjskim tkivima i uistinu malo, ako uopće, u biljnom carstvu. Mnogi sisavci imaju sposobnost koristiti ili glicin ili taurin za konjugaciju žučne kiseline dok npr. mačke i psi koriste isključivo taurin (Hamper, 2016, Mai i sur., 2022).

Prisutnost taurina u mozgu igra važnu ulogu od začeca. Iako nije utvrđeno postojanje specifičnih receptora za taurin važan je za neurotransmisiju. U procesu embrionalnog i ranog postnatalnog razvoja taurin djeluje kao glavni neurotransmiter u mozgu imajući, u većini područja, mnogo veće koncentracije od gama-aminomaslačne kiseline (engl. *gamma-aminobutyric acid*, GABA), koja je glavni neurotransmiter za regulaciju aktivnosti mozga (Roysommuti i Wyss, 2015). Nakon apsorpcije putuje kroz tijelo nakon čega prolazi moždanu barijeru i ulazi u neurone. U stanici zadržava kalij i magnezij, a natrij drži izvan. Kao takav može utjecati na aktiviranje neurona (Kapalka, 2010). S obzirom na nisku *de novo* sintezu taurina u mozgu potreba egzogenog taurina za normalan rast, razvoj i funkciju mozga je velika. Perinatalni nedostatak taurina utječe na učenje, pamćenje i neuralnu kontrolu krvnog tlaka u odrasloj dobi, dok dodatak istog smanjuje moguću pojavu nekih neuroloških poremećaja (Roysommuti i Wyss, 2015).

Unutarstanična razina taurina regulirana je unosom taurina kroz transporter taurina i endogenom sintezom iz metionina i cisteina. Ukupna koncentracija taurina u tijelu regulirana je bubrežnom reapsorpcijom. Kada je unos taurina hranom ili sinteza taurina smanjena, izlučivanje mokraćom opada zbog povećane reapsorpcije u bubrežnim tubama. Hrana bogata taurinom su ribe i školjke. Svjetska epidemiološka istraživanja pokazala su kako je unos taurina procijenjen 24-satnim izlučivanjem taurina urinom bio obrnuto povezan sa smrtnošću od kardiovaskularnih bolesti, posebno smrtnosti uzrokovane koronarnom bolesti srca. Također, taurin štiti od oštećenja tkiva, što je vjerovatno povezano sa prevencijom raznih bolesti (Murakami i Yamori, 2013). Također, preostali taurin u organizmu se konjugira u žučne soli i izlučuje u žuč, odakle se transportira u dvanaesnik gdje sudjeluje u metabolizmu raznih lipida (Kapalka, 2010).

Manjak taurina može rezultirati raznim medicinskim problemima, uključujući bolesti srca i oštećenje jetre. Dokazan je utjecaj smanjenja pretilosti te mogućnost smanjenja

kolesterola u krvi. Taurin može povećati snagu i učinkovitost kontrakcije srčanog mišića kod oboljelih od kongestivnog zatajenja srca. Pretpostavlja se i utjecaj na liječenje anksioznosti stabilizaciju raspoloženja i antipsihotična aktivnost. Taurin ima i važnu ulogu u regulaciji lučenja inzulina, točnije stimulira lučenje. Utvrđeno je da kod miševa taurin potencira učinke leucina i glukoze na lučenje inzulina mehanizmom koji je neovisan o alosteričkoj aktivaciji glutamat dehidrogenaze. Učinak taurina na metabolizam glukoze se također očituje u pojačavanju stimulativnih učinaka glukoze i inzulina. Nekoj djeci nedostaju enzimi koji su esencijalni za metaboliziranje taurina zbog čega se od 1980-ih dodaje dječjoj hrani. Ponekad se dodaje energetske pićima, ali njegov energetski učinak nije dokazan (Kapalka, 2010, Nisoli i sur., 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Aluminij kalij sulfat (Kemika, Zagreb, RH)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Capricorn Scientific, Njemačka)
- Eozin B (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Etanol, 96 % (Kemika, Zagreb, RH)
- FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Capricorn Scientific, Njemačka)
- Hematoksilin (Kemika, Zagreb, RH)
- HS (*Horse Serum*) (Capricorn Scientific, Njemačka)
- Kalijev jodat (Kemika, Zagreb, RH)
- Octena kiselina (Honeywell, SAD)
- PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Penicilin/Streptomycin otopina (Capricorn Scientific, Njemačka)
- Taurin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Tripan-plavo (Gibco, SAD)
- Tripsin-EDTA (Gibco, SAD)

3.1.2. Otopine

- Otopina hematoksilina

Aluminij kalij fosfat	2,5 g
Hematoksilin	50 mg
Kalijev jodat	10 mg
Octena kiselina	1 mL
Destilirana voda	50 mL

- Otopina eozina

Eozin	1 g
Etanol	80 mL

Destilirana voda	20 mL
------------------	-------

- Otopina taurina (300 mM)

Taurin	0,3758 g
--------	----------

DMEM	10 mL
------	-------

- Otopina taurina (0,75 mM)

Otopina taurina (300 mM)	100 μ L
--------------------------	-------------

HS	40 mL
----	-------

- Otopina taurina (75 mM)

Otopina taurina (300 mM)	1 mL
--------------------------	------

HS	40 mL
----	-------

3.1.3. Uređaji i oprema

- Hladnjak (-80 °C), DirectFREEZE -86 °C, ULTRA LOW (Nuve, Turska)
- Hladnjak (4 °C i -20 °C) (Gorenje, Slovenija)
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂ (Iskra PIO, Slovenija)
- Inverzni mikroskop (Zeiss, Njemačka)
- Komora za sterilni rad (Kambič, Slovenija)
- Laboratorijski pribor (Pipete, nastavci za pipete, vaga, epruvete 1,5 mL, menzure, laboratorijske čaše)
- Ploča s 24 jažice (Corning, SAD)
- Svjetlosni mikroskop (Zeiss, Njemačka)
- Tresilica (Biosan, Latvija)

3.1.4. Stanična linija C2C12

U ovome radu korištena je stanična linija C2C12, predstavlja stanice mišjih skeletnih mioblasta dobavljenih iz banke stanica *American Type Cell Collection*. Osnovni medij za uzgoj je DMEM uz dodatak FBS-a što omogućuje kompletnu hranjivu okolinu. Stanična linija je sposobna diferencirati u uvjetima niskog sadržaja seruma (HS) što je čini

pogodnom za istraživanja mišića. Adherentna je stanična linija što znači da zahtjeva čvrstu površinu za rast i razvoj.

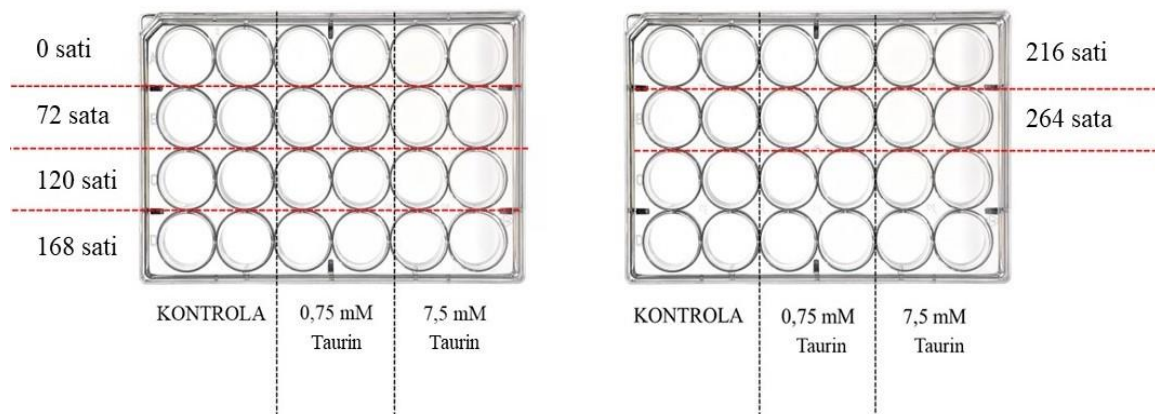
3.2. Metode rada

3.2.1. Uzgoj C2C12 stanica i tretman taurinom

Stanice se prije uporabe čuvaju na temperaturi nižoj od $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prilikom korištenja stanica najprije ih je potrebno odmrznuti u vodenoj kupelji tijekom 2 minute na temperaturi od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ na kojoj se poslije i uzgajaju pri kontroliranom atmosferom CO_2 . Sadržaj ampule se inokulira u 9 mL kompletnog hranjivog medija za uzgoj C2C12 stanica. Centrifugiranjem 5-7 minuta pri $125 \times g$ uklanja se medij za zamrzavanje, uklanja se supernatant, a talog se resuspendira u mediju za uzgoj. Takva suspenzija se zatim prebacuje u T-bocu i stavlja u inkubator. Tijekom narednog perioda uzgoja stanice se pričvrste za podlogu posude pri čemu stanice gube ovalni oblik što se na mikroskopu vidi kao izduživanje stanica. Potrebno je dovoljno često mijenjati medij stanicama koje koriste hranjive tvari kojih ponestaje, također, redovito kontrolirati i nadgledati promjene koje mogu ukazivati na kontaminacije.

Proces precjepljivanja započinje uklanjanjem medija iz T-boce. Posuda i stanice se ispiru PBS-om od ostataka hranjivog medija. Zatim se uklanja PBS i dodaje se tripsin koji proteolitičkom aktivnošću odvaja stanice od površine posude i vraća im ovalan i okrugao oblik. Posuda sa stanicama se stavlja na 5-7 minuta u inkubator pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ što je optimalna temperatura za aktivnost tripsina. Uspješnost tripsinizacije provjerava se pod inverznim mikroskopom. Ako su stanice uspješno odvojene dodaje se medij koji zaustavlja djelovanje tripsina kako ne bi krenuo razgrađivati stanične membrane i time lizirati stanice. Zatim, stanice se broje u Neubauerovoj komorici te se priprema suspenzija stanica koncentracije 5×10^4 st/mL kojom se najepljuju 2 ploče sa 24 jažice prikazane na Slici 2. Medij je potrebno mijenjati svakih 48h. Nakon 72h, kada su stanice dovoljno prerasle dno jažice, medij fetalnog goveđeg seruma za rast stanica je zamijenjen medijem za diferencijaciju sa 2 % konjskog seruma u obliku kontrole, sa 0,75 mM i 7,5 mM koncentracije taurina.

Svakih 48h stanicama je mijenjan medij te se pratio utjecaj taurina na diferencijaciju i broj stanica tijekom 72, 120, 168, 216 i 264 sata.



Slika 2. Prikaz dvaju ploča sa 24 jažice nacijepjenih C2C12 stanicama u svrhu istraživanja utjecaja taurina na rast i diferencijaciju istih (vlastita fotografija)

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

Metoda brojanja stanica tripan-plavo korisna je za razlikovanje živih i mrtvih stanica jer dolazi do bojanja samo mrtvih stanica zbog propusnosti i neselektivnosti membrane na prolazak boje. Postupak je potrebno započeti odvajanjem stanica od površine tripsinizacijom. Uklanja se medij iz jažice koja se zatim ispiru PBS-om. Uklanjanju PBS-a slijedi dodatak 150 μL tripsina koji djeluje na stanice tijekom 5-8 minuta u inkubatoru pri 37 $^{\circ}\text{C}$. Provjera uspješnosti tripsinizacije provodi se pod inverznim mikroskopom te se dodaje 100 μL medija za inaktivaciju tripsina što čini volumen od 250 μL . Suspenzija se dobro resuspendira kako bi se postigla što ujednačenija koncentracija u cjelokupnom volumenu te se 10 μL suspenzije pomiješa sa 10 μL boje tripan-plavo. Obojena suspenzija se nanosi na Neubauerovu komoricu s već postavljenim pokrovnim stakalcem. Brojanje se provodi na svjetlosnom mikroskopu gdje su vidljiva 4 velika kvadrata komorice od kojih se svaki sastoji od po 16 kvadratića. Stanice se broje u svakom od velikih kvadrata nakon čega se uzima srednja vrijednost dobivenih brojki. Prevođenje broja stanica u ukupnu koncentraciju provodi se formulom:

[1]

$$\text{broj stanica po mL} = \bar{x} * 5000$$

Brojanje se provodi na obje strane komorice sa dva paralelna uzorka od čijih se rezultata računa srednja vrijednost.

3.2.3. Bojanje stanica metodom hematoksilin-eozin

Hematoksilin-eozin metoda bojanja stanica koja se koristi u histologiji i tehnologiji životinjskih stanica za uspješno vizualiziranje i lokaliziranje pojedinih dijelova stanice. Hematoksilin boji jezgru ljubičastim i plavim, dok eozin citoplazmu stanice ružičastim nijansama što olakšava proučavanje procesa diferencijacije. Postupak bojanja stanica započinje uklanjanjem medija iz jažice te ispiranjem PBS-om. Doda se 150 μL eozina koji se ostavi u inkubator na djelovanje 10 minuta. Kada se utvrdi dovoljno obojenje eozinom potrebno ga je odstraniti iz jažice i isprati količinom PBS-a koja neće previše obezbojiti skoro obojene stanice. Potom se dodaje 150 μL hematoksilina na ponovnu inkubaciju 15 minuta. Slijedi višekratno ispiranje PBS-om pri čemu je poželjno ostaviti određeni volumen unutar jažice kako bi se spriječilo uništenje preparata sušenjem. Takav preparat C2C12 stanica je reprezentativan za promatranje diferencijacije pod inverznim mikroskopom.

3.2.4. Obrada rezultata

Određivanje specifične brzine rasta (μ):

Specifična brzina rasta stanica (μ) određena je izrazom:

[2]

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} [h^{-1}]$$

gdje je:

x – masa stanica

dx – povećanje biomase stanica

dt – vremenski interval

μ predstavlja konstantu u log fazi koja je približna vrijednosti u fazi usporenog rasta, stoga vrijedi:

[3]

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t$$

Masa je proporcionalna broju stanica, stoga vrijedi:

[4]

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{\Delta t} [h^{-1}]$$

N – broj stanica u 0,5 mL na kraju log faze

N_0 – broj stanica u 0,5 mL na početku log faze

Δt – vremenski interval (h)

Udvostručenje stanica (t_D) računa se prema:

[5]

$$t_D = \frac{\ln 2}{\mu} [h]$$

μ – specifična brzina rasta (h^{-1})

Prinos stanica računa se prema:

[6]

Prinos stanica

= broj stanica na kraju log faze – broj stanica na početku uzgoja

Podaci su obrađeni statistički u programu Excel. Prilikom izračuna korišteni su parametri srednje vrijednosti i standardne devijacije prema formulama:

[7]

Srednja vrijednost: $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$

[8]

Standardna devijacija: $\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$

Stupanj diferencijacije računa se prema formuli:

[9]

$$\text{stupanj diferencijacije (\%)} = \frac{A_D}{A_D + A_{ND}} * 100 \%$$

gdje je:

A_D - površina slike koju zauzimaju diferencirane stanice

A_{ND} - površina slike koju zauzimaju nediferencirane stanice

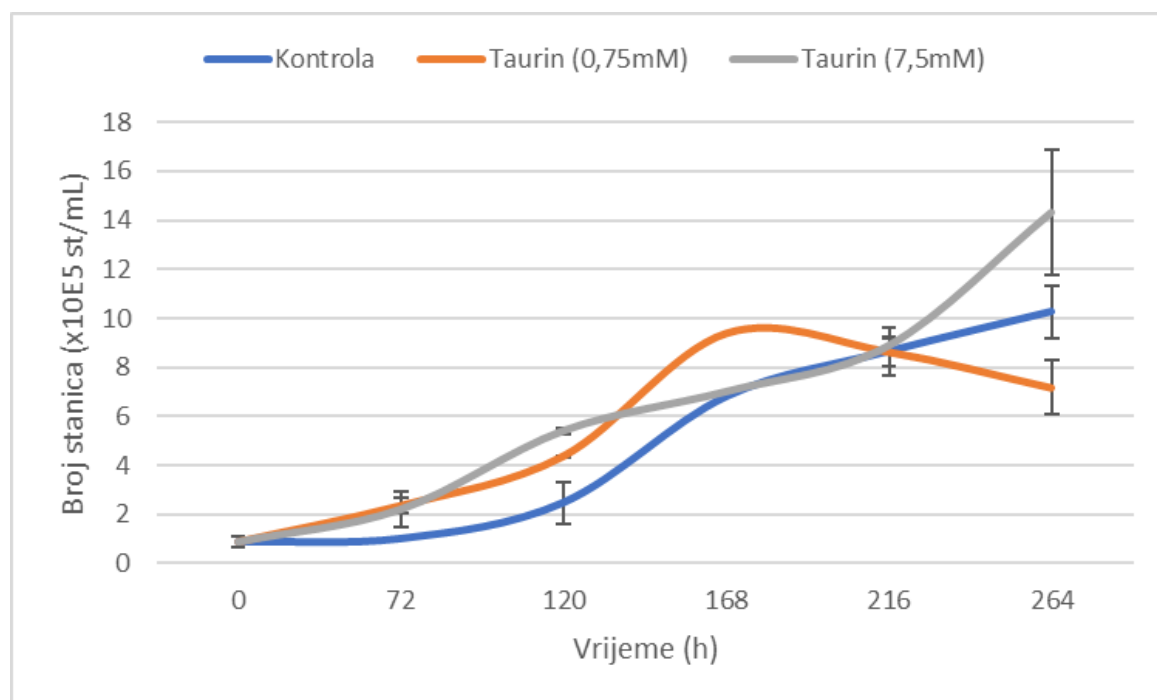
Slike su statistički obrađene u programu *ImageJ* (National Institute of Health, USA)

4. REZULTATI I RASPRAVA

C2C12 stanična linija predstavlja mioblaste mišićnih stanica miša koja se koristi kao model za istraživanje rasta i diferencijacije složenih mišićnih sustava. Stanice u okolini fetalnog goveđeg seruma (FBS) proliferiraju zbog dostatnosti faktora rasta i hranjivih tvari. Nakon što stanice dosegnu konfluentnost od 80 % slijedi zamjena medija sa 2 % konjskim serumom (HS) kada stanice počinju diferencirati i stvarati miotube mišićnih vlakana. U ovome radu ispitan je učinak aminokiseline taurina pri koncentracijama 0,75 mM i 7,5 mM na proces diferencijacije i ukupan broj stanica.

4.1. Učinak taurina na rast C2C12 stanica

Za praćenje povećanja broja stanica tijekom eksperimenta korištena je metoda brojanja tripan-plavo. Stanice su nacijepljene u jažice dvaju ploča kao kontrola i dvije različite koncentracije taurina te tijekom brojanja su korištene po dvije paralele. Brojanje je provedeno svakih 48h kada je i mijenjan medij. Slika 3. prikazuje trend povećanja broja stanica tijekom vremena.



Slika 3. Krivulja rasta C2C12 stanica uz dodatak taurina tijekom 264 sata uzgoja

Na temelju dobivenih podataka za rast C2C12 stanica pri uvjetima kontrole, 0,75 mM i 7,5 mM koncentracije taurina izračunati su parametri specifične brzine rasta, vremena udvostručenja i prinosa stanica.

Tablica 1. Parametri rasta C2C12 stanica tijekom tretmana taurinom

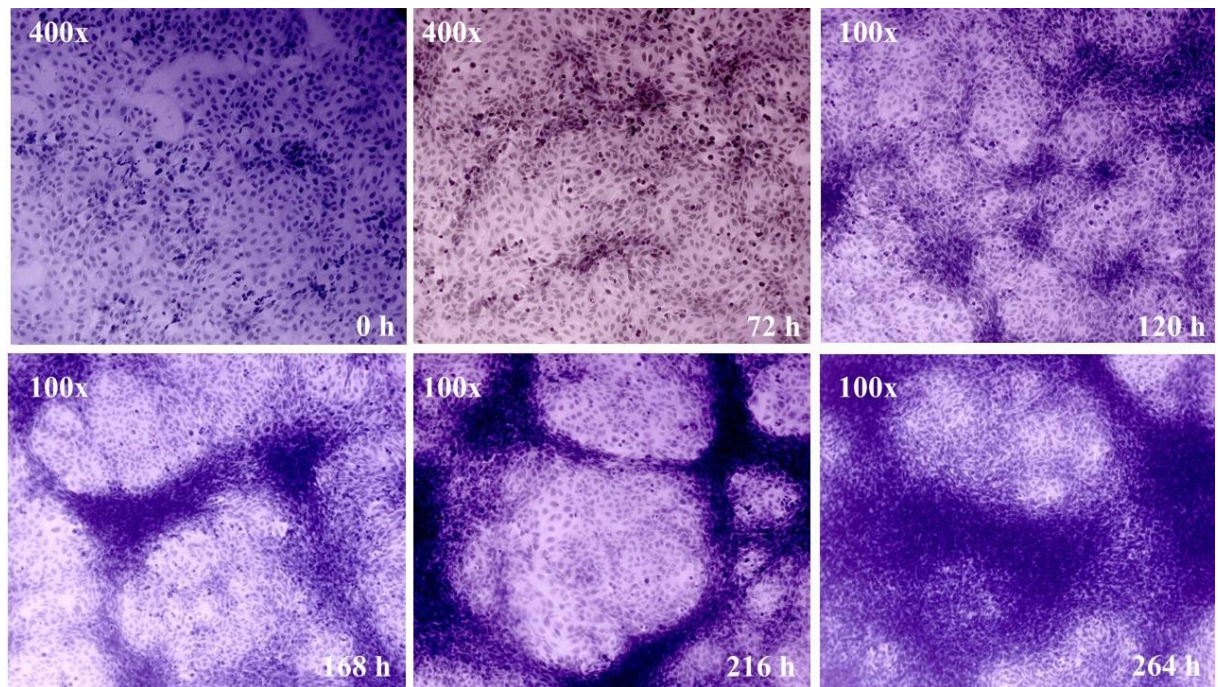
Uzorak	μ (h ⁻¹)	t_d (h)	Prinos x 10 ⁴ (st)
kontrola	0,00938	73,896	94,04
0,75 mM taurina	0,00802	86,427	63,06
7,5 mM taurina	0,01064	65,145	134,43

Iz rezultata eksperimenta prikazanih u Tablici 1 vidljivo je kako je specifična brzina rasta pri 0,75 mM taurina nešto manja u odnosu na kontrolu na što utječe pad broja stanica nakon 168 sati, dok je ista veća kod 7,5 mM taurina gdje je nakon svakog novog brojanja zabilježen rast broja stanica. Vrijeme potrebno za udvostručenje stanica najvećeg je iznosa pri 0,75 mM koncentraciji taurina, a pri 7,5 mM najmanje. Prinos stanica je značajno veći pri 7,5 mM taurina, dok je kod 0,75 mM taurina manji u odnosu na kontrolu čemu je, ponovo, veliki uzrok krajnji pad broja stanica.

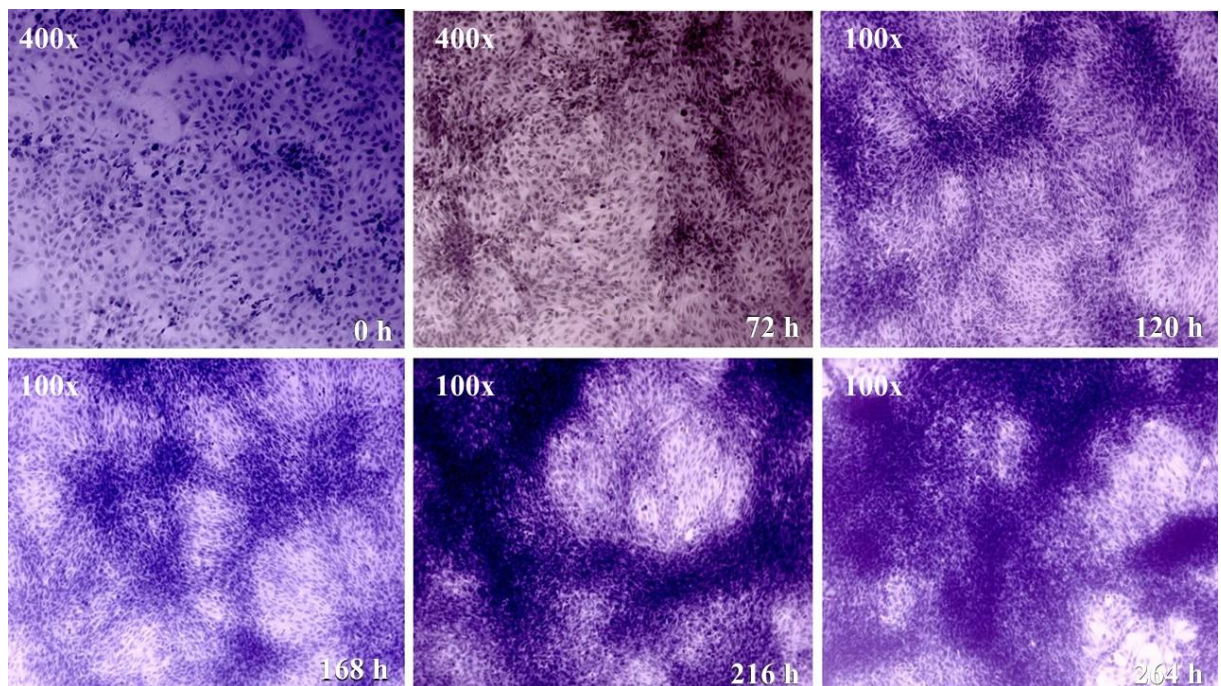
Rezultati istraživanja su u većinskom dijelu pokazali na poticanje rasta C2C12 stanica, to više sa povećanom koncentracijom taurina. Takav rezultat u skladu je sa istraživanjem Hao i sur. (2021). Međutim, oprečne rezultate daju istraživanja Deldicque i sur. (2007) koji govore o nepostojanju učinka taurina na rast, dok Park i sur. (2023) govore o inhibiciji rasta istim. Provedenim eksperimentom je moguće potkrijepiti i takva ponašanja stanica. Kako bi se dobio jednoznačan rezultat i konkretniji podaci o ponašanju stanica u prisustvu taurina u određenim koncentracijama potrebno je provesti dodatna eksperimentalna istraživanja.

4.2. Utvrđivanje stupnja diferencijacije te morfoloških promjena uslijed tretmana C2C12 stanica taurinom

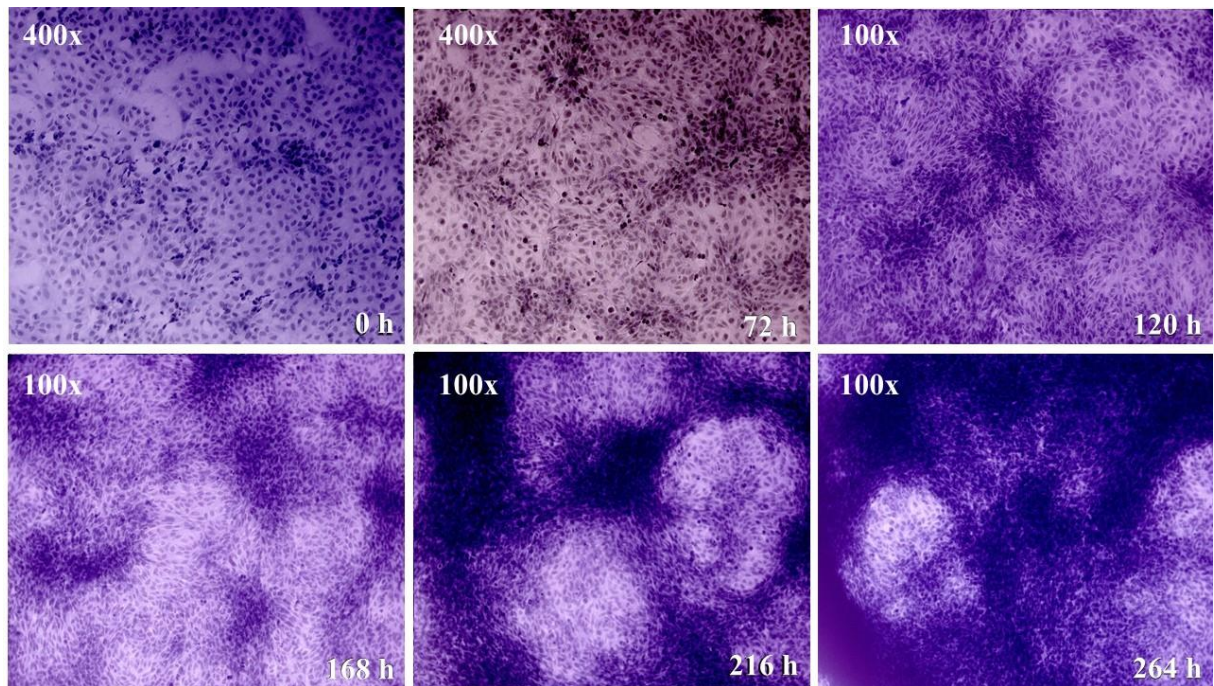
Diferencijacija stanica tijekom eksperimenta praćena je hematoksilin-eozin metodom bojanja koja je opisana u poglavlju 3.2.3. Slike su dobivene fotografiranjem na inverznom mikroskopu opremljenim digitalnom opremom te su statistički obrađene u programu *ImageJ* (NIH).



Slika 4. Morfološke promjene C2C12 stanica tijekom 264 sata u kontrolnim uvjetima s prikazanim uvećanjima pri kojim su slike arhivirane (vlastita fotografija)



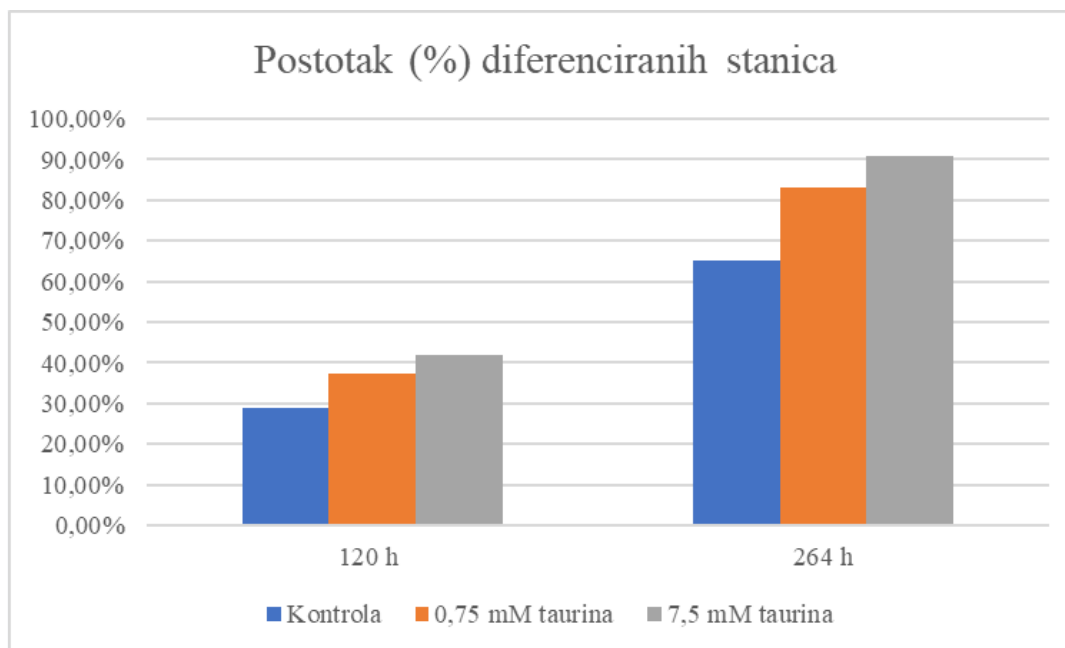
Slika 5. Morfološke promjene C2C12 stanica tijekom 264 sata u uvjetima 0,75 mM taurina s prikazanim uvećanjima pri kojim su slike arhivirane (vlastita fotografija)



Slika 6. Morfološke promjene C2C12 stanica tijekom 264 sata u uvjetima 7,5 mM taurina s prikazanim uvećanjima pri kojim su slike arhivirane (vlastita fotografija)

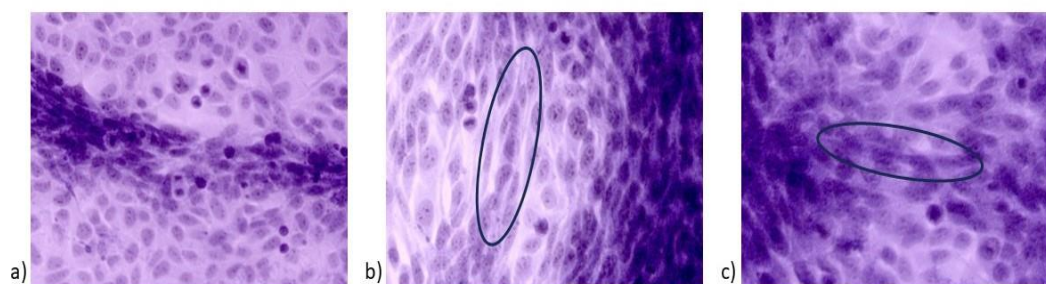
Slike 4, 5, i 6 prikazuju morfološke promjene C2C12 stanica tijekom 264 sata uzgoja. Zamjena medija sa HS rezultirala je izduživanjem stanica i uspostavljanjem tzv. diferencijskih mostova. Primjećuje se viši stupanj diferencijacije na svakom sljedećem vremenskom periodu izgladnjivanja stanica. Diferencijacija se opaža kao snop izduženih stanica koje se prepoznaju po nizu uzastopno poredanih jezgri.

Rezultati obrade slika u programu *ImageJ* prikazani su na Slici 7.



Slika 7. Grafička usporedba postotka (%) diferenciranih stanica nakon 120 i 264 sata

Statističkom obradom podataka dobiveni su postotci diferenciranih stanica u određenom trenutku uzgoja. Nakon 120 sati uzgoja u kontrolnim uvjetima je 28,86 % stanica diferenciralo. Nakon 96 sati zabilježen je porast na 65,16% diferenciranih stanica. Porast od 45,79 % u odnosu na 120 sati zabilježen je pri 0,75 mM koncentraciji taurina, što daje konačnih 83,03 %. Pri najvećoj koncentraciji taurina zabilježeno je konačnih 90,91 % diferenciranih stanica, dok nakon 120 sati njih 41,84 %. Ovakvi rezultati potvrđuju povećanje diferencijacije u uvjetima prisutnosti taurina, međutim, otežavajuća okolnost ovakve metode je nepostojanost monosloja što otežava procjenu diferencijskog stanja stanica. Ipak, nesumnjivo je kako je došlo do izduživanja stanica i diferencijacije što je vidljivo i na Slici 8.



Slika 8. Diferencijacija stanica nakon 216 h uzgoja prikazana kao; a) stvaranje tzv. diferencijskog mosta u kontrolnim uvjetima; b) fuzionirane stanice tretirane sa 0,75 mM

taurina; c) fuzionirane stanice tretirane sa 7,5 mM taurina (vlastita fotografija)

5. ZAKLJUČCI

1. Taurin u koncentraciji od 0,75 mM pokazao je blago pozitivan učinak na rast C2C12 stanica, naročito u prvim danima uzgoja, tj. kada nalazimo ispod 50 % diferenciranih stanica. Pri koncentraciji taurina od 7,5 mM, bilježi se redovito značajno veći broj stanica u odnosu na kulturu netretiranu taurinom te zaključujemo da navedena koncentracija potiče rast stanica.
2. Taurin pokazuje pozitivan učinak na diferencijaciju C2C12 stanica u svakoj od korištenih koncentracija. Međutim, veća koncentracija taurina pokazuje nešto veće pozitivno djelovanje na diferencijaciju C2C12 stanica u odnosu na 0,75 mM koncentraciju.
3. Rezultati eksperimenta nisu posve jednoznačni, naročito pri nižoj koncentraciji taurina. Potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se utvrdio povoljan učinak na rast stanica i diferencijaciju C2C12 stanica.

6. POPIS LITERATURE

Abdelmoez AM, Sardón Puig L, Smith JAB, Gabriel BM, Savikj M, Dollet L (2020) Comparative profiling of skeletal muscle models reveals heterogeneity of transcriptome and metabolism, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 318 (3), 615-626 <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00540.2019>

Bajek S, Nikolić M, Šoić Vranić T, Bajek M, Marić I (2015) Mišićne progenitorne stanice u skeletnom mišiću. *Medicina Fluminensis* 51, 503-510.

Barnes D, Sirbasku D, Sato G (1984) *Cell Culture Methods for Molecular and Cell Biology - Volume 3: Methods for Serum-Free Culture of Epithelial and Fibroblastic Cells*, Alan R Liss Inc., New York.

Birbrair A, Zhang T, Wang Z-M, Messi ML, Enikolopov Grigori N. Mint A i sur. (2013) “Role of Pericytes in Skeletal Muscle Regeneration and Fat Accumulation”, *Stem Cells and Development* 22 (16): 2298–314.

Chen H, Zhong J, Wang J, Huang R, Qiao X, Wang H i sur. (2019) Enhanced growth and differentiation of myoblast cells grown on E-jet 3D printed platforms. *Int J Nanomedicine*, 937-950 <https://doi.org/10.2147/IJN.S193624>

Cooper Jr. JA, Mintz BR, Palumbo SL, Li W-J (2013) *Characterization of Biomaterials*, Chapter 4: Assays for determining cell differentiation in biomaterials, 101-137, Woodhead Publishing, Sawston, Cambridge <https://doi.org/10.1533/9780857093684.101>

Das P, Ezashi T, Schulz LC, Westfall SD, Livingston KA, Roberts RM (2007) *Stem Cell Research*, izd. 1., Effects of FGF2 and oxygen in the BMP4-driven differentiation of trophoblast from human embryonic stem cells, Elsevier, Amsterdam, 61-74 <https://doi.org/10.1016/j.scr.2007.09.004>

Deldicque L, Theisen D, Bertrand L, Hespel P, Hue L, Francaux M (2007) Creatine enhances differentiation of myogenic C2C12 cells by activating both p38 and Akt/PKB pathways.

American journal of physiology. Cell physiology, 293(4), C1263–C1271.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00162.2007>

Denes, LT, Riley LA, Mijares JR, Arboleda JD, McKee K i sur. (2019) Culturing C2C12 myotubes on micromolded gelatin hydrogels accelerates myotube maturation, *Skeletal Muscle* **9**, 17 <https://doi.org/10.1186/s13395-019-0203-4>

Diokmetzidou A, Tsikitis M, Nikouli S, Kloukina I, Tsoupri E, Psarras S i sur. (2016) Methods in Enzymology, Volume 568, 1. izd. , Elsevier, Amsterdam
<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.09.026>

Froger N, Moutsimilli L, Cadetti L, Jammoul F, Wang Q-P, Fan Y i sur. (2014) Taurine: The comeback of a nutraceutical in the prevention of retinal degenerations, *Progress in Retinal and Eye Research*, Volume 41, Elsevier, Amsterdam, 44-63
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.03.001>

Gaurina Srček V, Radojčić Redovniković I, Radošević K, Slivac I (2020) Hrvatska tehnička enciklopedija

Hao Q, Wang L, Zhang M, Wang Z, Li M, Gao X (2022) Taurine stimulates protein synthesis and proliferation of C2C12 myoblast cells through the PI3K-ARID4B-mTOR pathway. *The British journal of nutrition*, 128(10), 1875–1886. <https://doi.org/10.1017/S0007114521004918>

Hamper B (2016) August's Consultations in Feline Internal Medicine, izd. 7, Elsevier, Amsterdam, 600-606 <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-22652-3.00062-1>

Jang Mi, Scheffold J, Røst LM, Cheon H, Bruheim P (2022) Serum-free cultures of C2C12 cells show different muscle phenotypes which can be estimated by metabolic profiling, *Sci Rep* **12**, 827 <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04804-z>

Kapalka GM (2010) Nutritional and Herbal Therapies for Children an Adolescents, Chapter 4: Substances Involved in Neurotransmission, 71-99, Academic Press, Cambridge, Massachusetts <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374927-7.00004-2>

Lynn DE (2009) Encyclopedia of Insects, 2.izd., Academic Press, Cambridge, 144-145.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00048-5>

Mai K, Xue M, He G, Xie SQ, Kaushik SJ (2022), Fish Nutrition, 4. izd., Academic Press, 181-302 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819587-1.00012-4>

Murakami S, Yamori Y (2013) Bioactive Food as Dietary Interventions for the Aging Population, 159-171 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397155-5.00027-1>

Niioka H, Asatani S, Yoshimura A (2018) Classification of C2C12 cells at differentiation by convolutional neural network of deep learning using phase contrast images. Human Cell 31, 87–93 <https://doi.org/10.1007/s13577-017-0191-9>

Nisoli E, Aquilani R, D'Antona G (2013) Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes, Chapter 9 – Amino Acid Supplements and Diabetes, 83-95, Elsevier, Amsterdam <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397153-1.00009-3>

Park SY, Karantenislis G, Rosen HT (2023) Effects of energy drinks on myogenic differentiation of murine C2C12 myoblasts. Sci Rep 13, 8481 <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35338-7>

Rolak AL (2011) Neurology Secrets, 5. izd., Mosby, Missouri <https://doi.org/10.1016/C2009-0-55001-5>

Roysommuti S, Wyss JM (2015) Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease, 207-213 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411462-3.00022-9>

Suvarna K, Layton C (2012) Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques, 7. izd., Churchill Livingstone

Sykes EJ (2023) Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat, Saunders, Philadelphia <https://doi.org/10.1016/C2014-0-03934-2>

Thermo Fisher Scientific (2020) Cell culture basics handbook

Verma A, Verma M, Singh A (2020) Animal Biotechnology, 2. izd., Academic Press, 269-293.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4>

Alexander McNeill R, Newsom-Davis JM, Davies RE, David M, Gergely J, Crompton Huw R i sur. (2023) *muscle*, *Encyclopedia Britannica*

Yaffe D, Saxel O (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270**, 725-727. <https://doi.org/10.1038/270725a0>

Zhang Y, Li S, Wen X, Tong H, Li S, Yan Y (2021) MYOC Promotes the Differentiation of C2C12 Cells by Regulation of the TGF- β Signaling Pathways via CAV1. *Biology*, 10(7), 686.
<https://doi.org/10.3390/biology10070686>

Izjava o izvornosti

Ja Marko Vukić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Handwritten signature of Marko Vukić in black ink on a light blue background.

Vlastoručni potpis