

Krivulja rasta i vrijeme udvostručenja populacije stanica

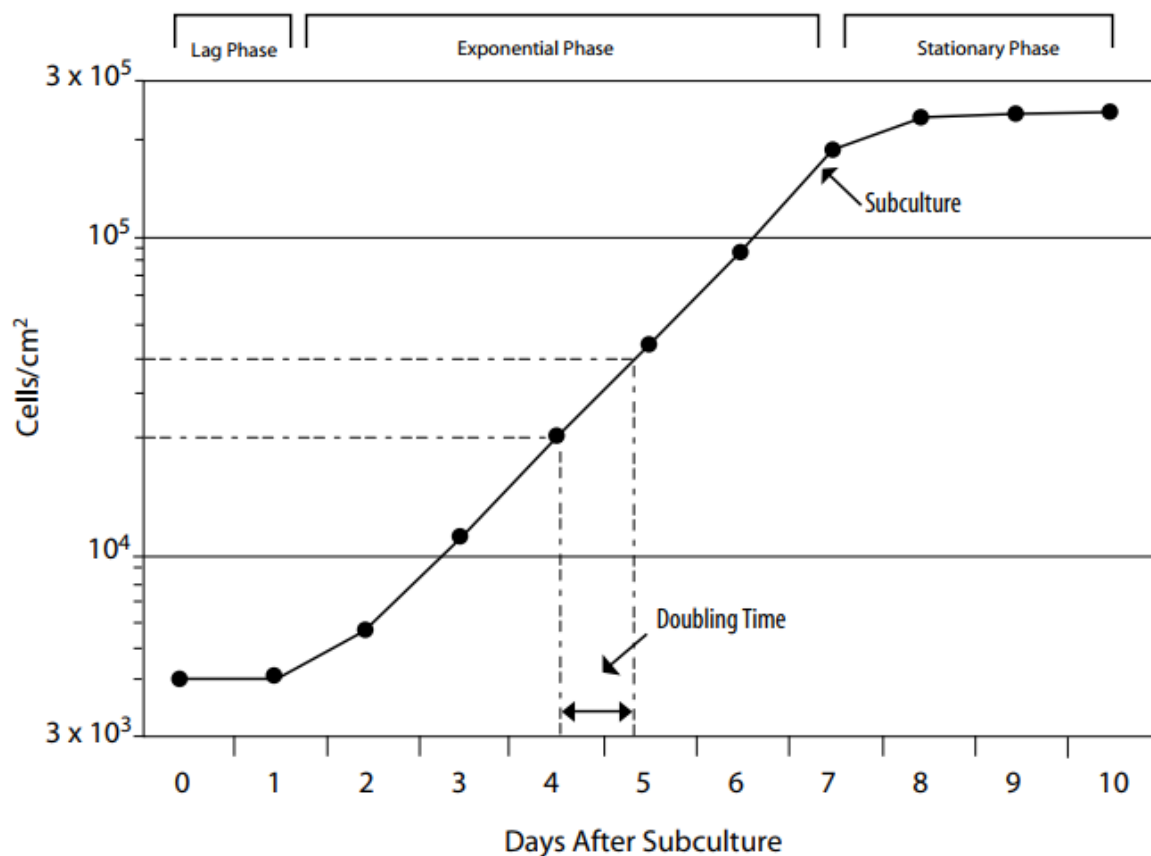
– dr. sc. Karlo Miškec (karlo.miscec@biol.pmf.hr)

Većina staničnih linija dobiva se iz **primarne kulture tkiva** koja nastaje mehaničkom ili enzimatskom **razgradnjom komadića tkiva** na stanice. Primarne kulture tkiva nakon nekog vremena dosegnu **konfluentnost** (trenutak kada se podloga za rast popuni stanicama) nakon čega je stanice potrebno presaditi (**pasažirati**). Prva pasaža obilježava se kao početak **stanične linije**. Sve češćim pasažiranjem, linija postaje sve više homogena. S vremenom se doseže maksimum dioba, najčešće između 20 i 80 dioba, ovisno o vrsti stanica. S druge strane postoje i **imortalizirane linije** odnosno tumorske stanice koje nastaju derivacijom iz tumorskog tkiva ili imortalizacijom primarne stanične linije. Takve stanične linije imaju neograničen broj dioba i pasaža.

Rastom i diobom stanica može se pratiti **specifična kinetika** ili uzorak rasta stanica kroz 4 specifične faze: lag, log ili eksponencijalna, stacionarna i plato što nazivamo **krivuljom rasta** (Slika 1.).

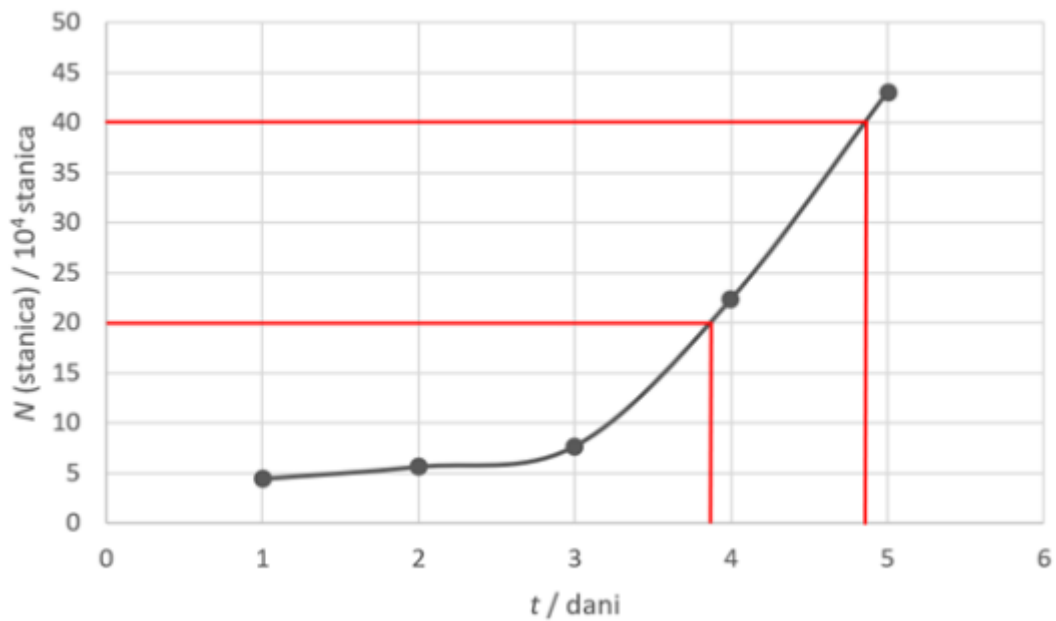
1. **Faza lag** – prva faza odmah nakon presađivanja stanica; stanice rastu jako sporo jer se još uvijek **oporavljaju od stresa** presađivanja te se adheriraju za podlogu ukoliko je riječ o adherentnim stanicama.
2. **Faza log ili eksponencijalna faza** – faza u kojoj stanice ulaze u **eksponencijalni rast** koji traje do potpune konfluentnosti.
3. **Stacionarna faza** – faza u kojoj stanice **usporavaju broj dioba**.
4. **Plato faza** – faza u kojoj se doseže **maksimum vijabilnosti i mogućnost diobe** iza koje slijedi **faza pada** gdje stanice počinju odumirati uslijed nedostatka prostora ili manjka nutrijenata koji se troše kroz diobe.

Stanice kod pasažiranja se pokušavaju **održavati u vrijeme eksponencijalne faze rasta** te se pokušava spriječiti ulaz u stacionarnu fazu. Stoga je bitno poznavati kinetiku stanica odnosno krivulju rasta kako bismo uspjeli stanice presaditi prije nego dosegnu fazu pada. Upravo zbog tog razloga **bitno je odrediti vrijeme udvostručenja populacije** svake stanične linije kako bismo znali prepoznati kada su faze u optimalnoj fazi za presađivanje.



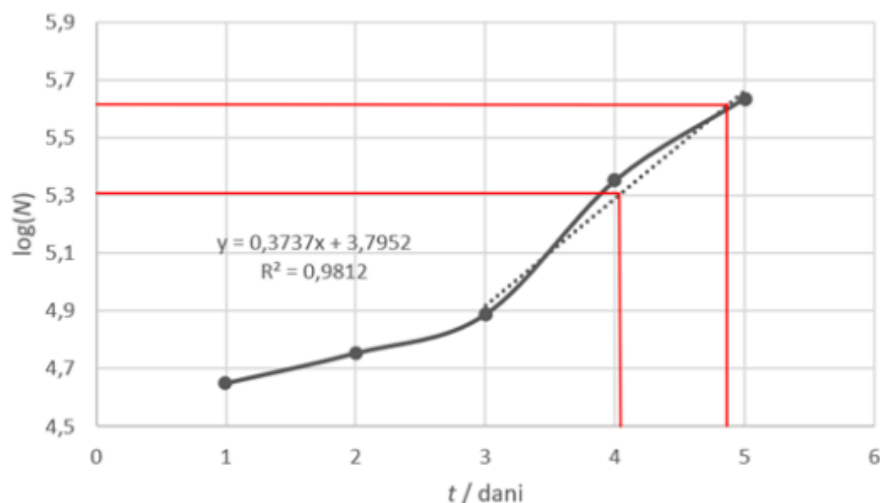
Slika 1. Dekadski prikaz krivulje rasta. Vrijeme udvostručenja se gleda samo na linearnoj fazi grafa (eksponencijalna faza) između 2 odabrane vremenske točke. Po završetku eksponencijalne faze provodi se pasažiranje (subculture) obzirom da je to idealna vremenska točka za pasažiranje.

Vrijeme udvostručenja računa se isključivo iz eksponencijalne faze rasta. Krivulja rasta može se prikazati na dva načina, dekadskim i semilogaritamskim grafom. U dekadskom prikazu (**Slika 2.**) se odrede dvije točke u linearnoj (eksponencijalnoj) fazi rasta (t_2 i t_1) između kojih se računa vrijeme udvostručenja prema formuli $T_d = (t_2 - t_1) / \ln(N_2/N_1)$ gdje N_2 prikazuje broj stanica u točki t_2 , a N_1 prikazuje broj stanica u točki t_1 . U računu se koristi $\ln$ odnosno $\log_2$ jer se gleda udvostručenje broja koje je određeno od $\log_2$.



Slika 2. Dekadski prikaz krivulje rasta stanica. Crvenim linijama označene su točke koje obilježavaju linearnu fazu rasta u kojoj se određuje vrijeme udvostručenja prema formuli $T_d = (t_2 - t_1) / \ln(N_2 / N_1)$.

Drugi prikaz krivulje rasta jest semilogaritamski (semi = samo jedna os je logaritmirana, $\log_{10}(N)$) (**Slika 3.**). U semilogaritamskom prikazu se također odrede dvije točke u linearnoj (eksponencijalnoj) fazi rasta (t_2 i t_1) između kojih se računa vrijeme udvostručenja prema jednadžbi pravca gdje se traži x_1 i x_2 . Razlika $x_2 - x_1$ je rezultat.



Slika 3. Semilogaritamski prikaz krivulje rasta stanica. Crvenim linijama označene su točke koje obilježavaju linearnu fazu rasta u kojoj se određuje vrijeme udvostručenja pomoću jednadžbe pravca.

$x_2 - x_1$ je pravi prikaz vremena udvostručenja populacije stanica.