

Morfološke promjene C2C12 stanica tijekom procesa diferencijacije

Kolar, Neli

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:159:785107>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-26**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Neli Kolar
7912/BT

**MORFOLOŠKE PROMJENE C2C12 STANICA
TIJEKOM PROCESA DIFERENCIJACIJE**

ZAVRŠNI RAD

Naziv predmeta: Tehnologija vitamina i hormona

Mentor: prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Morfološke promjene C2C12 stanica tijekom procesa diferencijacije
Neli Kolar, 0058216880

Sažetak:

C2C12 stanice potječu iz satelitskih stanica mišjeg bedrenog mišića i dobivene su izolacijom stanica nakon inducirane ozljede koja potiče regeneraciju. Lako se uzgajaju i diferenciraju u kulturi, te se zbog toga često koriste kao modelni sustav za proučavanje rasta i diferencijacije mišića.

Cilj ovog rada bio je praćenje rasta i usporedba morfoloških promjena C2C12 stanica u medijima za proliferaciju i diferencijaciju. Tijekom eksperimenta, nakon što su stanice dosegle konfluenciju od 60-70%, dio stanica prebačen je u medij za diferencijaciju koji je sadržavao 2% konjskog seruma, a dio stanica je nastavio rasti u mediju za uzgoj s 10% fetalnog govedeg seruma. Metodom tripan plavo praćena je dinamika rasta C2C12 stanica tijekom 264 sati, a morfološke promjene su praćene bojanjem stanica bojom kristal-ljubičasto koje su vizualizirane pod inverznim mikroskopom. Na temelju krivulja rasta C2C12 stanica uočeno je da stanice koje su rasle u 2% konjskog seruma ostvaruju 2,5x manji prinos u odnosu na stanice koje su rasle u mediju za proliferaciju s 10% fetalnog govedeg seruma. Morfološke karakteristike C2C12 stanica u mediju za diferencijaciju pokazuju da je došlo do diferenciranja stanica i nastajanja višejezgrenih, izduženih miotuba. Za to vrijeme, C2C12 stanice koje su rasle u mediju za proliferaciju zadržale su nediferenciranu, mioblastnu morfologiju.

Ključne riječi: diferencijacija, C2C12 stanice, miotubi, mioblasti, tripan plavo

Rad sadrži: 24 stranica, 9 slika, 1 tablicu, 25 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. Višnja Gaurina Srček

Datum obrane: 10. srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Bioengineering
Laboratory for Cell Technology and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Abstract:

C2C12 cells were originally derived from satellite cells from the thigh muscle of female mouse donor after a crush injury. They are easily cultured and differentiated in cell culture and often are used as a model system for studying muscle growth and differentiation.

The aim of this thesis was to study the growth and morphological characteristic of C2C12 cells in proliferation and differentiation media. During the experiment, once the cells reached 60-70 % confluence, a part of cells were transferred to a differentiation medium containing 2% horse serum, while the other part remained to grow in culture medium with 10% foetal bovine serum. The growth characteristics of C2C12 cells were determined by Trypan blue method during 264 h, while morphological changes in C2C12 cells were analysed by inverted light microscope after crystal-violet staining. Obtained results showed that cells cultivated in 2% horse serum achieved a 2.5x lower total cell yield in comparison to the cells cultivated in a proliferation medium supplemented by 10% foetal bovine serum. Additionally, morphological changes in C2C12 cells during the processes of proliferation and differentiation were observed. Cultivation of C2C12 cells in a differentiation medium resulted in cell differentiation and the formation of multinucleated, elongated myotubes. At the same time, cells cultured in a proliferation medium retained their typical undifferentiated, myoblastic morphology.

Keywords: differentiation, C2C12 cells, myotubes, myoblasts, Trypan blue

Thesis contains: 24 pages, 9 figures, 1 table, 25 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: Višnja Gaurina Srček, Ph.D. Full Professor

Thesis defended: July 10th, 2023

Sadržaj	
1 UVOD	1
2 TEORIJSKI DIO	2
2.1 KULTURA STANICA	2
2.1.1 MEDIJ ZA UZGOJ ŽIVOTINJSKIH STANICA	3
2.2 MIŠIĆNE STANICE	6
2.3 STANIČNA LINIJA C2C12	8
3 EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1 MATERIJALI	10
3.1.1 KEMIKALIJE	10
3.1.2 OTOPINE I PUFERI	10
3.1.3 UREĐAJI I OPREMA	10
3.1.4 C2C12 STANIČNA LINIJA	11
3.2 METODE RADA	12
3.2.1 UZGOJ C2C12 STANICA	12
3.2.2 BROJANJE STANICA METODOM TRIPAN-PLAVO	13
3.2.3 BOJANJE STANICA BOJOM KRISTAL-LJUBIČASTO	14
3.2.4 OBRADA REZULTATA	14
4 REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1 DINAMIKA RASTA C2C12 STANICA U MEDIJU ZA PROLIFERACIJU I DIFERENCIJACIJU	16
4.2 MORFOLOŠKE PROMJENE C2C12 STANICA U MEDIJU ZA PROLIFERACIJU I DIFERENCIJACIJU	18
5 ZAKLJUČCI	21
6 POPIS LITERATURE	22

1 UVOD

Stanična kultura je tehnika kojom se ljudske, životinjske ili stanice kukaca uzgajaju u odgovarajućem hranjivom mediju u kontroliranim uvjetima. Sredinom 20. stoljeća, kultura životinjskih stanica postala je uobičajena laboratorijska tehnika u biologiji i biotehnologiji. Međutim, koncept održavanja živih stanica izdvojenih iz njihovog izvornog okruženja otkriven je još u 19. stoljeću. Danas se kultura životinjskih stanica koristi kao jedan od glavnih “alata” u prirodnim znanostima odnosno u medicinskim istraživanjima, biotehnološkim procesima, farmaceutskoj industriji, itd. Stanice se izoliraju iz tkiva, mehanički i/ili enzimski razgrađuju do pojedinačnih stanica te se nacjepljuju u odgovarajući medij za rast i uzgoj. Mediji za uzgoj stanica sadrže hranjive tvari, aminokiseline, vitamine, faktore rasta i druge komponente potrebne za održavanje vitalnosti i proliferaciju stanica.

Stanična linija C2C12 su mioblastne stanice dobivene iz mišjeg mišićnog tkiva, te predstavljaju jedan od modela stanica koji se često koristi u istraživanju procesa diferencijacije. Diferencijacija stanica predstavlja kompleksan proces koji se javlja tijekom razvoja organizma i omogućuje stanici da preuzme specifične morfološke i funkcionalne karakteristike određenog tkiva ili organa. Ovaj proces uključuje brojne promjene u strukturi stanica, uključujući promjene u obliku, veličini, organelima i proteinskom sastavu. Tako zamjenom medija za uzgoj C2C12 stanica medijem za diferencijaciju dolazi do prekida staničnog ciklusa i početka faze diferencijacije, pri čemu stanice mijenjaju svoj oblik, iz jednostavnih mioblasta u duguljaste, višejezgrene miotube. Razumijevanje morfoloških promjena koje se događaju tijekom diferencijacije stanica ključno je u otkrivanju mehanizama koji reguliraju ovaj proces.

Na osnovu svega navedenog, cilj ovog rada bio je istražiti i utvrditi morfološke promjene u C2 C12 stanica tijekom procesa diferencijacije mioblasta u miotube.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 Kultura stanica

Kultura stanica je laboratorijska tehnika koja se koristi za *in vitro* uzgoj živih stanica u kontroliranim uvjetima uz dodatak različitih hranjivih tvari i faktora rasta, te drugih potrebnih nutrijenata. Stanična kultura se odnosi na izdvajanje stanica iz životinja ili biljaka te njihov daljnji rast u povoljnom umjetnom tj. kontroliranom okruženju. Kultura stanica ima sličnosti s tehnikama mikrobnih procesa, ali uzgoj životinjskih i biljnih stanica zahtijeva posebnu pažnju i složenije medije za uzgoj zbog njihove osjetljivosti na kontaminaciju i mehanička oštećenja. Među kulturama životinjskih stanica razlikujemo:

Primarne kulture izoliraju se izravno iz životinjskih organa ili tkiva, obično su heterogene, imaju ograničen životni vijek odnosno ograničen broj generacija i niže specifične brzine rasta (Castilho i sur., 2008) . Kako bi se stvorila dugotrajnija kultura stanica, primarne stanice se mogu uspostaviti pomoću mehaničke, kemijske ili enzimske razgradnje tkiva, te se time omogućava da svaka stanica funkcionira kao zasebna jedinica. Primarna kultura se odnosi na fazu u kojoj se kultura nalazi nakon izolacije iz tkiva, te proliferacije u odgovarajućim uvjetima sve dok stanice ne ispune cijelu dostupnu podlogu odnosno dosegnu konfluenciju. U ovoj fazi, stanice se moraju subkultivirati, prebacivanjem na novu podlogu s hranjivim medijem, kako bi se osigurao veći prostor za rast. Subkultivacija se provodi kako bi se stvorile stanične linije koje imaju veći kapacitet rasta i dulji životni vijek u usporedbi s primarnim stanicama.

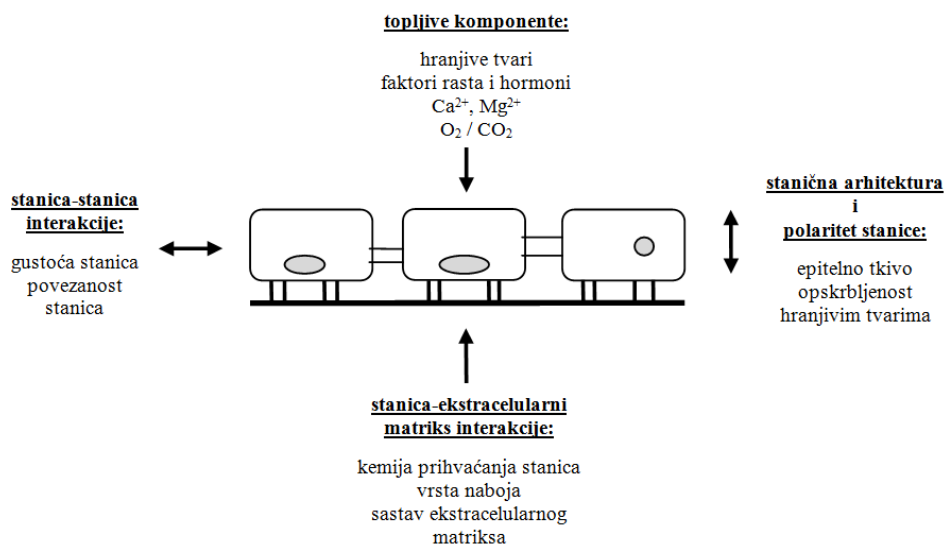
Stanične linije izvedene iz primarnih kultura imaju ograničen životni vijek, te njihovim umnožavanjem stanice s najvećom sposobnošću rasta prevladavaju, rezultirajući određenom genotipskom i fenotipskom uniformnošću u populaciji (Khanal, 2017) . Stanice se obično dijele ograničen broj puta prije gubitka sposobnosti za proliferaciju čime dolazi do starenja stanice. Takve stanične linije nazivaju se konačnim, one imaju određen broj ciklusa reprodukcije nakon čega se više ne mogu dijeliti i odumiru. Međutim, neke stanične linije mogu postati besmrtni procesom transformacije, koji se može dogoditi spontano ili se inducirati virusom i kemijski. Kada se konačna stanična linija transformira, ona posjeduje sposobnost beskonačne diobe i postaje kontinuirana stanična linija. Kontinuirane stanične linije mogu rasti pri većim gustoćama, brže rastu, imaju sposobnost rasta u suspenziji i nemaju ograničen broj staničnih dijeljenja (Freshney, 2010) . Jednom uspostavljena kultura se može uzgajati sve dok ne postane

ograničena nekim od parametara uzgoja. Uvjeti za rast kultura znatno se razlikuju za svaki tip stanica, ali umjetno okruženje u kojem se stanice uzgajaju uključuje prikladnu posudu koja sadrži podlogu ili medij koji sadrži osnovne hranjive tvari (aminokiseline, ugljikohidrate, vitamine, minerale), faktore rasta, hormone i plinove (O_2 , CO_2), te regulira fizikalno-kemijsko okruženje (pH, osmotski tlak, temperatura). Stanice u kulturi se mogu uzgajati adherentno ili suspenzijski. Adherentne stanice pričvršćene su na čvrstu ili polučvrstu podlogu čime se omogućava njihov rast i proliferacija, dok stanice koje rastu u suspenziji plutaju u kultivacijskom mediju i nisu ovisne o podlozi (Supriya, 2017).

Stanična kultura je jedan od glavnih alata koji se koriste u staničnoj i molekularnoj biologiji i predstavlja odličan model za proučavanje fiziologije i biokemije stanice, učinaka lijekova i toksičnih spojeva, te mutageneze i karcinogeneze. Također, koriste se u testiranju i razvoju lijekova, te u industrijskoj proizvodnji biofarmaceutika. Tako npr. prednosti korištenja u istraživanjima učinaka različitih tvari uključuju dostupnost različitih medija za uzgoj, jednostavno određivanje DNA profila, manja količina potrebnih reagensa, manja potreba za pokusnim životinjama te visoka reproducibilnost rezultata. Međutim, dugotrajni i kontinuirani *in vitro* uzgoj može dovesti do neizbježnih promjena u genetičkoj i fenotipskoj stabilnosti. Također, kao posljedica nedostatka određenih nutrijenata u hranjivom mediju ili nakupljanja određenih nusproizvoda, moguće su promjene biokemijskih karakteristika i enzimske aktivnosti stanice.

2.1.1 Medij za uzgoj životinjskih stanica

Medij za uzgoj je najvažnija komponenta kultivacijskog okruženja jer pruža potrebne hranjive tvari, faktore rasta i hormone za rast stanice, te regulira pH i osmotski tlak u kulturi. Prilikom *in vitro* uzgoja životinjskih stanica, ključno je osigurati uvjete što sličnije onima u odgovarajućem *in vivo* sustavu. To podrazumijeva manipulaciju fizikalno-kemijskim parametrima (pH vrijednost, koncentracija kisika i CO_2 , optimalna temperatura, osmotski tlak, viskoznost) te osiguravanje dovoljnih količina svih nutrijenata neophodnih za normalan rast, proliferaciju i održavanje stanica kroz više generacija (Slika 1).



Slika 1. Parametri koji utječu na rast, proliferaciju i ekspresiju funkcija in vitro kultura stanica (Lindl i Gstraunthaler, 2008) .

Kvaliteta hranjivog medija, čiji sastav je jedan od najvažnijih faktora za uspješan uzgoj životinjskih stanica u kulturi, ima ključnu ulogu u tom procesu. Najvažnije komponente hranjivog medija su: ugljikohidrati, aminokiseline, anorganske soli, antibiotici, vitamini i minerali, te serum. Glavni izvor energije i preteča za biosintezu staničnih komponenti je glukoza (izvor ugljika) , a obično se početna koncentracija glukoze u mediju kreće oko 10-25 mM. Aminokiseline su sirovina koju stanica koristi za sintezu proteina, u hranjivi medij se uvijek dodaju esencijalne aminokiseline (arginin, cistein, glutamin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan, tirozin i valin) , a ovisno o potrebama stanične linije i neesencijalne aminokiseline. Glutamin ima važnu ulogu u procesu metabolizma stanica , osim što predstavlja izvor purina i pirimidina, bitan je za sintezu mono- , di- i trifosfatnih glikozida. Anorganske soli imaju važnu ulogu u održavanju ionske ravnoteže i osmotskog tlaka u mediju, a također djeluju kao koenzimi u enzimskim reakcijama. Među najčešćim anorganskim solima koje se dodaju u medij su: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , i HCO_3^- . Vitamini se dodaju u relativno malim količinama i djeluju kao koenzimi ili proteolitičke skupine u procesima staničnog metabolizma, većina vitamina se dobiva iz seruma, dok se u mediju uglavnom nalaze vitamini iz B skupine (nikotinamid, pantotenska kiselina, piridoksin, riboflavin, folna kiselina i biotin) . Također, dodatkom seruma zadovoljena je potreba stanica

za mineralima, a ako koncentracija seruma nije dovoljna, dodaju se elementi u tragovima kao što su Fe, Zn i Se. Kako bi se spriječila kontaminacija, u medij se po potrebi dodaju antibiotici poput penicilina i streptomycina.

Tri osnovne vrste medija su bazalni medij, medij sa smanjenom količinom seruma i medij bez seruma. Serum je iznimno važan izvor faktora rasta i adhezije, hormona, lipida i minerala za uzgoj stanica u bazalnim medijima. Osim toga, serum također regulira propusnost stanične membrane i služi kao nosač lipida, enzima, mikronutrijenata i elemenata u tragovima u stanicu. Upotreba seruma ima i određene nedostatke kao što su visoki troškovi, problemi sa standardizacijom, specifičnost, varijabilnost i nepoželjne učinke poput poticanja ili inhibicije rasta i/ili funkcije stanica u određenim kulturama stanica. Ako serum ne potječe iz pouzdanih izvora, može doći do kontaminacije (Thermo Fisher Scientific, 2020) . Većina staničnih linija dobro raste u bazalnim medijima, međutim kako bi se izbjegli nepoželjni učinci seruma koriste se mediji sa smanjenom količinom seruma. Oni su obogaćeni hranjivim tvarima i faktorima rasta životinjskog podrijetla, što smanjuje količinu seruma koju je potrebno dodati u medij. Korištenjem medija bez seruma izbjegavaju se problemi povezani s upotrebom životinjskih seruma. Jedna od glavnih prednosti korištenja medija bez seruma je mogućnost selektivnosti medija za određene stanične vrste odabirom odgovarajuće kombinacije faktora rasta (Thermo Fisher Scientific, 2020) . Najčešće se primjenjuje goveđi serum, a za uzgoj određenih stanica mogu se koristiti ljudski serum i konjski serum. Prilikom uzgoja stanica potrebno je osigurati optimalnu pH vrijednost medija kako bi se osiguralo održavanje i normalan rast stanica. Tijekom rasta stanica može doći do pada pH vrijednosti što obično ukazuje na nakupljanje mliječne kiseline, koja je nusprodukt staničnog metabolizma i može biti toksična za stanice. Brzina promjene pH vrijednosti uglavnom ovisi o koncentraciji stanica, pri čemu kulture s visokom koncentracijom stanica brže iscrpljuju medij od kultura s nižom koncentracijom stanica.

Kod *in vitro* uzgoja životinjskih stanica, važno je imati na umu da različite stanice zahtijevaju različite uvjete uzgoja kako bi se osigurao optimalan rast i održavanje stanica. Stoga, postoje različite vrste medija za uzgoj, od kojih su najčešće korišteni: BME (*Basal Medium Eagle's*), EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*), DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*) i IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*). BME medij koji je razvio Harry Eagle, najjednostavniji je od osnovnih medija i sadrži sve esencijalne komponente potrebne za rast stanica. EMEM u odnosu na BME sadrži veću koncentraciju aminokiselina, a zbog toga što ne sadrži proteine, lipide i faktore rasta, često je potreban dodatak fetalnog goveđeg seruma.

DMEM je varijacija EMEM-a, te sadrži približno četiri puta više vitamina i aminokiselina u odnosu na originalnu formulu, kao i nekoliko puta više glukoze. Originalna formulacija DMEM-a sadrži nisku koncentraciju glukoze i natrijev piruvat, a danas je dostupan u različitim formulacijama, uključujući one sa većom koncentracijom glukoze i sa ili bez natrijeva piruvata (Barnes i sur., 1984) .

2.2 Mišićne stanice

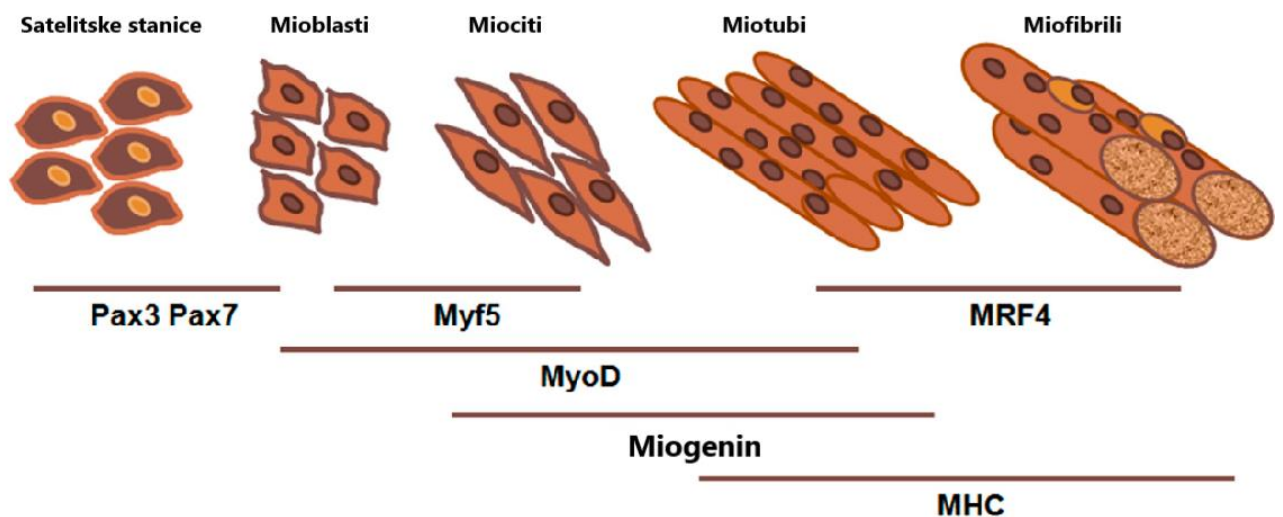
Mišićne stanice su osnovne strukturne jedinice mišićnog tkiva, te se prema njihovoj ulozi dijele na: kardiomiocite, mišićne stanice skeletnih mišića i mišićne stanice glatkog mišićnog tkiva. Njihova funkcija je osiguravanje stabilnosti i sposobnosti kontrakcije, što nam omogućava pokretanje tijela.

Kardiomiociti su osnovne stanice srčanog mišića i odgovorne su za kontraktilna svojstva srca, odnosno pumpanje krvi kroz tijelo. Za razliku od skeletnog mišića, srčani mišić se ne može voljno kontrolirati, te sam stimulira kontrakcije, dok signali iz mozga samo utječu na brzinu kontrakcija.

Skeletni mišići čine najveći dio mase ljudskog tijela, to su poprečno-prugasti mišići organizirani u sarkomere povezane s kostima putem tetiva. Kontrakcija skeletnih mišića je pod našom svjesnom kontrolom, a pokreću ju signali koji dolaze iz mozga. Glatko mišićno tkivo se nalazi u stijenkama šupljih organa kao što su želudac, crijeva, mokraćni mjehur i krvne žile. Njegova uloga je kontrakcija tih organa što omogućuje pokretanje hrane kroz gastrointestinalni trakt, vraćanje krvi do srca i obavljanje mnogih drugih funkcija bez utjecaja volje.

Mišićne stanice nastaju u procesu miogeneze odnosno formiraju se fuzioniranjem i elongacijom brojnih prekursorskih stanica koje se nazivaju mioblasti. Daljnjim spajanjem miocita nastaju višejezgreni miotubuli koji sazrijevaju u zrela mišićna vlakna. Do ovog procesa dolazi tijekom embrionalnog razvoja organizma, kao i tijekom popravka i regeneracije mišića kod odraslog organizma. Mišićno tkivo ima sposobnost regeneracije, iako se sastoji od visoko diferenciranih mišićnih vlakana s periferno smještenim postmitotskim jezgrama. Jezgre postojećih mišićnih stanica nemaju mogućnost diobe kojom bi nastali novi mionukleusi, a zatim i novi segmenti mišićnog vlakna. Stanice smještene između sarkoleme i bazalne membrane mišićnog vlakna mogu se regenerirati, a zbog takvog perifernog položaja nazivaju se satelitske stanice. One još sudjeluju u rastu skeletnog mišićnog tkiva, u njegovom

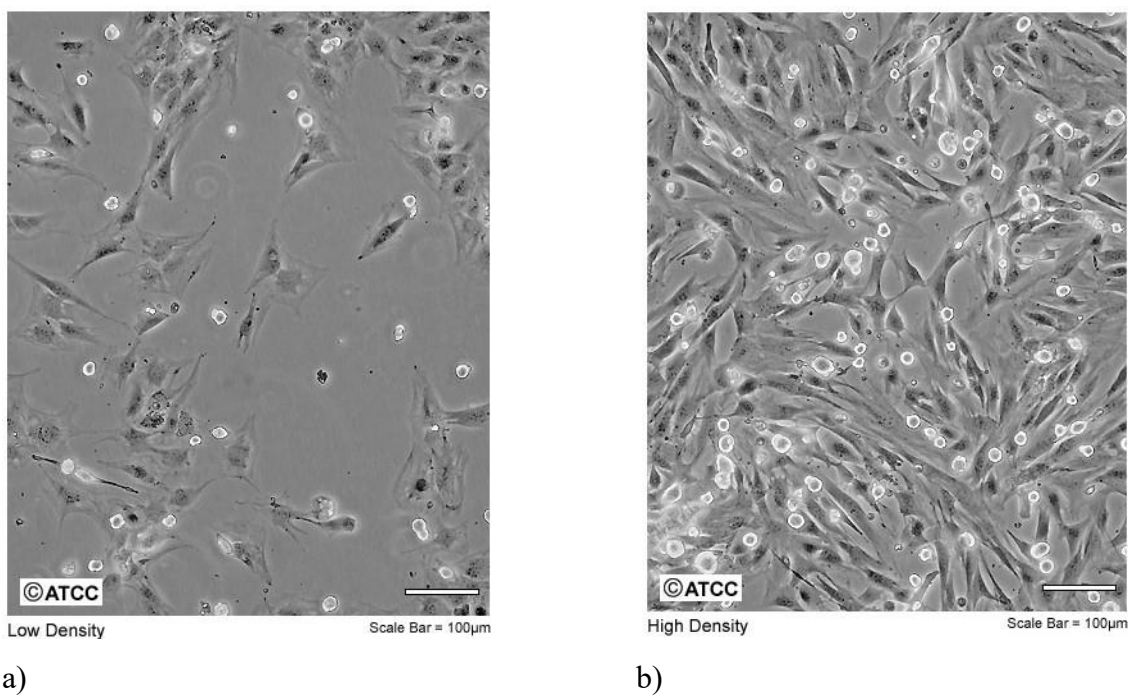
remodeliranju i održavanju, te imaju sposobnost samoobnavljanja čime održavaju vlastitu populaciju. Satelitska stanica je mitotski mirna stanica, a može biti aktivirana traumom, bolešću ili nekim promijenjenim stanjem. Nakon aktivacije dolazi do proliferacije kojom nastaju mononuklearne mišićne prekursorne stanice. Završetkom proliferacije nastupa diferencijacija mioblasta i njihovo međusobno spajanje, čime nastaje novo mišićno vlakno koje postupno postaje zrelo te sadrži periferne postmitotičke jezgre. Gotovo sve mirne satelitske stanice eksprimiraju transkripcijski faktor Pax7 koji se koristi kao i njihov marker. Nakon aktivacije satelitskih stanica pokreće se proces miogeneze aktivacijom miogenih transkripcijskih čimbenika koji se pojavljuju i tijekom razvojne miogeneze. Miogenetski regulacijski čimbenici ključni su u determinaciji i diferencijaciji skeletnog mišića, to su proteini koji se heterodimenzioniraju s E proteinima i u obliku kompleksa se vežu na određenu sekvencu DNA. Na taj način dolazi do aktivacije transkripcije gena specifičnih za mišiće. Ovoj grupi čimbenika pripadaju myf5 (engl. *myogenic factor 5*), myoD (engl. *myogenic differentiation*), miogenin i MRF4 (engl. *myogenic regulatory factor*). Istraživanja provedena na genetski modificiranim miševima i na mišićnim staničnim linijama pokazale su da su transkripcijski čimbenici myf5 i myoD determinacijski čimbenici koji određuju razvoj stanica u smjeru mišićne stanice, dok preostala dva regulacijska čimbenika, miogenin i MRF4, sudjeluju u procesu diferencijacije mioblasta i aktivaciji gena za formiranje miotuba i miofibrila. (Slika 2). Brojni signali iz neposredne okoline satelitske stanice kao i intrinzični regulatori određuju hoće li satelitska stanica ostati u mirnom stanju, krenuti u samoobnavljanje ili u stvaranje mioblasta.



Slika 2. Proces diferencijacije skeletnih mišića (Cervelli i sur., 2018.)

2.3 Stanična linija C2C12

C2C12 stanice su mononuklearni mioblasti odnosno odrasle mišje matične stanice mišića koje se izoliraju nakon ozljede kako bi se potaknula regeneracija mišića. Ova stanična linija se primjenjuje u farmaceutskim i biološkim istraživanjima, te za proučavanje miogeneze *in vitro*. Stanice su vretenastog oblika i potječu iz linije C2 primarnih staničnih kultura miševa C-3H starosti 2 mjeseca. Prije postupka izdvajanja mioblasta, stvaraju se ozljede na mišićima pomoću pinceta kako bi se potaknula njihova regeneracija (Yaffe i Saxel, 1977) . C2C12 mioblasti eksponencijalno proliferiraju u odgovarajućim uvjetima rasta pri nižoj gustoći stanica (Slika 3a) , a nakon konfluencije, stanice mogu diferencirati u miocite i višejezgrene miotubule, te taj proces može biti ubrzan inkubacijom u uvjetima niske koncentracije seruma (Cheng i sur., 2014) .



Slika 3. C2C12 stanična linija pod inverznim mikroskopom; a) niska gustoća rasta, b) visoka gustoća rasta (ATCC, 2023)

Stanice je potrebno držati u prikladnim uvjetima kako ne bi izgubile svoje mioblastične karakteristike. Pri visokoj gustoći stanica i prekomjernoj konfluenciji, stanice mogu smanjiti sposobnost proliferacije te postupno poticati diferencijaciju u miocite, rezultirajući heterogenom populacijom koja može dalje utjecati na uvjete kulture tijekom bioloških istraživanja (Cornelison, 2008) . Promjenom uvjeta uzgoja C2C12 stanica, iz medija s 10 %

fetalnog goveđeg seruma u medij s 2 % konjskog seruma, dolazi do završetka staničnog ciklusa i početka faze diferencijacije te fuzije mioblasta u višejezgrene miotube (Yaffe i Saxel, 1977) .

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) , Sigma, St. Louis, SAD
- FBS (*Fetal Bovine Serum*) , Gibco BRL, SAD
- HS (*Horse Serum*) , Capricorn Scientific, Njemačka
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Kristal-ljubičasto, Kemika, Zagreb, RH
- Tripin-plavo, Sigma, St. Louis, SAD
- Tripsin-EDTA, Sigma, St. Louis, SAD

3.1.2 Otopine i puferi

- PBS pufer (pH=7,4)

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,4318 g
Kalij dihidrogenfosfat	0,2372 g
Destilirana voda	Do 1000 mL

3.1.3 Uređaji i oprema

- Hladnjak (4 °C i -20 °C) , Gorenje, Slovenija
- Hladnjak (-80 °C) , DirectFREEZE -86 °C, ULTRA LOW, Nuve, Turska
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂ , Iskra PIO, Slovenija
- Komora za sterilni rad (*laminar flow cabinet*) , Kambič, Slovenija

- Laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, kivete, epruvete)
- Neubauerova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright - Line, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, Thermo Scientific BioLite, SAD
- Ploče s jažicama, Corning, SAD
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

3.1.4 C2C12 stanična linija

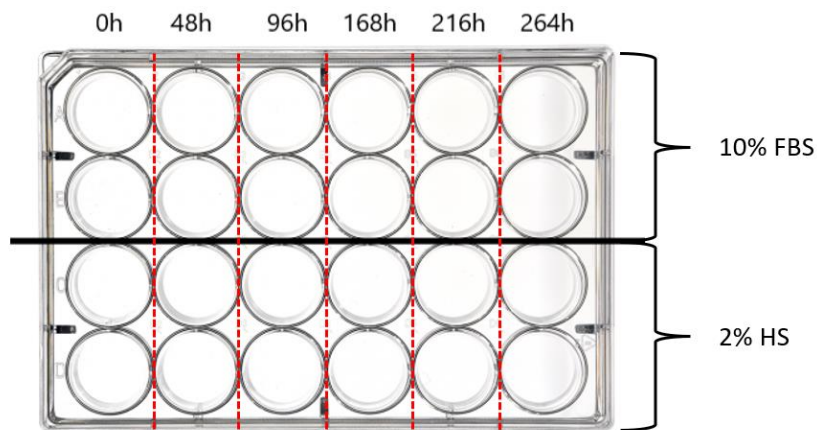
U izradi ovog rada korištena je C2C12 stanična linija koja je adherentna, tj. tijekom rasta se prihvaća za podlogu. Stanična linija nabavljena je iz banke stanica *American Type Cell Collection* (ATCC) i ima sposobnost diferencijacije u mišićne stanice *in vitro*. Prema uputama dobavljača, stanice je potrebno čuvati smrznute na temperaturi nižoj od -130 °C, a prilikom primjene u istraživanjima, potrebno ih je držati u potpunom DMEM mediju sa goveđim serumom (FBS) za što veću vijabilnost stanica, koji se također priprema prema uputama dobavljača. Nakon što stanice postignu konfluenciju od 60-70 %, medij za uzgoj se zamjenjuje medijem koji sadrži 2 % konjskog seruma čime se započinje diferencijacija stanica.

3.2 Metode rada

3.2.1 Uzgoj C2C12 stanica

Stanice C2C12 uzgajaju se u inkubatoru pri 37 °C s kontroliranom atmosferom CO₂. Čuvaju se u hladnjaku na temperaturi nižoj od -130 °C, a uzgoj započinje njihovim odmrzavanjem. Ampulu sa stanicama najprije je potrebno odmrznuti u vodenoj kupelji na 37 °C tijekom 2 minute, zatim se odmrznuti sadržaj ampule sterilno prebacuje u kivetu koja sadrži 9 mL kompletnog medija za uzgoj C2C12 stanica . Da bi se uklonio medij za zamrzavanje, suspenzija se centrifugira 5-7 minuta pri 125 x g. Nakon centrifugiranja, supernatant se ukloni, a talog stanica se resuspendira u mediju za uzgoj. Takva suspenzija stanica se sterilno prebacuje u T-boce i stavlja u inkubator. Za vrijeme uzgoja stanice će se prihvatiti za podlogu odnosno dno T-boce, što je pod mikroskopom vidljivo kao izduživanje stanica. Tijekom uzgoja važno je kontinuirano provjeravati izgled stanica i izgled hranjivog medija, koji je ružičaste boje, a promjena boje medija može ukazivati na kontaminaciju. Također, potrebno je redovito mijenjati stari medij, u kojem su potrošene hranjive tvari, za svježiji medij kako bi stanice mogle normalno rasti. Stanice se uzgajaju sve dok ne prekriju cijelu površinu, a onda se moraju precijepiti.

Precijepivanje se vrši na način da se prvo ukloni medij iz T-boce, te se stanice isperu PBS-om kako bi se uklonili ostatci medija koji sadrži tripsin inhibitor. Zatim se ukloni PBS i dodaje tripsin, tako da prekrije cijelu površinu boce. T-boca se stavlja u inkubator na 5 do 10 minuta, nakon čega se pod inverznim mikroskopom provjerava jesu li se stanice odvojile od površine odnosno zaokružile se. Ako jesu, u T-bocu se dodaje medij sa serumom kako bi se spriječilo daljnje djelovanje tripsina tj. oštećenje stanica. Nadalje, stanice se izbroje u Neubauerovoj komorici i nacijepu u 2 ploče s 24 jažice u početnoj koncentraciji od 3×10^4 st/mL. Uzgoj stanica se provodi u 2 različita medija, dio se uzgaja u mediju koji sadrži 10 % fetalnog goveđeg seruma, a dio u mediju za diferencijaciju koji sadrži 2 % konjskog seruma (Slika 4) . Medij se mijenja svakih 48 sati, te se tijekom uzgoja prate promjene u broju stanice i morfološke promjene stanica kroz 48, 96, 168, 216 i 264 sati.



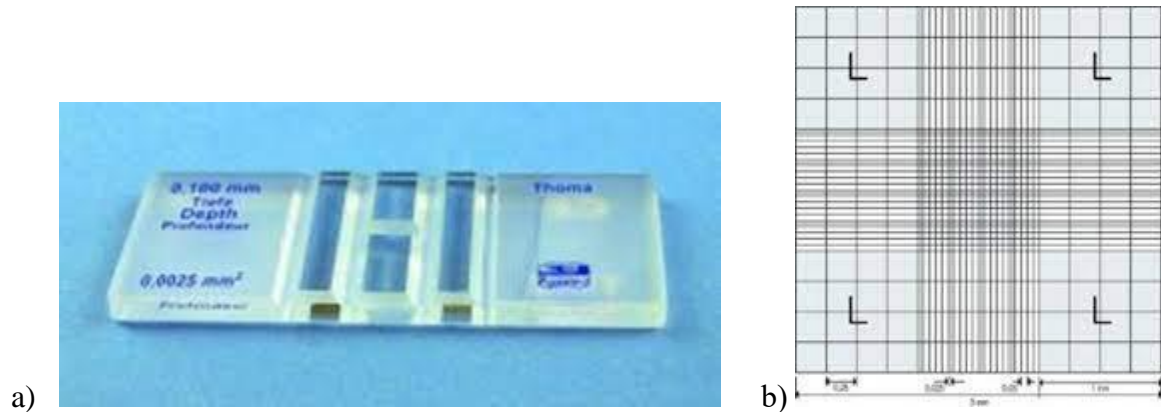
Slika 4. Prikaz ploča s 24 jažice tijekom uzgoja stanica u mediju za proliferaciju i mediju za diferencijaciju (vlastita izrada)

3.2.2 Brojanje stanica metodom tripan-plavo

Metoda brojanja stanica tripan plavo omogućuje razlikovanje živih i mrtvih stanica. Temelji se na činjenici žive stanice imaju funkcionalnu staničnu membranu kroz koju ne prolazi boja za razliku od mrtvih stanica čija membrana više nije funkcionalna i time nije selektivna za prolazak boje. Prije brojanja stanica potrebno je provesti odvajanje stanica od podloge tj. tripsinizaciju. Najprije se ukloni medij za uzgoj, zatim se stanice ispiru PBS-om i dodaje se 100 μL tripsina. Nakon dodatka tripsina stanice se stave u inkubator na 2-3 minute te se pod inverznim mikroskopom provjeri jesu li se stanice odvojile od dna ploče. Kada se stanice odvoje od površine, dodaje se 400 μL medija za uzgoj. Brojanje se provodi na način da se suspenzija stanica prvo dobro resuspendira kako bi broj stanica po cijelom volumenu suspenzije bio reprezentativan, zatim se uzima uzorak od 20 μL , koji se pomiješa sa 20 μL boje tripan plavo. Dobivena obojena suspenzija se nanosi na Neubauerovu komoricu (Slika 5. a) na koju je već položeno pokrovno stakalce te se gledaju stanice kroz svjetlosni mikroskop. Neubauerova komorica ima četiri velika kvadrata koji se nalaze izvan iscrtanog polja u obliku križa (Slika 5. b) . Svaki veliki kvadrat sastoji se od šesnaest malih kvadrata, a kada se stanice izbroje u sva 4 velika kvadrata zasebno, uzima se srednja vrijednost broja stanica te se koncentracija stanica u suspenziji računa prema formuli:

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

Stanice se broje u dva paralelna uzorka svakog od uzoraka i uzima se njihova srednja vrijednost kao konačan broj stanica po mililitru.



Slika 5. a) Neubauerova komorica, b) mreža komorice (KEFO Croatia, 2022)

3.2.3 Bojanje stanica bojom kristal-ljubičasto

Kristal-ljubičasto je boja koja je po sastavu organska kloridna sol, te ima široku primjenu u biološkim i industrijskim područjima, uključujući vizualizaciju otisaka prstiju, kao antifungalno i antibakterijsko sredstvo, te za bojanje histoloških preparata. Prilikom smrti adherentnih stanica dolazi do njihovog odvajanja od površine ploče za uzgoj, te se na temelju ove karakteristike može neizravno kvantificirati smrt stanica i utvrditi razlika u proliferaciji nakon tretiranja agensima koji induciraju smrt. Boja kristal-ljubičasto se veže na proteine i DNA adherentnih stanica, čime se omogućava njihova vizualizacija. Prilikom bojanja C2C12 stanica bojom kristal-ljubičasto, najprije je potrebno ukloniti medij za uzgoj, zatim isprati stanice PBS-om i dodati boju. Stanice se stave u inkubator 5 minuta, a nakon inkubacije se ponovno ispiru PBS puferom kako bi se uklonio višak boje. Kad smo isprali boju, stanice je moguće promatrati pod inverznim mikroskopom.

3.2.4 Obrada rezultata

Određivanje specifične brzine rasta (μ)

Specifična brzina rasta stanica (μ) opisana je izrazom:

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

x – masa stanica

dx – povećanje biomase stanica

dt – vremenski interval

μ je konstantna u log fazi, a približno vrijedi i za fazu usporenog rasta pa vrijedi jednačina:

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

S obzirom da je masa proporcionalna broju stanica, onda je:

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

N – broj stanica u 1 mL na kraju log faze

N_0 – broj stanica u 1 mL na početku log faze

Δt – vremenski interval (h)

Određivanje vremena udvostručenja stanica (t_D)

Vrijeme udvostručenja stanica (t_D) računa se prema izrazu:

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

μ – specifična brzina rasta (h^{-1})

Određivanje prinosa stanica

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

Podaci su obrađeni statistički u Excelu i prikazani su kao standardna devijacija i srednja vrijednost, koji se računaju prema sljedećim formulama:

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

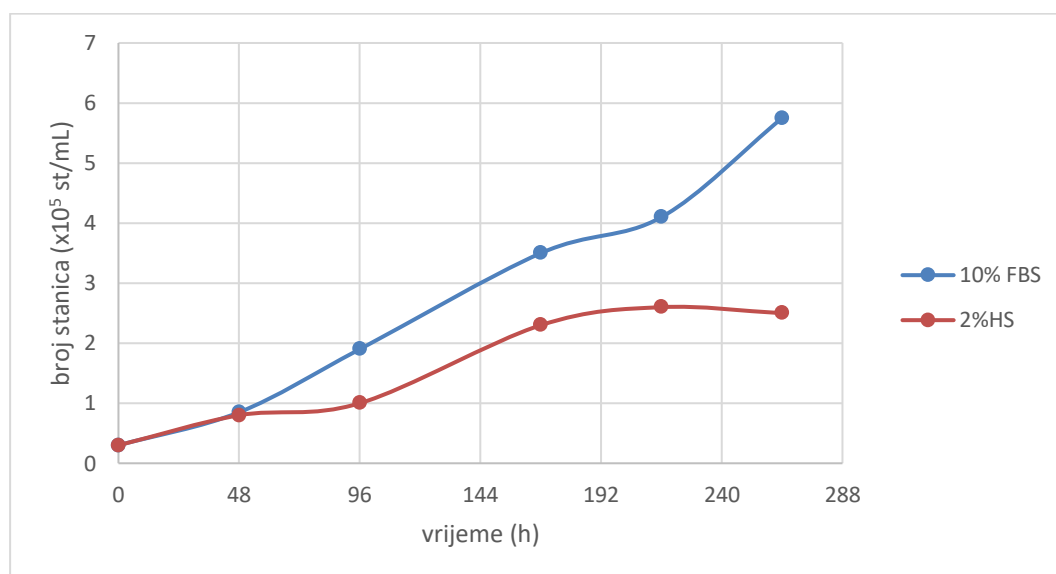
Standardna devijacija: $\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$

4 REZULTATI I RASPRAVA

C2C12 stanična linija se lako uzgaja i diferencira u kulturi stanica, te se zbog toga koristi kao modelni sustav za proučavanje rasta i diferencijacije mišića. U procesu razvoja stanica postoje dvije faze – proliferacija i diferencijacija. Tijekom uzgoja C2C12 stanica u prisutnosti fetalnog goveđeg seruma (FBS), stanice su visoko proliferativne jer FBS sadrži faktore za proliferaciju. Da bi C2C12 stanice diferencirale, potrebno je usporiti njihovu proliferaciju i prebaciti ih u stanje diferencijacije. To zahtijeva prelazak iz serumom bogatog medija na manje bogati medij nakon što stanice dosegnu 60-70 % konfluencije. Medij za diferencijaciju C2C12 stanica sadrži 2 % konjskog seruma, te najprije dolazi do diobe mioblasta koji se potom izdužuju i fuzioniraju. Cilj ovog rada bio je praćenje rasta i usporedba morfoloških promjena C2C12 stanica u medijima za proliferaciju i diferencijaciju.

4.1 Dinamika rasta C2C12 stanica u mediju za proliferaciju i diferencijaciju

Tijekom ovog eksperimenta, praćena je dinamika rasta C2C12 stanica u mediju za proliferaciju i diferencijaciju tijekom 264 sati brojanjem stanica metodom tripan plavo. Stanice su brojane u dva paralelna uzorka svakih 48 sati (Slika 6).



Slika 6. Krivulje rasta C2C12 stanica u mediju za proliferaciju i diferencijaciju tijekom 264 sati uzgoja

Na temelju krivulja rasta C2C12 stanica u mediju za proliferaciju i diferencijaciju izračunati su specifična brzina rasta, vrijeme udvostručenja te prinos stanica (Tablica 1.) .

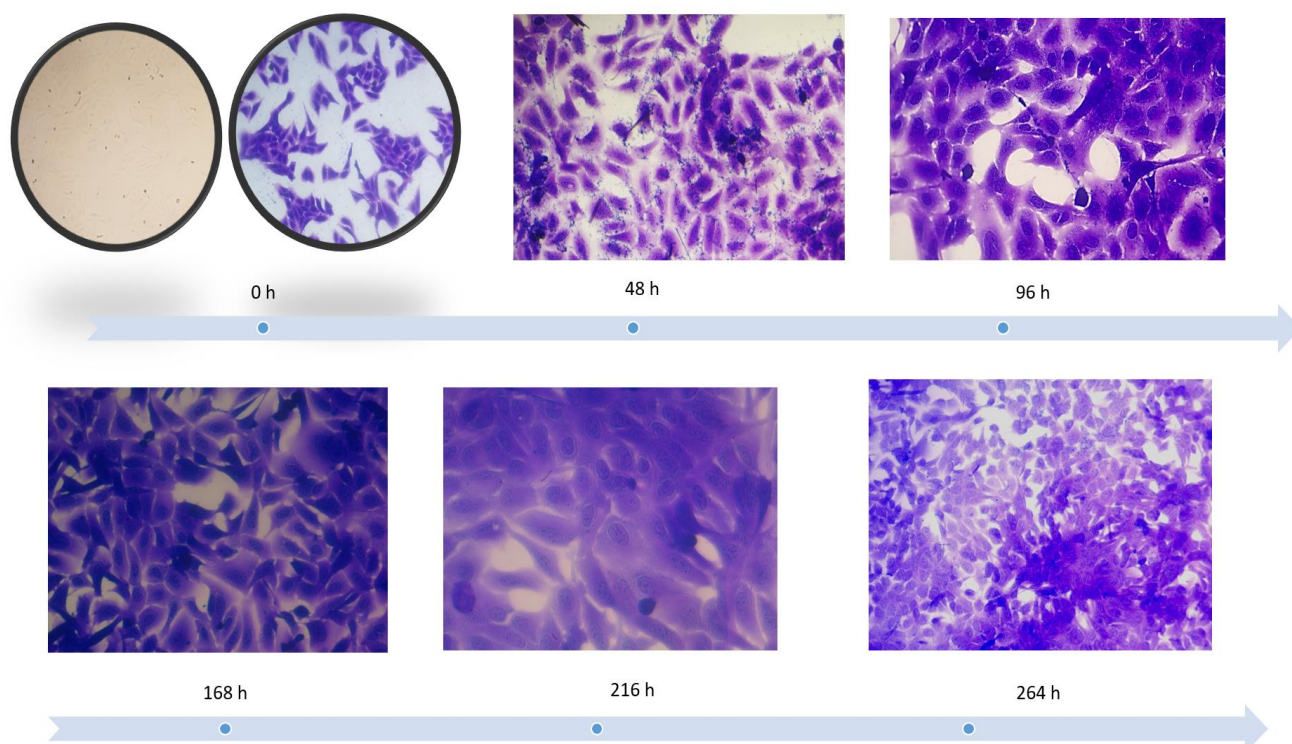
Tablica 1. Parametri rasta C2C12 stanica u mediju za proliferaciju i diferencijaciju tijekom 264 sati uzgoja

Uzorak	μ (h⁻¹)	t_d (h)	prinos x 10⁴ (st)
Medij za proliferaciju	0,0125	55,4	54,3
Medij za diferencijaciju	0,0173	39,6	21

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da stanice koje su rasle u mediju s 2 % konjskog seruma imaju veću specifičnu brzinu rasta u usporedbi sa stanicama koje su rasle u mediju za proliferaciju, ali u konačnici ostvaruju 2,5x niži ukupni prinos stanica. Niži ukupan prinos stanica u mediju za diferencijaciju je u skladu s karakteristikama C2C12 stanica koje kada se iz medija za proliferaciju prebace u medij za diferencijaciju završavaju stanični ciklus rasta i započinju diferencijaciju te fuziju mioblasta u višejezgrene miotube (Yaffe i Saxel, 1977) .

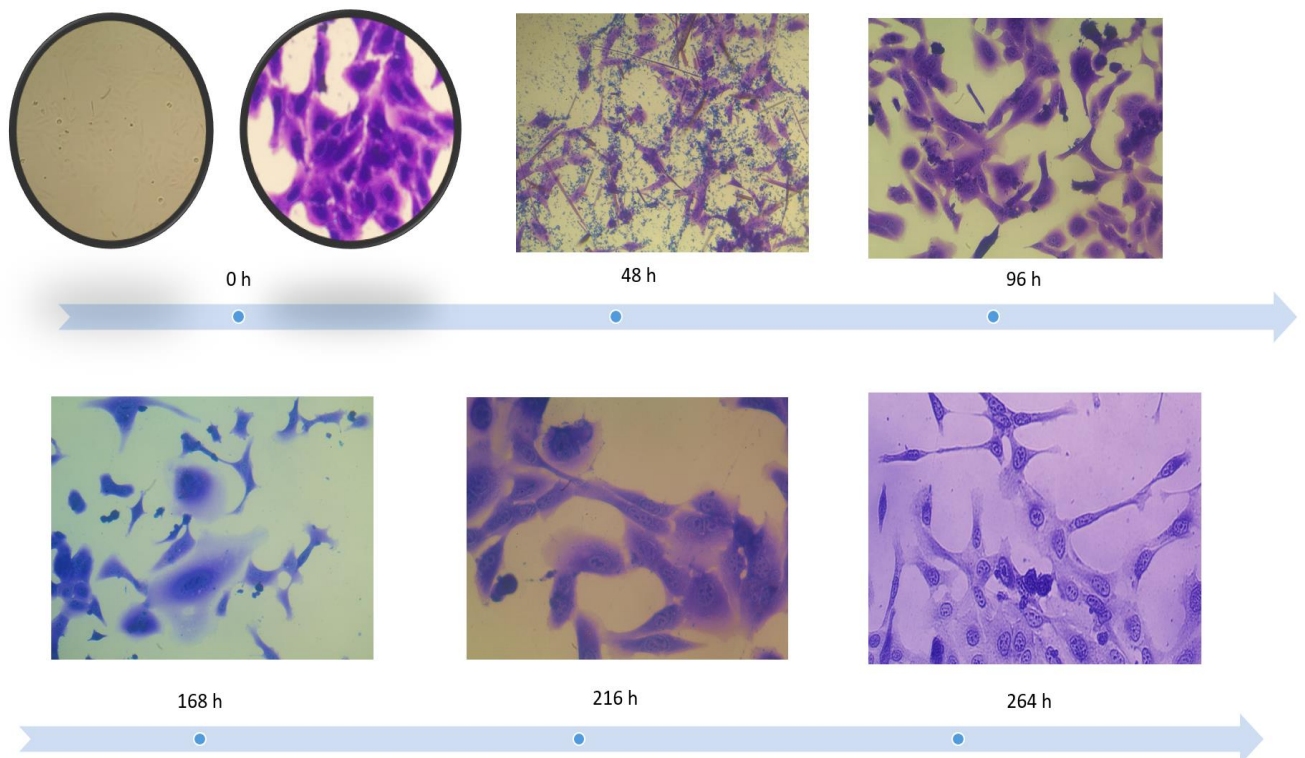
4.2 Morfološke promjene C2C12 stanica u mediju za proliferaciju i diferencijaciju

U svrhu praćenja morfoloških promjena C2C12 stanica tijekom procesa proliferacije i diferencijacije, stanice su vizualizirane odnosno obojane bojom kristal-ljubičasto, nakon čega su fotografirane pod inverznim mikroskopom koji je opremljen digitalnom kamerom (Slike 7 i 8).



Slika 7. Morfološke promjene C2C12 stanica u mediju za proliferaciju tijekom 264 sati uzgoja

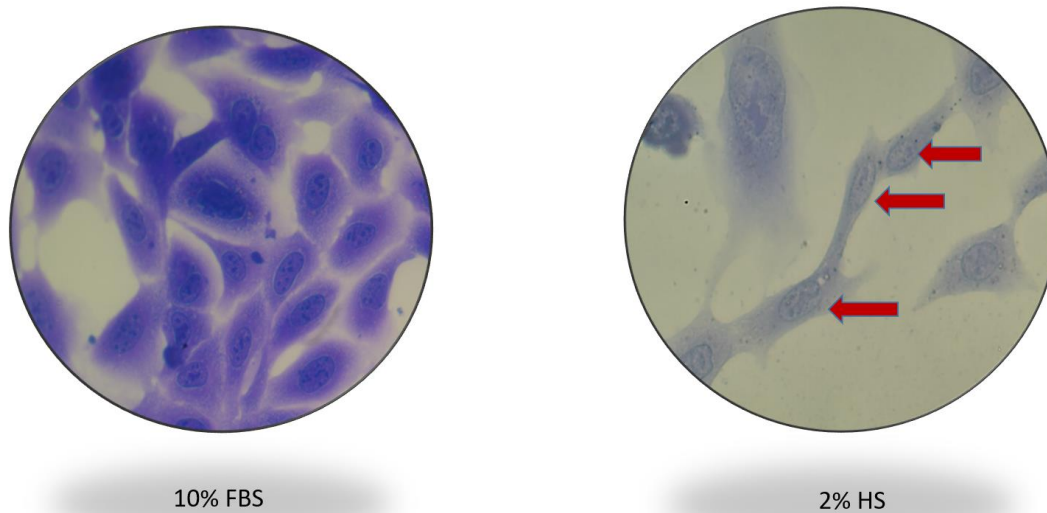
Uzgojem stanica u mediju koji sadrži 10 % fetalnog goveđeg seruma dolazi do proliferacije stanica, odnosno njihovog rasta i diobe, koja rezultira povećanjem broja stanica. Na slici 7 tj. pojedinačnim fotografijama vidljiv je kontinuirani porast broja stanica i njihove gustoće od trenutka naciepljivanja stanica pa do kraja uzgoja koji je iznosio 264 sati. Stanice su karakteristične mioblastne morfoloije s pojedinačnim jezgrama koje su smještene centralno tj. unutar stanice.



Slika 8. Morfološke promjene C2C12 stanica u mediju za diferencijaciju tijekom 264 sati

Usporedbom morfologije C2C12 stanica u mediju za diferencijaciju na početku uzgoja i nakon 264 sati, vidljivo je da je došlo do promjene morfologije tj. izduživanja stanica i nastanka diferenciranih miotuba. Veličina i duljina miotuba se kontinuirano povećavala, te je fuzioniranjem došlo do nastanka višejezgrenih miotuba karakteristične vlaknaste strukture. Odvijanjem diferencijacije i fuzije stanica, miotubi se izdužuju i postaju strukture bogate proteinima koje eksprimiraju miozin, α -aktin, troponin i druge komponente mišićno-kontraktilnog sustava. (Veliča i Bunce, 2011) .

Usporedba morfologija C2C12 stanica koje su rasle u mediju za proliferaciju i mediju za diferencijaciju nakon 168 sati uzgoja prikazana je na Slici 9.



Slika 9. Usporedba morfologija C2C12 stanica u mediju za proliferaciju i diferencijaciju tijekom 168 sati uzgoja

Nakon 168 sati uzgoja C2C12 stanica u dva različita medija vidljive su razlike u strukturi odnosno morfologiji. Stanice koje su rasle u mediju za proliferaciju tj. mediju koji sadrži 10 % FBS mioblastnog su oblika, s pojedinačnim jezgrama i produljenim citoplazmatskim izdancima. Ovaj oblik stanica je tipičan za proliferacijsku fazu, jer je medij za uzgoj formuliran kako bi podržao brzu diobu stanica. S druge strane, C2C12 stanice koje su rasle u mediju za diferencijaciju pokazuju promjene u morfologiji. Diferencirane stanice oblikuju se u višejezgrene miofibrile, koje su izduženije i imaju karakterističnu vlaknastu strukturu .

5 ZAKLJUČCI

1. Tijekom uzgoja C2C12 stanica u mediju za proliferaciju postignut je prinos stanica od $54,3 \times 10^4$ stanica dok je u mediju za diferencijaciju postignut prinos od 21×10^4 stanica.
2. Uzgojem C2C12 stanica u mediju za proliferaciju koji sadrži 10 % fetalnog goveđeg seruma dolazi do rasta i diobe stanica koji rezultiraju povećanjem broja stanica uz zadržavanje mioblastne morfologije.
3. Uzgojem C2C12 stanica u mediju za diferencijaciju koji sadrži 2 % konjskog seruma dolazi do diferenciranja stanica i nastajanja višejezgrenih, izduženih miotuba karakteristične vlaknaste strukture.

6 POPIS LITERATURE

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.

Bischoff R (1989) Analysis of muscle regeneration using single myofibers in culture. *Med Sci Sports Exerc* **21**, 164-172.

Butler M (2004) Animal Cell Culture and Technology, 2. izd., Garland Science/Bios Scientific Publishers, New York.

Castilho LR, Moraes AM, Augusto EFP, Butler M (2008) Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy, Taylor & Francis, New York.

Cervelli M, Leonetti A, Duranti G, Sabatini S, Ceci R, Mariottini P (2018) Skeletal Muscle Pathophysiology: The Emerging Role of Spermine Oxidase and Spermidine. *Med Sci* **6**, 14. <https://doi.org/10.3390/medsci6010014>

Cheng H, Wang W, Wang X, Sheu SS, Dirksen RT, Dong MQ Cheng *et al.* (2014) *Nature* **514**, 14-15. <https://doi.org/10.1038/nature13859>

Danielson KG, Oborn CJ, Durban EM, Medina D (1984) Epithelial mouse mammary cell line exhibiting normal morphogenesis *in vivo* and functional differentiation *in vitro*. *Proc Nat Acad Sci* **81**, 3756-3760. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.12.3756>

Davis JM (2011) Animal Cell Culture: Essential Methods. 1. izd., John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey.

Davis RL, Weintraub H, Lassar AB (1987) Expression of a single transfected cDNA converts

fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987-1000. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90585-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90585-X)

Franke J, Abs V, Zizzadoro C, Abraham G (2014) Comparative study of the effects of fetal bovine serum versus horse serum on growth and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts. *BMC Vet Res* **10**, 119. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-119>

Freshney IR (2010) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6. izd., John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey.

Gilbert SF (2000) *Developmental Biology*, 6. izd., Sinauer Associates, Sunderland

Jang M, 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**, 872. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04804-z>

Kailashiya J, Mukherjee A, Dash D (2017) Essentials of medical biochemistry: With clinical cases. *Ind J Med Res* **145**, 576–577. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.213764>

Lanza R (2004). *Handbook of Stem Cells, Volume 1: Embryonic Stem Cells*. 1. izd., Academic Press, Cambridge, Massachusetts.

Lindl T, Gstraunthaler G (2008) *Zell- und Gewebekultur Von den Grundlagen zur Laborbank*. 6. izd., Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.

Mauro A (1961) Satellite cell of skeletal muscle. *Journal of Biophy Bioch Cytol* **9**, 493-495. <https://doi.org/10.1083/jcb.9.2.493>

Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP (2002) Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Ann Rev Cell Develop Biol* **18**, 747-783. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.012502.105758>

Radošević K (2020) Kulture životinjskih stanica. *Kemija u industriji* **69**, 561-562.

Supriya N (2017) Animal Cell Culture. <https://biologyreader.com/animal-cell-culture.html>.
Pristupljeno 17. lipnja 2023.

Thermo Fisher Scientific (2020) Cell culture basics handbook

Thermo Fisher Scientific (2023) What is Fetal Bovine Serum. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-environment/culture-media/fbs-basics/what-is-fetal-bovine-serum.html>. Pristupljeno 17. lipnja 2023.

Velića P, Bunce C (2011) A quick, simple and unbiased method to quantify C2C12 myogenic differentiation. *Muscle Nerve* **44**, 366-370. <https://doi.org/10.1002/mus.22056>

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>

Yang Z, Xiong HR (2012) Culture Conditions and Types of Growth Media for Mammalian Cells, IntechOpen, London, England.

Izjava o izvornosti

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



Vlastoručni potpis