

Utjecaj deksametazona na rast i diferencijaciju stanične linije mišjih mišićnih stanica C2C12

Aleksandrović, Doris

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:159:614532>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Doris Aleksandrović
8006/BT**

**UTJECAJ DEKSAMETAZONA NA RAST I
DIFERENCIJACIJU STANIČNE LINIJE MIŠJIH
MIŠIĆNIH STANICA C2C12**

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
Prijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Utjecaj deksametazona na rast i diferencijaciju stanične linije mišjih mišićnih stanica C2C12
Doris Aleksandrović, 0058218084

Sažetak:

Deksametazon, sa svojim antiupalnim svojstvima, ima široku primjenu u medicini a danas se koristi i u protokolima za diferencijaciju mezenhimalnih stromalnih stanica. Njegov utjecaj na rast i diferencijaciju različitih vrsta stanica već je dugi niz godina predmet istraživanja. S obzirom na relativno mali broj istraživanja učinaka deksametazona na C2C12 stanice, cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj različitih koncentracija deksametazona na njihov rast i diferencijaciju. Tijekom eksperimenta stanice su tretirane deksametazonom u koncentracijama od 100 i 200 μM , te se pratio njegov utjecaj na rast i diferencijaciju C2C12 stanica tijekom 168 sati. Broj stanica određen je metodom tripan plavo, diferencijacija stanica je praćena mikroskopski bojanjem s bojom kristal-ljubičasto te su na kraju podaci statistički obrađeni. Dobiveni rezultati pokazuju da je broj stanica tretiranih sa 100 μM deksametazona tijekom 48 sati povećan za 10,14%, a nakon 96 sati za 2,97%, u odnosu na kontrolne stanice. S druge strane, tretman stanica s 200 μM deksametazona nakon 48 sati pokazuje smanjenje broja stanica od 24,32% , odnosno nakon 96 h smanjenje broja stanica je iznosilo 5, 41% u odnosu na kontrolne stanice. Morfološke karakteristike pokazuju da C2C12 stanice tretirane deksametazonom djeluju uže i izduženije od kontrolnih stanica. U svim uzorcima stanica mogu se uočiti pojedinačni diferencirani miotubi iako čak niti u kontrolnim stanicama nije došlo do potpune diferencijacije stanica u miotube. S obzirom da dobiveni rezultati u određenoj mjeri odstupaju od literaturnih podataka, potrebno je napraviti dodatna istraživanja utjecaja deksametazona na rast i diferencijaciju C2C12 stanica.

Ključne riječi: deksametazon, C2C12 stanice, kristal-ljubičasto, miotubi, proliferacija

Rad sadrži: 25 stranica, 9 slika, 2 tablice, 28 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. srpanj 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

The effect of dexamethasone on the growth and differentiation of mouse muscle cell line C2C12
Doris Aleksandrović, 0058218084

Abstract:

Dexamethasone, with its anti-inflammatory properties, has a wide range of applications in medicine and is now used in protocols for differentiation of mesenchymal stromal cells. Its impact on the growth and differentiation of various cell types has been the subject of research for many years. Due to the relatively limited number of studies on the effects of dexamethasone on C2C12 cells, the aim of this study was to determine the influence of different concentrations of dexamethasone on their growth and differentiation. During the experiment, cells were treated with dexamethasone at concentrations of 100 and 200 μM , and its effects on the growth and differentiation of C2C12 cells were monitored for 168 hours. The cell count was determined using the trypan blue method, cell differentiation was observed through microscopic staining with crystal violet and the data were statistically analyzed. The results showed that the number of cells treated with 100 μM dexamethasone increased by 10.14% after 48 hours and by 2.97% after 96 hours compared to control cells. On the other hand, treatment of cells with 200 μM dexamethasone resulted in a decrease in the number of cells by 24.32% after 48 hours, and a decrease of 5.41% after 96 hours compared to control cells. Morphological characteristics showed that C2C12 cells treated with dexamethasone appeared narrower and elongated compared to control cells. Individual differentiated myotubes could be observed in all cell samples, although even the control cells did not undergo complete differentiation into myotubes. Since the obtained results deviate to some extent from the literature data, further research is needed to determine the effects of dexamethasone on the growth and differentiation of C2C12 cells.

Keywords: dexamethasone, C2C12 cells, crystal-violet, myotubes, proliferation

Thesis contains: 25 pages, 9 figures, 2 tables, 28 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
2.2	MEDIJ ZA UZGOJ ŽIVOTINJSKIH STANICA 3
2.3	DIFERENCIJACIJA MIŠIĆNIH STANICA..... 6
2.4	DEKSAMETAZON..... 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 11
3.1.4	C2C12 STANIČNA LINIJA 11
3.2	METODE RADA..... 12
3.2.1	UZGOJ C2C12 STANICA I TRETMAN DEKSAMETAZONOM..... 12
3.2.2	ODREĐIVANJE BROJA C2C12 STANICA METODOM TRIPAN PLAVO..... 14
3.2.3	BOJANJE STANICA BOJOM KRISTAL-LJUBIČASTO 15
3.2.4	OBRADA REZULTATA 16
4	REZULTATI I RASPRAVA..... 17
4.1	UČINAK DEKSAMETAZONA NA RAST C2C12 STANICA 17
4.2	MORFOLOŠKE PROMJENE U C2C12 STANICAMA PRI TRETMANU DEKSAMETAZONOM..... 20
5	ZAKLJUČCI 22
6	POPIS LITERATURE..... 23

1 UVOD

Kulturu životinjskih stanica je prvi put uspješno primijenio biolog Ross G. Harrison 1907. godine, no tek je otkriće i razvoj antibiotika, tehnike tripsinizacije i standardiziranog kemijski definiranog medija za uzgoj omogućilo njenu širu primjenu. Danas kultura životinjskih stanica ima široku primjenu u proizvodnji antitijela, cjepiva i rekombinantnih proteina, istraživanjima o citotoksičnosti i funkciji gena, biologiji matičnih stanica te tkivnom inženjerstvu.

Proizvodnja stanica skeletnih mišića *in vitro* se sve više koristi u području laboratorijski uzgojenog mesa koje bi se u budućnosti moglo koristiti u prehrambene svrhe. U ovom je radu korištena C2C12 stanična linija mioblasta miša koja je nastala subkloniranjem stanične linije mioblasta uspostavljene iz mišjeg skeletnog mišića. Diferencijacijom mioblasta dolazi do nastanka miotuba te je ova stanična linija je opsežno korištena kao *in vitro* model u proučavanju karakteristika rasta progresije metaboličke bolesti i mišićne atrofije.

Deksametazon je sintetski glukokortikoid koji se koristi za liječenje raznih upalnih stanja poput astme, endokrinih i reumatskih poremećaja. U istraživanjima se koristi za proučavanje apoptoze, staničnih signalnih putova, ekspresije gena i stanične diferencijacije. Utjecaj deksametazona na neke vrste stanica već je primijećen u mnogim istraživanjima no s obzirom da nema dovoljno istraživanja koja se bave utjecajem deksametazona na C2C12 stanice, cilj ovoga rada je utvrditi njegov utjecaj na rast i diferencijaciju tih stanica.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 Kultura stanica

Kultura stanica se koristi kao pojam za izuzimanje stanica iz biljnih ili životinjskih organizama te njihov uzgoj u točno određenim laboratorijskim uvjetima. U ovom poglavlju biti će riječ prvenstveno o kulturi životinjskih stanica, s obzirom da se u ovom radu koristila životinjska stanična kultura. Kultura stanica započela je s razvojem tehnike viseće kapi pri čemu je najvažnije dostignuće vezano za kulturu životinjskih stanica postignuto 1907. godine kada je Ross Harrison dokazao da se normalne funkcije stanica mogu nastaviti *in vitro*, prateći rast i održavanje živčane stanice tijekom 30 dana. Kulture životinjskih stanica koje su izolirane neposredno iz tkiva ili organa nazivaju se primarnim kulturama i mogu se subkultivirati, odnosno precijepiti u novu posudu sa svježim medijem za uzgoj kako bi imale više mjesta za rast. Nakon prve subkultivacije primarna kultura postaje sekundarna kultura i može se prevesti u staničnu liniju. Stanične linije imaju određeni stupanj genotipske i fenotipske jednoličnosti stanične populacije zbog opstanka stanica sa najvećim kapacitetom rasta. Nakon nekoliko subkultiviranja stanice izvedene iz primarne kulture ulaze u fazu replikativne senescencije (tijekom uzastopnih dijeljenja stanice ne uspijevaju održati duljinu telomera te nastaju kritično kratke telomere) koja završava odumiranjem stanica te se takve stanice nazivaju konačnom staničnom linijom. Normalne stanice obično se dijele samo ograničen broj puta prije nego što izgube sposobnost proliferacije i dospiju u fazu replikativne senescencije, no postoje i stanične linije koje su besmrtno. One postaju besmrtno kroz postupak imortalizacije koji može biti spontan no većinom je kemijski ili izazvan virusima. Većina staničnih linija koje se danas upotrebljavaju u znanosti i industriji su besmrtno, odnosno kontinuirane, i komercijalno su dostupne u bankama stanica. Također, većina stanica se mora uzgajati pričvršćena na čvrsti ili polučvrsti supstrat (adherentna kultura) dok se ostale mogu uzgajati suspenzijski u mediju za uzgoj kulture. Danas su tri tipa stanica najzastupljenije kao kulture životinjskih stanica na temelju morfoloških i funkcionalnih karakteristika: epitelne, fibroblastne i limfoblastne stanice. Uvjeti uzgoja kulture variraju za svaki tip stanica, ali medij za uzgoj kulture stanica uvijek treba sadržavati esencijalne hranjive tvari, odnosno aminokiseline, ugljikohidrate, vitamine i minerale koje su stanicama potrebne za normalan rast a kasnije i diferencijaciju. Prilikom uzgoja potrebno je regulirati fizikalno-kemijske parametre poput temperature, pH, osmotskog tlaka i sastava atmosfere. Danas se pomoću kulture životinjskih stanica proizvode

monoklonska protutijela, rekombinantni proteini, cjepiva za ljudsku i veterinarsku upotrebu a kultura životinjskih stanica se primjenjuje u raznim područjima biomedicine i biotehnologije.

2.2 Medij za uzgoj životinjskih stanica

Za uspješan uzgoj kulture životinjskih stanica izrazito je bitan odabir odgovarajućeg medija za uzgoj *in vitro*. Medij za uzgoj je tekućina ili gel dizajniran za optimalan rast mikroorganizama, životinjskih i biljnih stanica. Takav medij općenito sadrži odgovarajući izvor energije i spojeve koji reguliraju stanični ciklus a uglavnom se sastoji od skupa aminokiselina, vitamina, anorganskih soli, glukoze i seruma kao izvora faktora rasta, hormona i faktora pričvršćivanja. Osim sadržavanja hranjivih tvari, medij za uzgoj također pomaže i u održavanju pH i osmolalnosti. U kulturi životinjskih stanica koriste se dvije vrste medija, prirodni i umjetni (Yao i Asayama, 2017). Prirodni mediji sastoje se isključivo od prirodnih bioloških tekućina, a glavni nedostatak im je slaba reproducibilnost zbog nepoznavanja njihovog točnog sastava. S druge strane, umjetni ili sintetski mediji pripremaju se dodatkom organskih i anorganskih hranjivih tvari, vitamina, soli, plinovitih faza O₂ i CO₂, serumskih proteina, ugljikohidrata i kofaktora. Danas postoji više vrsta sintetskih medija, ovisno o vrsti dodanih suplemenata (Tablica 1).

Tablica 1. Kategorije medija za uzgoj kultura animalnih stanica (Yao i Asayama, 2017)

Kategorija	Definicija	Vrsta	Primjer
Prirodni medij	Sadrži prirodne biološke tekućine poput plazme, krvnog seruma i embrionalnog ekstrakta	Koagulant ili ugrušci	Plazma odvojena od heparinizirane krvi, seruma i fibrinogena
		Tkivni ekstrakti	Ekstrakti pilećih embrija, jetre i ekstrakt slezene i koštane moždine
		Biološke tekućine	Plazma, serum, limfa, amniotska tekućina, pleuralna tekućina
Sintetski medij	Sadrži bazalni medij i suplemente poput seruma, hormona i faktora rasta	Medij koji sadrži serum	Kao suplementi se koriste ljudski, goveđi, konjski ili drugi serumi
		Medij koji ne sadrži serum	Kao suplementi se koriste sirove frakcije proteina poput goveđeg albumina ili α - ili β -globulin
		Medij koji ne sadrži proteine	Kao suplementi se koriste nedefinirane komponente poput proteinskih hidrolizata

		Kemijski definiran medij	Kao suplementi nisu prikladne nedefinirane komponente nego se umjesto njih koriste visoko pročišćene komponente poput rekombinantnih proteina
--	--	--------------------------	---

Najprije su otkriveni prirodni mediji te je 1909. godine krvna plazma postala glavni medij za uzgoj raznih životinjskih stanica. Montrose T. Burrows je uspješno kultivirao stanice kokošnjih embrija korištenjem kokošje krvne plazme kao medija za uzgoj, a kasnije i stanice sisavaca. Alexis Carrel je 1912. pokazao da je dugotrajno uzgajanje stanica dobivenih iz vezivnog tkiva pilećih fetusa moguće uz povremenu izmjenu medija za uzgoj. Nadalje, 1913. godine otkrio je da dodavanje embrionalnog ekstrakta u krvnu plazmu može izrazito povećati staničnu proliferaciju i produljiti životni vijek fibroblasta iz srca pilećih embrija. U to vrijeme je sastav krvne plazme, limfe i embrionalnog ekstrakta bio nepoznat te su se vršila mnoga istraživanja o tome koje komponente navedenih prirodnih tekućina utječu na rast i preživljavanje životinjskih stanica i tkiva. Dijalizom krvne plazme kasnije se otkrila niskomolekulska frakcija koja je imala nužnu ulogu u preživljavanju stanica. Proučavanjem minimalnih količina niskomolekulskih komponenata potrebnih za rast mišjih L i HeLa stanica, Harry Eagle je 1955. otkrio kako su 13 aminokiselina i 8 vitamina nužni za njihov uzgoj, no takav medij nije bio odgovarajuć za kulture stanica kojima je potrebno mnogo komponenti za uzgoj. Par godina kasnije, daljnjim istraživanjem potreba različitih stanica za aminokiselinama, Eagle je kreirao minimalni esencijalni medij (MEM) koji se sastoji od glukoze, šest anorganskih soli (kalcijev klorid, kalijev klorid, magnezijev sulfat, natrijev klorid, natrijev fosfat i natrijev hidrogenkarbonat), 13 esencijalnih aminokiselina (arginin, cistein, glutamin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan, valin i tirozin), 8 vodotopljivih vitamina (tiamin, riboflavin, nikotinamid, pantotenska kiselina, piridoksin, folna kiselina, kolin i mioinozitol) i dijaliziranog seruma. Iste godine Dulbecco i Freeman su modificirali Eagleov medij i kreirali DMEM (*engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), koji sadrži četiri puta više koncentraciju aminokiselina te barem dva puta više koncentraciju vitamina. Njegova je originalna formulacija sadržavala nisku koncentraciju glukoze (1 g/L) i natrijevog piruvata no danas postoji više varijacija DMEM medija sa različitim koncentracijama glukoze i natrijevog piruvata kao i drugih dodataka. DMEM se uspješno koristi za uzgoj primarnih fibroblasta, neurona, glija stanica, glatkih mišićnih stanica te nekih staničnih linija poput HeLa, 293, Cos-

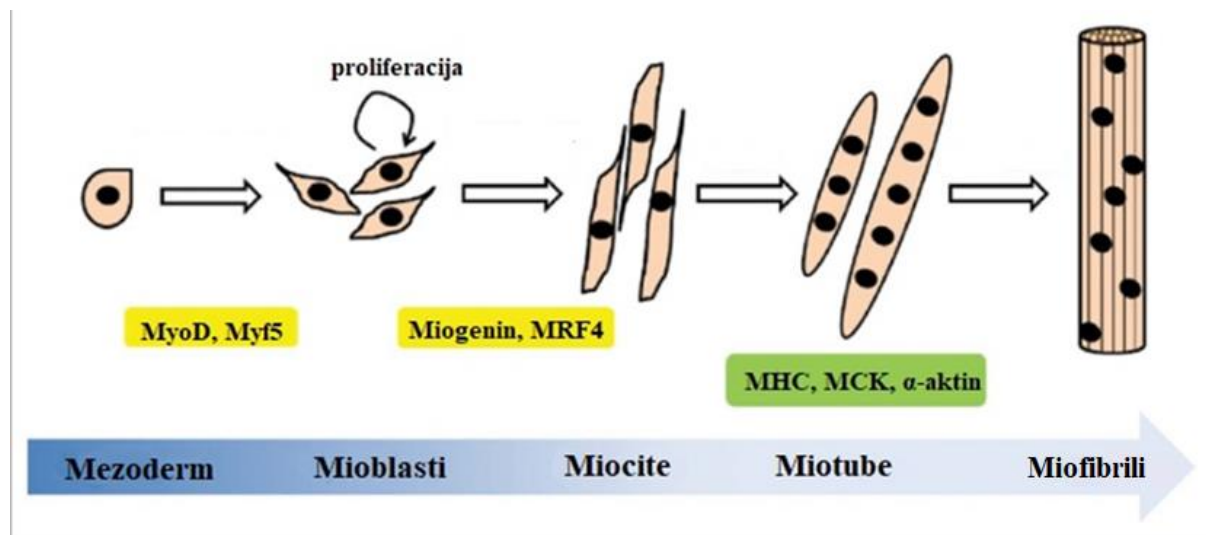
7 i PC-12.

Osim prethodno navedenih MEM i DMEM medija, danas na tržištu postoji mnogo medija za različite vrste stanica, a neki od njih su α -MEM (Stanners i sur., 1971), IMDM (Iscove i Melchers, 1978), NCTC109 (McQuilkin i sur., 1957), RPMI 1640 (Moore i sur., 1966) te Fischerov medij (Fischer i Sartorelli, 1964). Bazalne medije poput MEM i DMEM-a potrebno je nadopuniti sa serumima, odnosno kompleksnom mješavinom albumina, faktora i inhibitora rasta. Najčešće korišteni serum je fetalni goveđi serum (FBS) a koriste se i druge vrste, primjerice konjski serum (HS). Animalni serumi dodatkom u bazalni medij potiču diferencijaciju stanica, opskrbljuju stanice hormonima nužnim za proliferaciju i rast, osiguravaju hranjive tvari, elemente u tragovima i proteine te imaju stabilizirajući i detoksikacijski učinak tijekom uzgoja stanične kulture (Thermo Fisher Scientific, 2023). Kod pripreme fetalnog goveđeg seruma najprije se uklanjaju faktori zgrušavanja zajedno s krvnim tjelešcima iz zgrušane krvi. Na sastav krvi također uvelike utječu prehrana i okolina gravidne ženke. S obzirom da je zbog toga jako teško odrediti točan sastav seruma provedena su mnoga istraživanja o faktorima rasta, hormonima, proteinima, kofaktorima i mineralima koje serum sadrži i koji mogu utjecati na kulturu stanica. Do sada je utvrđeno da komercijalno dostupni fetalni goveđi serumi sadrže proteinske komponente, koje čine transportni proteini, serumski proteini i enzimi, hormone, faktore rasta i citokine, masne kiseline i lipide, ugljikohidrate, spojeve sa dušikom (aminokiseline, kreatinin, poliamini, purini i pirimidini, urea i mokraćna kiselina), vitamine, minerale, anorganske komponente (fosfat), bilirubin, ugljikov dioksid i ugljikov monoksid (Lee i sur., 2022). Fetalni goveđi serum općenito je bogat faktorima rasta i sadrži niske razine γ -globulina koji inhibiraju stanični rast, stoga je prikladan za stanice koje teško proliferiraju u kulturi te se koristi i za kloniranje stanica. Sa druge strane, konjski serum sadrži više imunoglobulina i proteina od fetalnog goveđeg seruma i koristi se kod dijagnostičkih analiza, služi za suplementaciju tijekom rasta mikoplazme i ima široku primjenu kod uzgoja hematopoetskih matičnih stanica i neuronskih stanica. Između ostaloga, konjski serum u niskoj koncentraciji često se koristi prilikom induciranja diferencijacije različitih vrsta stanica. Njegove karakteristike uključuju i nisku koncentraciju poliamin oksidaze, koja stvara poliamine koji imaju pozitivan učinak na proliferaciju stanica i teže se metabolički razgrađuju. Unatoč njihove široke upotrebe, mnogi znanstvenici danas pokušavaju smanjiti upotrebu životinjskih seruma u medijima za uzgoj kultura stanica zbog etičkih razloga, velikih troškova, varijabilnosti sastava šarža i potencijalnog sadržavanja infektivnih agenasa.

2.3 Diferencijacija mišićnih stanica

Sisavci posjeduju tri vrste mišićnih stanica, skeletne (poprečno-prugaste), srčane i glatke, a osim njih za kontrakciju su sposobne i mioepitelne stanice koje se nalaze u žljezdanom epitelu i svojom kontrakcijom olakšavaju istjecanje sekreta. Iako sve one imaju sposobnost kontrakcije pomoću organiziranih sustava filamenata koji se temelje na aktinu i miozinu (proteinima odgovornima za kontrakciju), navedene stanice se razlikuju u funkciji, strukturi i razvoju. Stanice skeletnih mišića odgovorne su praktički za sve svjesne pokrete i kontrakcijama skeletnog mišićnog tkiva upravlja središnji živčani sustav. Razlikuju se od ostalih mišićnih stanica po tome što stvaraju snopove i mnoga mišićna vlakna tako sadrže i preko tisuću jezgri unutar zajedničke citoplazme, dok druge vrste mišićnih stanica općenito imaju samo jednu jezgru. Stanice srčanog mišića nalikuju skeletnim mišićnim vlaknima po tome što imaju pravilan raspored miofilamenata u sarkoplazmi i time pokazuju poprečnu ispruganost pod mikroskopom. Glatke mišićne stanice su vretenasta oblika i stvaraju naslage koje oblažu stijenu šupljih organa. Mioepitelne stanice također nisu prugaste no za razliku od ostalih mišićnih stanica nalaze se u epitelu žlijezda znojnice, mliječnih i suznih žlijezda i žlijezda slinovnica. S obzirom da se u ovom radu koristi stanična linija C2C12, ovdje će biti prvenstveno objašnjena diferencijacija skeletnih mišićnih stanica (Slika 1.). Pojam stanične diferencijacije podrazumijeva slijed strukturnih i funkcionalnih promjena pojedinih stanica, tkiva i organa tijekom razvoja organizma. Diferencijacija mišićnih stanica započinje konverzijom mezodermalnih prekursorskih stanica u jednostanične mioblaste u čemu ulogu imaju miogenetski regulacijski čimbenici MyoD (*engl. myogenic differentiation*) i Myf5 (*engl. myogenic factor 5*). Nakon perioda proliferacije mioblasta dolazi do promijene fenotipa uzrokovane koordiniranom aktivacijom gena specifičnih za njihovu diferencijaciju. Mišićno specifični transkripcijski faktori miogenin i Mrf4 (*engl. muscle-specific regulatory factor 4*) imaju ulogu u inicijaciji diferencijacije mioblasta. Za indukciju diferencijacije mioblasta u kulturi stanica potrebno je ukloniti faktor rasta fibroblasta (FGF) ili mitogen (peptid koji potiče staničnu diobu) iz kulture mioblasta, pri čemu stanice izlaze iz staničnog ciklusa te se počinju diferencirati. Tada se mioblasi produžuju i time nastaju miocite, koje se redaju u lance te je taj korak posredovan glikoproteinima stanične membrane. Zatim se takve stanice fuzioniraju, za što su potrebni kalcijevi ioni, a fuzija je posredovana setom metaloproteinaza nazvanih meltrinima. Fuzijom miocita nastaju višejezgrene miotube. Takve miotube eksprimiraju mišićno specifične proteine, primjerice MHC (*engl. myosin heavy chain*), MCK (*engl. muscle*

creatine kinase), α -aktin i druge. Zreli oblik miotuba kasnije čini mišićno vlakno. Kada su se stanice počele diferencirati više se ne dijele i ne dolazi do replikacije DNA a diferencirajući mioblasti izlučuju faktore koji potiču druge mioblaste na diferencijaciju (Alberts i sur., 2002).



Slika 1. Koraci diferencijacije mišićnih stanica; MyoD – miogena diferencijacija, Myf5 – miogeni faktor 5, MRF4 – mišićno-specifični regulacijski faktor 4, MHC – teški lanac miozina, MCK – mišićna kreatin kinaza (Jang i Baik, 2013)

Za regulaciju miogenske diferencijacije izrazito su bitne dvije grupe transkripcijskih faktora, miogenetski regulacijski čimbenici (MRFs; *engl. myogenic regulation factors*) i MEF2 (*engl. myocyte enhancer factor-2*). Myf5, MyoD, MRF4 i miogenin pripadaju miogenetskim regulacijskim čimbenicima, koji su dio bHLH (*engl. basic helix-loop-helix*) obitelji proteina. Ovi proteini su sposobni za konverziju nemišićnih stanica u skeletne mišićne stanice. Miogenetski regulacijski čimbenici su proteini koji se heterodimeriziraju s nekim od članova obitelji E proteina i vežu se kao kompleks na sekvenciju DNA-a nazvanu E box koja se nalazi na pojačivačima i promotorima mišićnih gena te na taj način dolazi do aktivacije transkripcije gena specifičnih za mišiće (Bajek i sur., 2015). MyoD i Myf5 su prvenstveno determinacijski čimbenici koji određuju razvoj stanica u pravcu mišićne stanice no utvrđeno je i da Myf5 deficijencija smanjuje miogenetsku diferencijaciju, što dokazuje da Myf5 regulira ratu proliferacije mioblasta a MyoD je potreban za njihovu diferencijaciju (Jang i Baik, 2013). Sa druge strane, miogenin i MRF4 aktiviraju gene za formiranje miotuba i time imaju važnu ulogu

u procesu diferencijacije mioblasta. Iako je slabije istražena, MEF2 grupa transkripcijskih faktora također ima značajnu ulogu u kontroli ekspresije mišićnih gena. U kulturi stanica MEF2 sinergizira s miogenetskim regulacijskim čimbenicima MyoD pri aktivaciji ekspresije gena i kod konverzije fibroblasta u mioblaste.

2.4 Deksametazon

Deksametazon pripada skupini sintetskih glukokortikoida te ima široku primjenu u medicini, primarno zbog svojih antiupalnih svojstava. Kao antiupalni agens inhibira ekspresiju posrednika inflamacije poput citokina, prostaglandina i leukotriena. Mehanizam djelovanja mu je takav da se s visokim afinitetom veže na specifični citoplazmatski glukokortikoidni receptor (GR/NR3C1) i translocira u staničnu jezgru gdje se tada veže za DNA na promotorske regije gena koje reagiraju na glukokortikoide, tj. GRE (engl. *glucocorticoid response elements*). Glukokortikoidni receptor može djelovati i kao faktor transkripcije i kao regulator drugih faktora transkripcije. On regulira ekspresiju velikog broja ciljnih gena koji utječu na upalne odgovore, staničnu proliferaciju i diferencijaciju u ciljnim tkivima. U kulturi stanica deksametazon se koristi u istraživanjima genske ekspresije, apoptoze, staničnih signalnih putova te stanične diferencijacije. Mnoga istraživanja bavila su se njegovim utjecajem na proliferaciju i diferencijaciju različitih vrsta stanica. U jednom od israživanja primijećeno je kako deksametazon smanjuje proliferaciju osteogenih prekursora no nema utjecaj na njihovu diferencijaciju (Walsh i sur., 2001). Kasnije je dokazano kako klasični medij za osteogene stanice suplementiran sa 100 nM deksametazona potiče diferencijaciju adipocita i osteoblasta u mišjim stromalnim stanicama koštane srži (Ghali i sur., 2015). U istraživanju sa C2C12 stanicama otkriveno je kako tretman deksametazonom u fazi mioblasta pojačava diferencijaciju miocita. U tom je istraživanju je također primijećeno kako tretman deksametazonom nakon diferencijacije ima atrofični učinak u fazi miotuba. Miotube su bile tanje i otkrivena je pojačana ekspresija atrogin-1 proteina i smanjenje sadržaja proteina u MHC-u (engl. *myosin heavy chain*). Sa druge strane, tretman deksametazonom prije početka diferencijacije doveo je do povećanja promjera miotuba i nivoa MHC-a i smanjenje ekspresije proteina atrogin-1 (Han i sur., 2017). Park i sur. (2017) su također utvrdili kako tretman potpuno diferenciranih miotuba deksametazonom dovodi do smanjenja promjera miotuba. U tom istraživanju je utvrđen i

negativan utjecaj deksametazona na rast C2C12 mioblasta. Iako je deksametazon često korišten *in vitro* u protokolima diferencijacije za mezenhimalne stromalne stanice (MSC), potrebna su daljnja istraživanja kako bi se sa sigurnošću potvrdio njegov utjecaj na rast i diferencijaciju C2C12 stanica.

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
- Deksametazon, Sigma, St. Louis, SAD
- Tripan-plavo, Sigma, St. Louis, SAD
- Kristal-ljubičasto, Kemika, Zagreb, RH
- Tripsin-EDTA, Sigma, St. Louis, SAD
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalij dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH

3.1.2 Otopine i puferi

- PBS puffer (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

- Otopina deksametazona (10 mM)

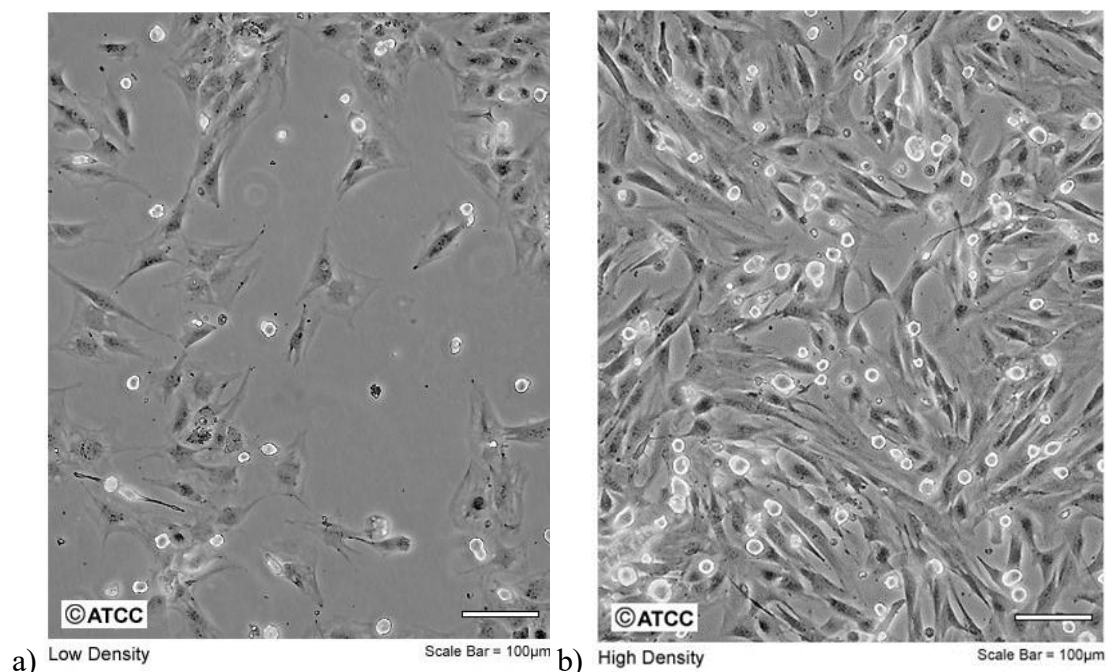
Deksametazon	11,78 mg
Destilirana voda	3 mL

3.1.3 Uređaji i oprema

- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Hladnjak DirectFREEZE -86⁰C, 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)
- Neubauer-ova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright - Line, Njemačka
- Ploče s 24 jažice, Corning, SAD
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

3.1.4 C2C12 stanična linija

Tijekom izrade ovog rada korištena je stanična linija C2C12 koja je dobavljena iz banke stanica *American Type Culture Collection* (ATCC). C2C12 je besmrtna stanična linija mišjih skeletnih mioblata izvorno dobivena iz satelitnih stanica bedrenog mišića ženke C3H miša 70 h nakon oštećenja izazvanog nagnječenjem (Yaffe i Saxel, 1977). Iz C2 stanica selektirana je besmrtna podlinija C2C12 (Blau i sur., 1985). Stanična linija C2C12 (Slika 2.) brzo diferencira stvarajući kontraktilne miotube uz nastajanje karakterističnih proteina mišića. Navedena stanična linija je adherentna, što znači da će stanice rasti samo ako su prihvaćene za površinu. Prema uputama dobavljača, nakon što se stanice izvade iz pakiranja sa suhim ledom, stanice je potrebno čuvati na temperaturi nižoj od -130°C do uporabe. Osnovni medij za ovu staničnu liniju je DMEM kojem se prilikom uzgoja stanica dodaje fetalni goveđi serum kako bi se dobio kompletni medij za rast. Diferencijacija stanica započinje nakon što stanice dosegnu konflutnost od oko 80% te se mediju za uzgoj doda 2% konjskog serum umjesto fetalnog goveđeg seruma.



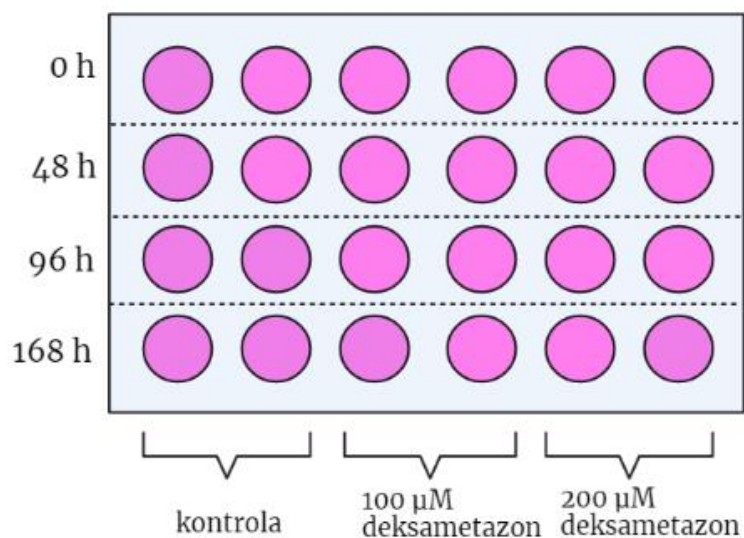
Slika 2. C2C12 stanična linija pod inverznim mikroskopom; a) niska gustoća rasta, b) visoka gustoća rasta (ATCC, 2023)

3.2 Metode rada

3.2.1 Uzgoj C2C12 stanica i tretman deksametazonom

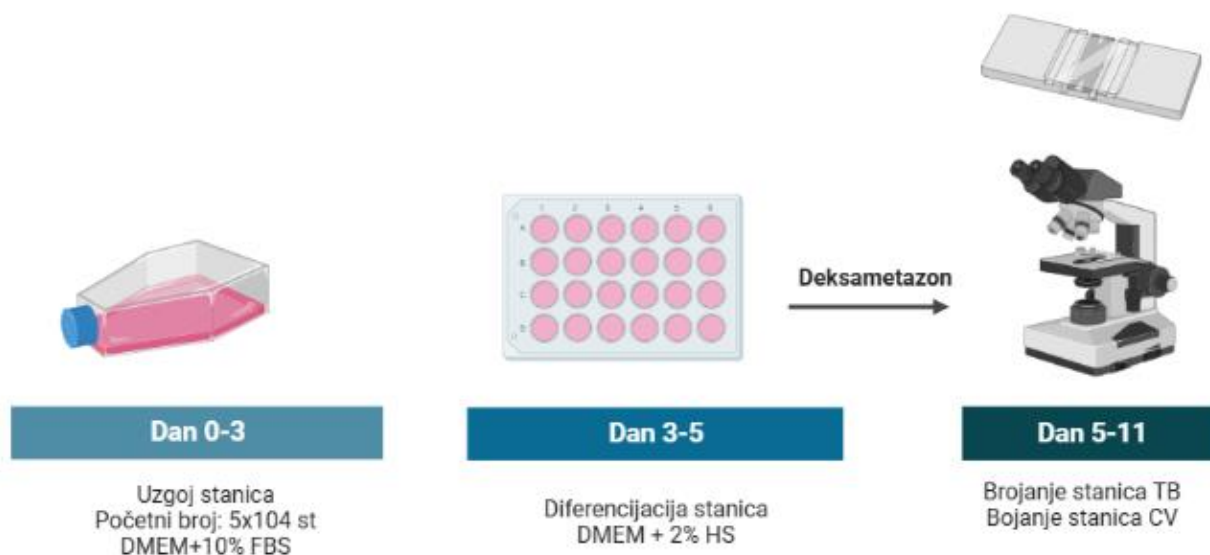
C2C12 stanice uzgajaju se u inkubatoru pri temperaturi od 37°C te u atmosferi s 5% CO₂. Najprije je potrebno ampulu sa dobivenim stanicama odmrznuti u vodenoj kupelji pri 37°C. Odmrzavanje traje otprilike 2 minute, nakon čega se ampula dezinficira sa 70% etanolom. Sadržaj ampule se zatim sterilno prebacuje u kivetu koja sadrži 9 mL kompletnog medija za uzgoj C2C12 stanica te se suspenzija centrifugira 5-7 minuta pri 125 x g. Nakon centrifugiranja supernatant se ukloni a talog stanica se resuspendira u mediju za uzgoj i zatim se takva suspenzija stanica sterilno prebacuje u T-boce i stavlja u inkubator. Stanice se zatim počinju prihvaćati za dno T-boce i u njoj se uzgajaju dok ne prekriju njenu površinu. Kada dođe do potpunog prekrivanja površine T-boce stanice je potrebno precijepiti. Prilikom precjepljivanja potrebno je najprije maknuti medij iz T-boce a zatim se stanice ispiru PBS-om kako bi se uklonili ostatci medija koji sadrži tripsin inhibitor. Nakon toga se dodaje tripsin u količini

potrebnoj da prekrije dno T-boce te se T-boca stavlja u inkubator. Potrebno je pričekati oko 5 minuta kako bi tripsin djelovao i uspješno odvojio stanice od podloge. Ako se tripsin ostavi da djeluje predugo doći će do oštećenja stanica te je stoga periodički potrebno promatrati odvajanje stanica od površine pod inverznim mikroskopom. Uspješno odvajanje stanica biti će popraćeno njihovim zaokruženjem te se tada u T-bocu dodaje kompletni medij za rast kako bi se spriječilo oštećivanje stanica tripsinom. Nakon toga stanice se izbroje u Neubauerovoj komorici i stanice se nacijepu u 2 ploče sa 24 jažice, pri čemu je nacijepljena početna koncentracija stanica 5×10^4 st/mL. Medij se mijenja svakih 48 sati, a nakon 72 sata stanice su prebačene u medij za diferencijaciju sa 2% konjskog seruma (koji je dodan umjesto fetalnog goveđeg seruma). Nakon 48 sati uzgoja u mediju za diferencijaciju navedeni medij je uklonjen te je zamijenjen svježim medijem koji sadrži 2 % konjskog seruma, te 100 i 200 μM deksametazona (Slika 3).



Slika 3. Prikaz ploča s 24 jažice tijekom provođenja eksperimenta utjecaja deksametazona na rast i diferencijaciju C2C12 stanica (vlastita izrada)

Stanicama je svakih 48 sati mijenjan medij s i bez deksametazona kako bi stanice bile opskrbljene hranjivim tvarima koje troše tijekom uzgoja. Tijekom istraživanja prati se utjecaj deksametazona na rast i diferencijaciju stanica kroz 48, 96 i 168 sati (Slika 4).



Slika 4. Prikaz eksperimenta utjecaja deksametazona na rast i diferencijaciju C2C12 stanica

3.2.2 Brojanje stanica metodom tripan plavo

Metoda brojanja stanica bojom tripan plavo koristi se za razlikovanje živih i mrtvih stanica. Žive stanice imaju funkcionalnu staničnu membranu koja je negativno nabijena i time onemogućava prolaz molekulama boje, dok kod mrtvih stanica boja može proći kroz staničnu membranu koja više nije selektivna i funkcionalna. Tripan plavo se prolaskom kroz staničnu membranu mrtvih stanica veže za unutarstanične proteine što dovodi do plavog obojenja mrtvih stanica. Kako bi se stanice mogle izbrojati najprije je potrebno tripsinizirati stanice čime se postiže njihovo odvajanje od dna ploče sa jažicama. U postupku tripsinizacije se najprije ukloni medij za uzgoj a zatim se stanice ispiru PBS puferom. Nakon toga se dodaje 100 μ L tripsina te se stanice ostave u inkubatoru 2-3 minute, a njihovo se odvajanje od dna ploče periodički promatra inverznim mikroskopom. Kada su se stanice odvojile od površine, dodaje se 400 μ L medija za uzgoj i tada se može krenuti sa postupkom brojanja stanica. Brojanje stanica ovom metodom započinje resuspendiranjem suspenzije stanica koja se nalazi u jažicama, nakon čega se uzima 20 μ L suspenzije stanica koja se pomiješa sa 20 μ L boje tripan plavo i nanosi na Neubauer komoricu za brojanje (slika 5 a). Stanice se u Neubauerovoj komorici broje u četiri vanjska kvadrata koji se nalaze izvan iscrtanog polja oblika križa (slika 5 b, oznaka L). Svaki kvadrat se sastoji od šesnaest manjih kvadrata, a nakon zbroja izbrojenih stanica u sva četiri

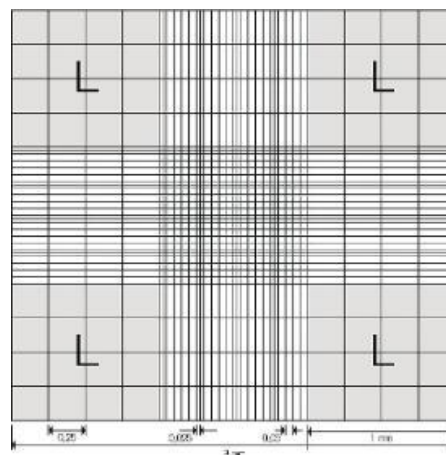
velika kvadrata može se izračunati koncentracija stanica u suspenziji:

$$\text{broj stanica po mL} = \text{zbroj izbrojenih stanica u 4 kvadrata} * 5000$$

Broji se po dva paralelna uzorka svakog od uzoraka te se njihova srednja vrijednost uzima kao konačan broj stanica po mililitru.



a)



b)

Slika 5. a) Neubauerova komorica (izvor: KEFO Croatia), b) mreža Neubauerove komorice (izvor: Avantor)

3.2.3 Bojanje stanica bojom kristal-ljubičasto

Kristal-ljubičasto je boja koja ima široku primjenu u mikrobiologiji i histologiji, a najpoznatija je njezina upotreba kod metode bojanja po Gram-u i kod utvrđivanja preživljavanja adherentnih staničnih kultura. Boja kristal-ljubičasto se veže na DNA i stanične proteine što dovodi do ljubičastog obojenja adherentnih stanica. Mrtve stanice gube sposobnost adherancije te se posljedično izgube iz populacije stanica, čime se smanjuje količina ljubičastog obojenja stanične kulture. U ovom istraživanju boja kristal-ljubičasto se prvenstveno koristi za lakšu vizualizaciju diferencijacije C2C12 stanica. Kako bi se provelo bojanje stanica potrebno je najprije ukloniti medij za uzgoj, nakon čega je potrebno isprati stanice sa 100 μ L PBS pufera. Tek nakon ispiranja dodaje se 100 μ L boje kristal-ljubičasto i stanice se stavljaju u inkubator.

Nakon inkubacije potrebno je stanice višekratno isprati PBS puferom kako bi se odbojale, a nakon čega se stanice mogu promatrati i snimiti pod inverznim mikroskopom.

3.2.4 Obrada rezultata

Izračunavanje parametara rasta C2C12 stanica

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 jednačba:

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

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

4 REZULTATI I RASPRAVA

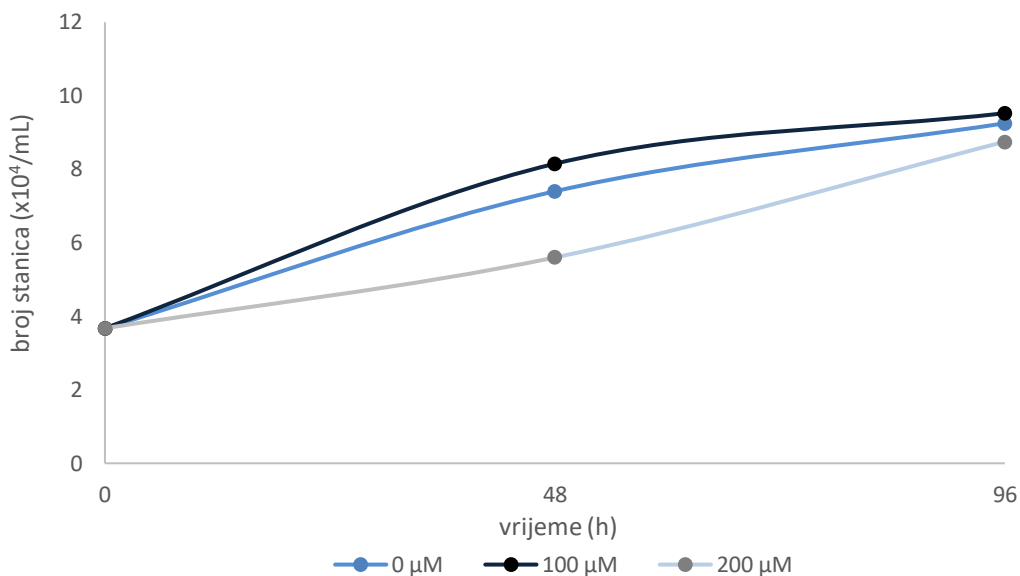
Deksametazon je glukokortikoid koji se koristi za liječenje inflamatornih stanja poput alergija i kožnih problema te artritisa, lupusa, psorijaze i poremećaja disanja. Primjenjuje se i u kulturi stanica za proučavanje apoptoze, ekspresije gena i staničnih signalnih puteva. Također, smatra se da ima utjecaj na atrofiju skeletnih mišića budući da smanjuje sintezu proteina i povećava njihov katabolizam koji dovodi do atrofije mišića (Han i sur., 2017).

U istraživanju biologije mišića, stanična linija C2C12 ima važnu ulogu budući da u procesu diferencijacije stanica dolazi najprije do diobe mioblasta koji se potom izdužuju i fuzioniraju. Tijekom procesa diferencijacije C2C12 stanica, kortikosteroidi u koje spada i deksametazon pokazuju različit i suprotan učinak ovisno o načinu primjene tj. primjenjuju li se prije ili nakon započinjanja procesa diferencijacije.

S obzirom na sve navedeno, cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj deksametazona na rast i diferencijaciju C2C12 stanica uz određivanje broja i morfologije stanica.

4.1 Učinak deksametazona na rast C2C12 stanica

Tijekom eksperimenta pratila se dinamika rasta C2C12 stanica brojanjem stanica koristeći metodu tripan plavo. Nakon naciepljivanja u ploču sa jažicama i dodatka medija za diferencijaciju (sa i bez dodatka deksametazona) stanice su brojane u dva paralelna uzorka svakih 48 sati (Slika 6). Kod brojanja uzoraka nakon 168 sati većina stanica se odvojila od dna jažica pa rezultati nisu bili vjerodostojni i stoga se nisu uzimali u obzir pri prikazu i analizi podataka.



Slika 6. Krivulja rasta C2C12 stanica uz dodatak deksametazona tijekom 96 sati

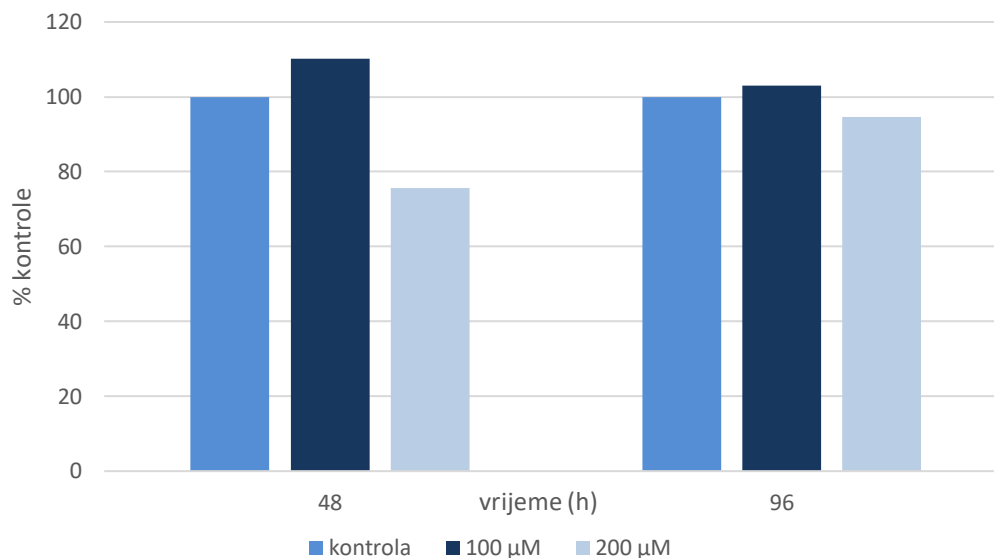
Temeljem dobivenih krivulja rasta C2C12 stanica s i bez dodatka deksametazona izračunati su specifična brzina rasta, vrijeme udvostručenja te prinos stanica (Tablica 2.).

Tablica 2. Parametri rasta C2C12 stanica tijekom tretmana deksametazonom

Uzorak	μ (h ⁻¹)	t_d (h)	prinos x 10 ⁴ (st)
kontrola	0,0146	47,47	5,82
100 μM deksametazona	0,0166	41,75	5,85
200 μM deksametazona	0,0088	78,76	5,0

Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako koncentracija od 100 μM deksametazona ima pozitivan učinak na rast C2C12 stanica dok koncentracija deksametazona od 200 μM pokazuje blagi inhibicijski učinak u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

Rezultati djelovanja deksametazona na rast C2C1 stanica prikazani su i kao % tretiranih stanica u odnosu na kontrolne, netretirane stanice (slika 7.).

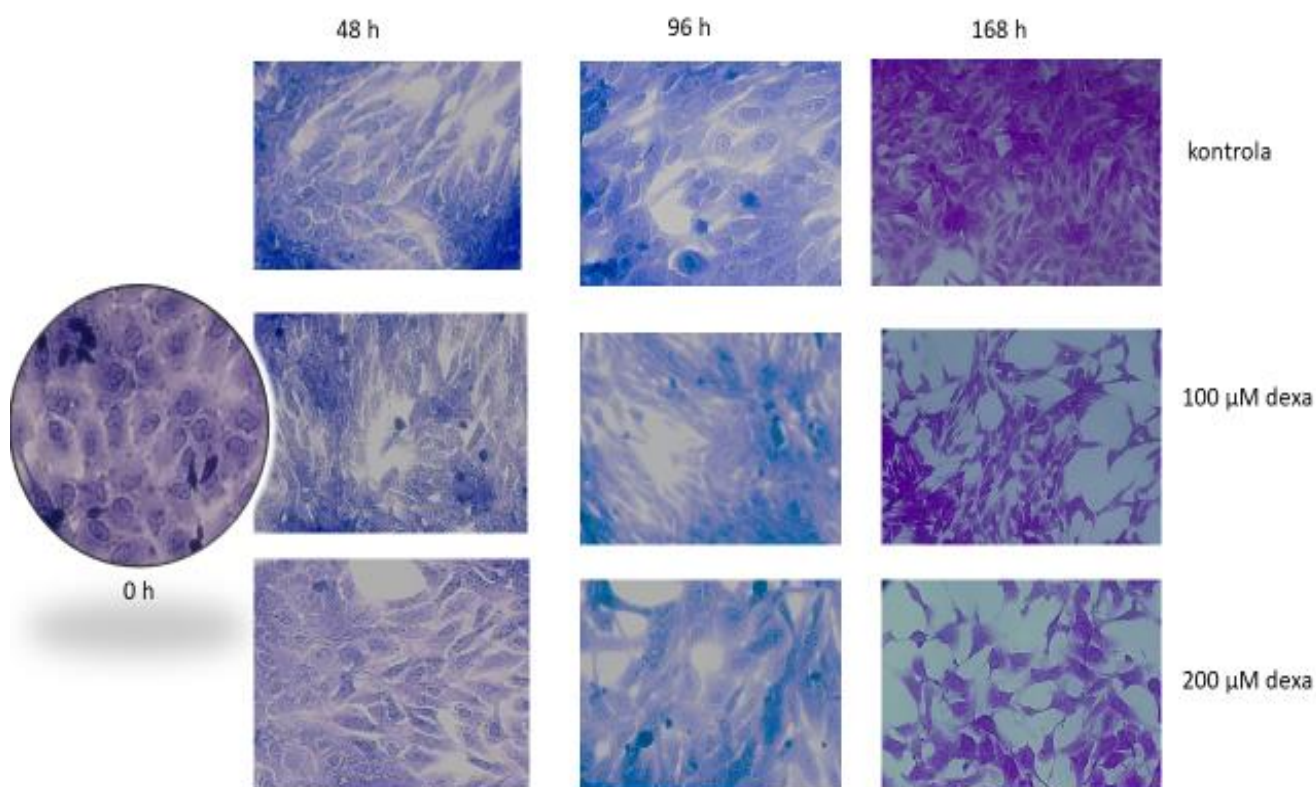


Slika 7. Odnos broja C2C12 stanica tretiranih deksametazonom i broja kontrolnih, netretiranih stanica

Iz rezultata prikazanih na slici 6. vidljivo je kako su stanice tretirane sa 100 µM deksametazona u 48 sati narasle za 10,14 % više u odnosu na kontrolne stanice, a nakon 96 sati njihov se broj povećao za 2,97 % u odnosu na kontrolne stanice. Naspram toga, stanice koje su bile tretirane s 200 µM deksametazona nakon 48 h imale manji rast od 24,32 % u odnosu na kontrolne stanice, a nakon 96 sati 5,41 % manji rast u odnosu na kontrolne stanice. Dobiveni rezultati odstupaju od rezultata koje su objavili Han i sur. (2017) te Park i sur. (2017) koji su pokazali kako koncentracije od 50 i 100 µM deksametazona inhibiraju rast C2C12 stanica. U našem slučaju se pokazalo kako koncentracija od 100 µM deksametazona ne inhibira rast C2C12 stanica, dok je jedino koncentracija od 200 µM deksametazona pokazala inhibicijsko djelovanje na rast C2C12 stanica.

4.2 Morfološke promjene u C2C12 stanicama pri tretmanu deksametazonom

U cilju praćenja učinaka deksametazona na morfološke promjene u C2C12 stanicama tijekom procesa diferencijacije, stanice su obojane bojom kristal-ljubičasto kako je opisano u poglavlju 3.2.3. te su fotografirane pod inverznim mikroskopom s ugrađenom digitalnom kamerom (slika 8).

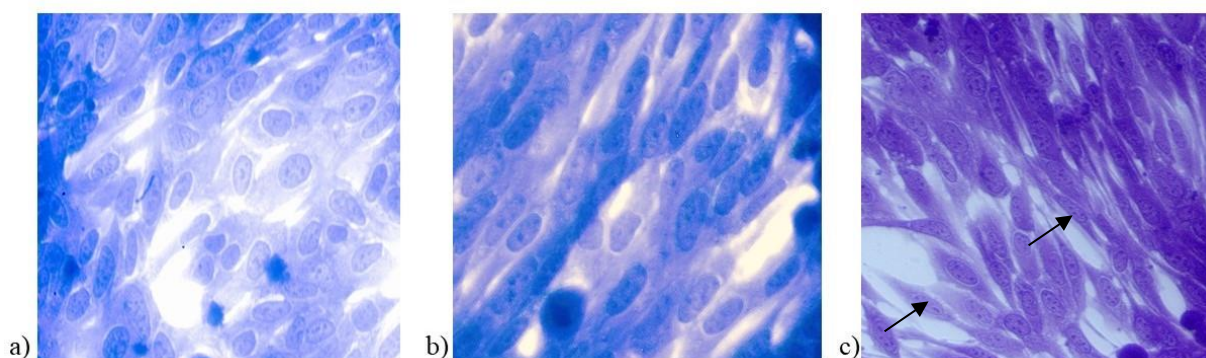


Slika 8. Morfologija C2C12 stanica s i bez djelovanja deksametazona

Usporedbom morfologije stanica može se uočiti da nakon 168 h uzgoja kontrolne stanice pokazuju gušći monosloj u odnosu na stanice koje su tretirane sa 100 i 200 μM deksametazona. U svim uzorcima mogu se uočiti pojedinačni diferencirani miotubi tj. diferencirane stanice, iako generalno, čak niti u kontrolnim stanicama nije došlo do diferencijacije stanica u miotube. Uzroci uočene pojave mogu biti u uvjetima uzgojima ili samom diferencijacijskom potencijalu stanične linije bez obzira što su korištene opisane metode za uzgoj i diferencijaciju C2C12

stanica. Naime, C2C12 stanice se moraju održavati na odgovarajući način kako bi se sačuvala njihova mioblastna svojstva i sposobnost miogeneze za primjenu u farmaceutskim i biološkim istraživanjima. Isto tako, optimiziracija uvjeta uzgoja je prvi korak koji je potrebno napraviti s obzirom na heterogenost populacije C2C12 stanica (Prasetyaningrum, 2021).

Iako se pojava miotuba C2C12 stanica tijekom provedenog eksperimenta nije mogla sa sigurnošću utvrditi bojanjem stanica bojom kristal-ljubičasto, ipak su primijećene određene razlike u izgledu diferencijacije C2C12 stanica nakon 96 sati (Slika 9 a-c).



Slika 9. Usporedba morfologije C2C12 stanica nakon 96 h djelovanja deksametazona; a) kontrola, b) stanice tretirane sa 100 μM deksametazona, c) stanice tretirane sa 200 μM deksametazona

Stanice koje su tretirane deksametazonom djeluju izduženije i uže od netretiranih, kontrolnih stanica i izraženo je kod stanica tretiranih s 200 μM deksametazona (slika 9c). Usporedbom stanica tretiranih sa 100 μM i 200 μM deksametazona razlike u morfologiji su nešto manje. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima koje su objavili Han i sur. (2017) i Park i sur. (2017) gdje tretman C2 C12 stanica s 50 i 100 μM deksametazona dovodi do nastajanja tanjih stanica tj. atrofijskog učinka na C2C12 stanice.

5 ZAKLJUČCI

1. U usporedbi s netretiranim stanicama, deksametazon u koncentraciji od 200 μM smanjuje rast C2C12 stanica za 5,41% dok u koncentraciji od 100 μM ne utječe na rast C2C12 stanica.
2. Deksametazon u koncentracijama od 100 i 200 μM uzrokuje promjene u morfologiji C2C12 stanica što se očituje u stanjivanju stanica.
3. Učinak deksametazona na morfologiju C2C12 stanica potrebno je dodatno istražiti i ponoviti uz primjenu specifičnijih metoda (imunokemijske metode) koje bi bolje detektirale promjene u tretiranim stanicama.

6 POPIS LITERATURE

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Genesis, Modulation, and Regeneration of Skeletal Muscle, Garland Science, New York. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26853/>
- Ambrose C.T. (2019) An amended history of tissue culture: Concerning Harrison, Burrows, Mall, and Carrel. *Journal of Medical Biography* **27** (2), 95-102. <https://doi.org/10.1177/0967772016685>
- Arora M. (2013) Cell Culture Media: A Review. *Materials and Methods* 3:175. <https://doi.org/10.13070/mm.en.3.175>
- Bajek S., Nikolić M., Šoić Vranić T., Bajek M., Marić I. (2015) Mišićne progenitorne stanice u skeletnom mišiću. *Medicina Fluminensis* **51** (4), 503-510. <https://hrcak.srce.hr/file/218211>
- Capricorn Scientific, Horse Serum. <https://www.capricorn-scientific.com/en/shop/horse-serum~p1112>. Pristupljeno 7. lipnja 2023.
- Chal J., Pourquié O. (2017) Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Development* **144** (12), 2104–2122. <https://doi.org/10.1242/dev.151035>
- Cheol P., Jin-Woo J., Choi Y. (2017) Induction of Muscle Atrophy by Dexamethasone and Hydrogen Peroxide in Differentiated C2C12 Myotubes. *Journal of Life Science* **27**, 1479-1485. <https://doi.org/10.5352/JLS.2017.27.12.1479>
- Cole P. L (2021) The effects of synthetic cannabidiol on skeletal muscle development *in vitro* (diplomski rad), Liverpool John Moores University, Engleska. [10.24377/LJMU.t.00017165](https://doi.org/10.24377/LJMU.t.00017165)
- Della Bella E., Buetti-Dinh A., Licandro G., Ahmad P., Basoli V., Alini M. i sur. (2021) Dexamethasone Induces Changes in Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cells via *SOX9* and *PPARG*, but Not *RUNX2*. *International Journal of Molecular Sciences* **22**(9), 4785. <https://doi.org/10.3390/ijms22094785>
- Eagle H. (1955) Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* **122** (3168), 501-504. <https://www.jstor.org/stable/1751011>
- Ghali O., Broux O., Falgayrac G., Haren N., van Leeuwen J.P.T.M, Penel G. i sur. (2015) Dexamethasone in osteogenic medium strongly induces adipocyte differentiation of mouse bone marrow stromal cells and increases osteoblast differentiation. *BMC Cell Biology* **16**, 9 <https://doi.org/10.1186/s12860-015-0056-6>
- Gilbert SF. (2000) *Developmental Biology*, 6th edition. Myogenesis: The Development of Muscle, Sinauer Associates, Sunderland. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10006/>

Han D.S., Yang W.S., Kao T.W. (2017) Dexamethasone treatment at the myoblast stage enhanced C2C12 myocyte differentiation. *International Journal of Medical Sciences* **14**, 434-443. <https://doi.org/10.7150/ijms.18427>

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

Jang Y., Baik E. (2013) JAK-STAT pathway and myogenic differentiation. *JAK-STAT* **2**(2). <https://doi.org/10.4161/jkst.23282>

Lee D.Y., Lee S.Y., Yun S.H., Jeong J.W., Kim J.H., Kim H.W. i sur. (2022) Review of the Current Research on Fetal Bovine Serum and the Development of Cultured Meat. *Food Science of Animal Resources* **42**(5), 775-799. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2022.e46>

Macsen Labs, Trypan Blue - Properties, Uses and Side effects. <https://www.macsenlab.com/blog/trypan-blue-properties-uses-side-effects/#>. Pristupljeno 15. svibnja 2023.

MERCK, Media and Supplements in Cell Culture. <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/the-cell-environment>. Pristupljeno 6. lipnja 2023.

PharmGKB, Dexamethasone. PharmGKB - Pharmacogenomics Knowledge Base, <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA449247>. Pristupljeno 11. lipnja 2023.

Prasetyaningrum P.W., Septisetyani E. P., Suyoko A., Santoso A (2021) Recloning and characterization of C2C12 myoblast and its clonal derivatives. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention* **12**, 99-105. <http://dx.doi.org/10.14499/indonesianjcanchemoprev12iss2pp99-105>

Radošević K. i Bolf N. (ur.) (2020). Osvježimo znanje: Kulture životinjskih stanica. *Kemija u industriji* **69** (9-10), 561-562. <https://hrcak.srce.hr/244366>

Srisongkram T. (2022) Basic principles and applications of animal cell culture in pharmaceutical sciences. OSF Preprints. <https://doi.org/10.31219/osf.io/3zhb5>

Škarić-Jurić, T. (2019) Starenje kao dio životnog ciklusa. U: Lauc, T. & Čuković-Bagić, I. (ur.) *Dentalna i kraniofacijalna antropologija*, Zagreb, Alfa, str. 55-64.

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 6.lipnja 2023.

Walsh S., Jordan G.R., Jefferiss C., Stewart K., Beresford J.N. (2001) High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors *in vitro*: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis, *Rheumatology* **40**(1), 74–83. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/40.1.74>

Wong C.Y., Al-Salami H, Dass C.R. (2020) C2C12 cell model: its role in understanding of insulin resistance at the molecular level and pharmaceutical development at the preclinical stage. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **72** (12), 1667-1693. <https://doi.org/10.1111/jphp.13359>

Yao T., Asayama Y. (2017) Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology* **16**, 99– 117. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>

Izjava o izvornosti

Ja Doris Aleksandrović 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.

Doris Aleksandrović
Vlastoručni potpis