

Laboratorijski izvještaj (rad) iz kulture animalnih stanica 2026./2027.

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

Laboratorijski izvještaj obuhvaća **3 vježbe koje se pišu pod JEDNIM ZAJEDNIČKIM NASLOVOM** koji ih objedinjuje. Izvještaj napisan u WORD DOKUMENTU kao **ZAVRŠNI SEMINARSKI RAD** za sve ujedinjene vježbe se predaje na mail karlo.miscec@biol.pmf.hr **do završetka biljnog dijela 20.11.2026. Uspješno napisani i predani izvještaj je preduvjet za ostvarivanje potpisa iz cijelog kolegija.** Vježbe se pišu u obliku **seminarskog završnog rada** sa svojim odgovarajućim podnaslovima unutar glavne cjeline.

Molim Vas da se držite pravila pisanja završnog rada na PMF-u (link: [Upute za prijavu i izradu završnog rada listopad 2024 \[338.94 KiB\]](#)) ; UPUTE ZA PISANJE ZAVRŠNOG RADA; Upute za prijavu i izradu završnog rada listopad 2024 [338.94 KiB]. Ne trebate pisati prvu nenumерiranu stranicu niti životopis. Temeljna dokumentacijska kartica je obavezna. Molim Vas da napišete izvještaj **što kraće možete** kako biste naučili filtrirati podatke i pisati samo ono što je bitno.

Izvještaj mora imati svoje **sljedeće podnaslove**:

1. Uvod

Trebate napisati zajednički uvod koji je koherentno povezan za sve tri vježbe zajedno. Nemojte prepisati tekst iz skripte već koristite skriptu i predavanja kao pomoć pri pisanju (ili bilo koji drugi izvor informacija – znanstveni radovi, članci i sl.). Ako se koriste izvori informacija koji nisu u sklopu kolegija (skripta za praktikum ili prezentacije), tada trebate navesti izvor (**reference***) gdje ste pronašli informaciju ili podatak za usporedbu.

***Reference**

U tekstu se reference stavljaju kao mali indeksirani broj iznad podatka pronađenog u literaturi ili se napiše prezime prvog autora i godina (osim ako su samo 2 autora, onda se stavljaju oba prezimena) u zagradu.

Primjer: Protein HB6 pripada skupini I transkripcijskih faktora HD-ZIP (engl. homeodomain Leucin Zipper) koji su uključeni u regulaciju biljnog odgovora na ABA-u. ABA ima ulogu u prilagodbi biljaka na vodeni, solni i temperaturni stres (Leung i Giraudat, 1998).

III

Protein HB6 pripada skupini I transkripcijskih faktora HD-ZIP (engl. Homeodomain Leucin Zipper) koji su uključeni u regulaciju biljnog odgovora na ABA-u. ABA ima ulogu u prilagodbi biljaka na vodeni, solni i temperaturni stres¹.

Napomena: Ukoliko ima više od dva autora piše se (Leung i sur., 1998).

Nakraju izvještaja treba biti **podnaslov Reference** gdje ćete napisati pune reference. Reference se mogu pisati u više oblika, ali je bitno je da su usklađene. To znači da mora biti isti redoslijed svih dijelova referenca!

npr. Prezime zarez prvo slovo imena točka zarez godina bez točke u zagradi naslov znanstvenog rada točka naziv časopisa zarez volumen broj sveska u zagradi zarez broj stranica odvojen crticom točka doi. Svi zarezi, točkice, velika i mala slova (npr. svako prvo slovo riječi u naslovu rada je veliko/malo), zagrade itd. **moraju biti jednake za sve reference.**

Primjer:

Leung, J., & Giraudat, J. (1998). Absciscic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49(1), 199–222.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.199>

Li, S., Vandivier, L. E., Tu, B., Gao, L., Won, S. Y., Li, S., ... Chen, X. (2015). Detection of Pol IV/RDR2-dependent transcripts at the genomic scale in *Arabidopsis* reveals features and regulation of siRNA biogenesis. *Genome Research*, 25(2), 235–245.
<https://doi.org/10.1101/gr.182238.114>

Obratite pažnju da kod ovog primjera su sva slova naslova teksta pisana malim slovom osim imena i prve riječi u naslovu. Puni naziv časopisa je u kurzivu gdje je svaka riječ pisana velikim slovom. Ime je pisano u obliku prezime (puno) zarez prvo slovo imena točka zarez. Godina je u zagradi bez točke. Broj stranica je podebljan, svezak/volumen je pisan u zagradi bez razmaka od broja izdanja časopisa itd. Sve reference moraju izgledati isto (isti redoslijed dijelova i iste oznake i interpunkcijski znakovi za svaki dio reference), a na vama je da odredite način na koji ih želite pisati.

2. Cilj izvještaja

Objasnite ukratko zajednički cilj cijelog seminarskog rada.

3. Materijali i metode

Trebate napisati koherentni tekst u kojem ćete spomenuti metodu i kemikalije koje su korištene. **Nemojte odvajati naslov na materijale i metode** već napišite oboje kao zajednički tekst. Ukoliko se **neki postupak ponavlja** (npr. presađivanje stanica), morate ga **referencirati** (npr. postupak prikazan u naslovu XY na stranici XY uz izmjene...) i navesti samo promjene u odnosu na taj protokol umjesto da ponavljate isti tekst koji je već napisan. Morate opisati i protokole koji su bili pripremljeni za vas (npr. tretman adriamicinom) uz napomenu da je bilo već napravljeno unaprijed. Kod pisanja materijala i metoda, možete ih podijeliti na podnaslove kako bi vam bilo lakše napisati izvještaj. Npr.

3.1. Protokol za presađivanje stanica

3.2. Protokol za brojanje stanica

Itd.

4. Rezultati

U rezultatima se treba napisati **kratki** uvod u rezultate i prikazati sve slike, grafovi, tablice i detaljni izračuni uz pravilne opise navedenog – ovisno što se radilo u vježbi. Sve vježbe **moraju imati opisanu morfologiju stanica**. U rezultate **NE STAVLJATE VLASTITE DOJMOVE** (npr. „Stanice imaju lijepu boju“. Ili „Rezultati su ispali fenomenalno.“ i slični komentari.) Također u rezultate se **nikad ne stavljaju objašnjenja i razlozi** zašto je nešto uspjelo ili nije uspjelo te se nikako ne diskutiraju rezultati, **za to služi diskusija**. Ponovno, možete ako želite, podijeliti rezultate po podnaslovima. Npr.

4.1. Prikaz krivulje rasta i određivanje vremena udvostručenja

4.2. Prikaz krivulje preživljenja i određivanje vrijednosti IC₅₀

Itd.

5. Diskusija i zaključak

U ovom podnaslovu morate **diskutirati rezultate (NE SAMO PONOVRNO IH NABROJATI)**, objasniti zašto se pojavljuje neki fenomen, jesu li **rezultati u skladu s očekivanom literaturom**, ako nisu zašto nisu, kako objašnjavate takve rezultate, što biste mogli napraviti drugačije radi boljeg ishoda eksperimenta kada biste ga ponovili. Generalno, trebate opisati što ste dobili i **referencirati svoje rezultate i usporediti ih s već postojećima**. U ovom dijelu teksta se raspravlja ono što ste samo spomenuli ili prikazali u rezultatima. **Svaka diskusija mora imati literaturnu usporedbu** s kojom uspoređujete generalne rezultate. **Bez referenca se ne prihvaća izvještaj.** Također možete podijeliti diskusiju na podnaslove po želji.

6. Odgovori na pitanja

Nakraju ćete dobiti nekoliko problemskih zadataka na koje trebate odgovoriti kako bih vidio jeste li usvojili i razumijeli vježbu. Ukoliko ne znate odgovoriti na pitanje, morate pronaći **odgovor u literaturi** te navesti referencu.

7. Reference

Najčešće greške kod pisanja:

1.) Ukoliko koristite **riječi koje imaju kraticu** npr. PCR, prvi puta u tekstu morate napisati puni naziv i u zagradi kraticu. Kada se sljedeći put pojavi isti pojam, možete pisati samo kraticu.

Primjer:

Medij Super optimal broth with catabolitic repression (SOC) se koristio za oporavak bakterija u transformaciji. Medij SOC je bio zagrijan na 37 °C.

2.) **Stupnjevi celzijevi** se pišu **s razmakom** od broja. **Primjer:** 37 °C.

3.) **Postotak** se piše **bez razmaka**. **Primjer:** 37%.

4.) Decimalni brojevi se pišu **zarezom na hrvatskom**, a točkom na engleskom. **Primjer:** 3,7%.

- 5.) Ako se koristi **znak jednako (=)**, razmak je prije i nakon. **Primjer:** 1 + 1 = 2
- 6.) Točan zapis je molekula DNA (umjesto DNA molekula), pufer TAE (umjesto TAE pufer), bakterija *E. coli* (umjesto *E. coli* bakterija) itd. Prvo ide „**vrsta molekule, kemikalije, organizma**“, a **zatim naziv**.
- 7.) Znak **puta (×)** nije isto kao slovo iks (x). Znak puta se nalazi kao poseban znak na tipkovnici (najčešće na slovu Đ (ctrl, alt Đ)).
- 8.) Naslovi **slika** se pišu **ISPOD** slike.
- 9.) Naslovi **tablica** se pišu **IZNAD** tablice.
- 10.) Nikada se **ne pišu kolokvijalizmi** npr. petrijevka, nego se piše petrijeva zdjelica/posuda.
- 11.) Svim poznatim **puferima** se mora pisati **sastav**.
- 12.) Slike i tablice se **trebaju uvesti u tekst** prije nego se prilože u referatu.
- 13.) Grafovi se opisuju kao **Slika XY**.
- 14.) U grafove se nikada ne piše broj s eksponentom npr. 5E05 ili 5×10^5 . U naslov stupca se stavi najveći eksponent broja koji je u tablici ($N \times 10^x$), a u **retke se upisuju samo brojevi bez eksponenta**.
- 15.) Tablice se **posebno formatiraju** kao na slikovnom primjeru ispod. Trebaju se vidjeti samo gornja i donja linija naslova stupaca i donja linija nakraju tablice. Nema poprečnih linija između redaka niti između stupaca.

Table 2.

The composition of lysis and wash buffers for the purification of GST-tagged proteins.

Recipe	LyB2	W1	W2	W3
1 × PBS	100%	100%	100%	100%
NaCl	-	-	0.5 M	-
Tween 20	-	0.05%	-	-
Triton-X100	0.10%	-	-	-
lysozyme (Sigma)	1 mg/mL	-	-	-
PMSF	1 mM	-	-	-

PODACI ZA VJEŽBU 1. KRIVULJA RASTA I UPUTE ZA PISANJE:

Što sve treba biti u rezultatima:

- Opisati **izgled stanica**
- Prikazati puni **izračun kako ste nasadili/izbrojali stanice (samo jedan primjer izračuna je dovoljan)**
- Izračunati **originalan broj stanica** iz petrijeve zdjelice iz koje ste brojali stanice.
- Konstruirati krivulju rasta (i tablično i grafički) te **označiti na grafu vrijeme udvostručenja**. **Krivulja se mora prikazati na 2 načina:** dekadski (ovisnost broja stanica o danima) te semilogaritamski (ovisnost log (stanica) o danima). Za dekadski prikaz trebate koristiti formulu iz dodataka za skriptu koje ste dobili na prvoj vježbi.
- **Vrijeme udvostručenja trebate izračunati na dva načina** prema dvije skale (dekadskoj i semilogaritamskoj) te taj izračunati podatak morate naznačiti na grafu. Dodatak skripti s prve vježbe će Vam pomoći oko izračuna.
- Izračunati **plating efficiency (PE)**

Što sve treba biti u diskusiji:

- **Opisati dobivenu kinetiku grafa**, vide li se sve faze? Ako da zašto da, ako ne zašto ne?
- Kada počinje koja faza na grafu? Što je točno **vrijeme udvostručenja**? **Usporediti** vrijeme udvostručenja iz dekadskog i semilogaritamskog prikaza.
- Usporediti **plating efficiency** s literaturom ako postoje podaci. Koja je važnost ovog podatka?
Napomena: ukoliko nema podataka za vaš tip stanica, diskutirajte u usporedbi s nekim sličnim stanicama
- Usporediti Vaše **vrijeme udvostručenja s literaturnim podacima**.
- Što biste napravili da dobijete preciznije rezultate, ako oni nisu u skladu s očekivanjem, te općenito objasniti sve fenomene i pojave za koje smatrate da je potrebna diskusija.

Podaci za krivulju rasta - broj stanica:

1. dan

nasađeno: 5×10^4

prihvaćeno: $4,45 \times 10^4$

2. dan

$5,5 \times 10^4$

$5,8 \times 10^4$

3. dan

$7,7 \times 10^4$

4. dan

$1,26 \times 10^5$

$4,3 \times 10^4$

$3,47 \times 10^5$

$3,9 \times 10^5$

$1,14 \times 10^5$

$3,23 \times 10^5$

5. dan

6×10^5

$5,7 \times 10^4$

$1,8 \times 10^5$

$4,8 \times 10^5$

$2,86 \times 10^5$

$9,8 \times 10^5$

PODACI ZA VJEŽBU 2. INHIBICIJA STANIČNOG RASTA I RASTA KOLONIJA CITOSTATIKOM ADRIAMICINOM I UPUTE ZA PISANJE:

Što sve treba biti u rezultatima:

- Prikazati **ovisnost preživljenja stanica (%) o koncentraciji** adriamicina prema dekadskoj (tablično i grafički) skali
- Odredite **vrijednost IC₅₀ za stanice** i označite vrijednost na grafu.
- Priložiti **sliku kolonija** prije i poslije fiksacije/bojanja.
- Prikazati **ovisnost preživljenja kolonija (%) o koncentraciji** adriamicina prema dekadskoj (tablično i grafički) skali
- Odredite **vrijednost IC₅₀ za kolonije** i označite vrijednost na grafu.

Što sve treba biti u diskusiji:

- Opisati dobivene kinetike grafa, **vidi li se koljeno u grafu?** Koje je značenje koljena i zašto se pojavljuje odnosno zašto ne
- Da li je skala koncentracija dobro određena, ako nije koju skalu biste vi predložili da ponavljate eksperiment kako biste **suzili vrijednosti za precizniji IC₅₀**.
- U koju **kategoriju citostatika** spada adriamicin po jačini djelovanja? (Literaturni podatak gdje možete pronaći skalu: Krippendorff, B. F., Lienau, P., Reichel, A., & Huisinga, W. (2007). Optimizing classification of drug-drug interaction potential for CYP450 isoenzyme inhibition assays in early drug discovery. Journal of biomolecular screening, 12(1), 92-99.))
- Podudaraju li se Vaši rezultati (za stanice) **IC₅₀ s literaturom?** Referencirajte literaturni podatak.
- **Usporedite vrijednosti IC₅₀** između kolonija i stanica. Koja vrijednost je preciznija, ona određena na kolonijama ili na stanicama i zašto?
- Podudaraju li se Vaši rezultati (za kolonije) **IC₅₀ s literaturom?** Referencirajte literaturni podatak

Podaci za krivulju rasta - broj stanica:

Vrsta citostatika: doksorubicin hidroklorid (adriamicin)

<https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fda/fdaDrugXsl.cfm?setid=e0349f98-42fa-4003-b6d8-a1db1401b0ef>

Kontrola (0 μM adriamicin)

4,9 × 10⁵

4,8 × 10⁵

9,3 × 10⁵

7 × 10⁵

3,2 × 10⁵

0,1 μ M adriamicin

$$2,5 \times 10^5$$

$$1 \times 10^5$$

$$6,1 \times 10^5$$

$$1,4 \times 10^5$$

$$6,6 \times 10^4$$

0,5 μ M adriamicin

$$1,7 \times 10^5$$

$$2,06 \times 10^5$$

$$2,7 \times 10^5$$

$$7 \times 10^4$$

$$2,4 \times 10^5$$

1 μ M adriamicin

$$7 \times 10^4$$

$$1,8 \times 10^5$$

$$1,7 \times 10^5$$

$$3,2 \times 10^4$$

$$1,86 \times 10^5$$

$$1,93 \times 10^5$$

2,5 μ M adriamicin

$$1,5 \times 10^5$$

$$1,4 \times 10^5$$

$$3,5 \times 10^5$$

$2,8 \times 10^5$

5 μ M adriamicin

$7,2 \times 10^4$

7×10^4

$1,6 \times 10^5$

7×10^4

Podaci za inhibiciju staničnog rasta - broj kolonija:

Kontrola (0 μ M adriamicin)

1226, 1692, 1252, 1102, 1458, 1612, 1400, 1050, 628, 1230, 1782, 1534, 1436, 1186, 704

0,1 μ M adriamicin

1156, 630, 1300, 1240, 1206, 792, 912, 1162, 924, 974, 582, 568, 662, 1272, 1174, 1008, 842,
584, 910, 634

0,5 μ M adriamicin

370, 536, 382, 448, 644, 412, 444, 257, 360, 454, 338, 565, 356, 568, 372, 500, 446, 456, 460,
402, 516, 360, 358, 214, 742

1 μ M adriamicin

192, 188, 204, 198, 218, 215, 172, 200, 186, 184, 194

5 μ M adriamicin

0

VJEŽBA 3. SINKRONIZACIJA STANICA MITOTSKOM SELEKCIJOM UPUTE ZA PISANJE:

Što sve treba biti u rezultatima:

- Opisati **izgled stanica** prije i nakon mitotske selekcije.
- **Fotografski prikaz svih faza mitoze** (profaza, prometafaza, metafaza, anafaza i telofaza – eventualno neke međufaze ako ih uspijemo pronaći).

- **Označiti na fazama mitoze vidljive dijelove stanice:** npr. sestrinske kromatide, kromosomi, centromera, centrosomi, diobeno vreteno i stanična membrana.

- Izračunati **mitotski indeks**

Što sve treba biti u diskusiji:

- Diskutirajte **vrijednost mitotskog indeksa** – ima li smisla dobiveni broj, da li je vrijednost realna?

- Što je sve moglo **utjecati na rezultat mitotskog indeksa** i kako biste dobili precizniji broj?

- Postoji li **bolja metoda za sinkronizaciju stanica**? Pronađite neki primjer i usporedite prednosti i mane s metodom koju smo koristili na vježbama.

ZADACI

ZADATAK 1: Ako smo na hemocitometru izbrojali 90 000 st/ml, a originalno smo mali 10 ml stanične suspenzije, koliko smo ukupno imali stanica u petrijevoj zdjelici koju smo tripsinizirali? Kako biste nasadili 5 petrijevih zdjelica sa 2×10^5 stanica u volumenu od 4 ml medija DMEM + 10% FBS? Hemocitometar ima 0,1 mm mrežicu.

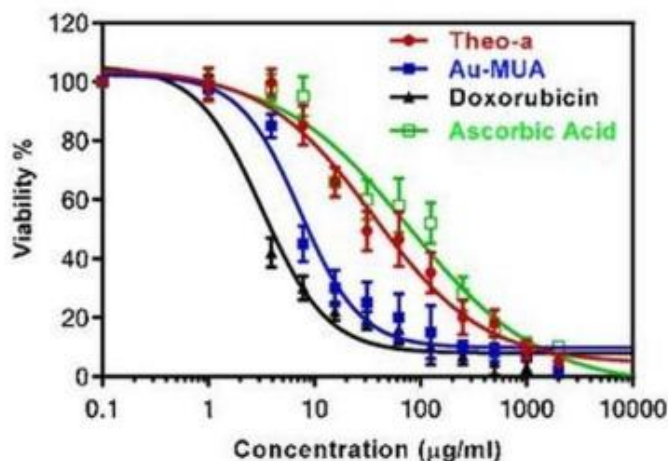
ZADATAK 2: Stabilnom transfekcijom želite transfecirati stanični suspenzijski soj LCL-HD0016 te integrirati u genom stanica konstrukt mRuby-KRAB-dSpCas9 pomoću transpozonskog sustava PiggyBac. Obzirom da želite imati što manji „off-target“ proteina dCas9 kada se počne eksprimirati u stanicama, transfekciju ste napravili s niskom količinom transpozonskog plazmida (100 ng) da se ugradi što manje konstrukta mRuby-KRABdSpCas9 zbog čega je efikasnost transfekcije samo 5%.

a) Kojom metodom biste izolirali novostvoreni soj mRuby-KRAB-dSpCas9-LCL-HD0016 od onih stanica koje nisu ugradile konstrukt ako želite dobiti **čistu monoklonsku liniju** koja je evkivalentni pojam koloniji adherentnih staničnih linija? Objasnite odabranu metodu.

(Napomena: Stanice imaju rezistenciju na antibiotik puromicin, ali čak i neke stanice koje nisu primile konstrukt, mogu preživjeti selekciju).

b) Kada ste uspješno uspostavili monoklonsku liniju mRuby-KRAB-dSpCas9-LCL-HD0016

tretirali ste stanice s nekoliko različitih spojeva (feofitin (Theo-a), adriamicin (doxorubicin), askorbinska kiselina (ascorbic acid) i merkaptoundekanoična kiselina (Au-MUA)) kako biste istražili njihove efekte na novu staničnu liniju. Na temelju **Slike 1.** odredite kolike su vrijednosti IC_{50} za svaki spoj te koji je citostatik najtoksičniji za stanice.



Slika 1. Ovisnost staničnog preživljenja monoklonske linije mRuby-KRAB-dSpCas9-LCL HD0016 o koncentraciji različitih spojeva (μM) kojima su tretirane.

ZADATAK 3: Pronađite i ispravite greške u tekstu koji opisuje eksperiment nasađivanja stanica u svrhu rasta kolonija i tretiranja kolonija adriamicinom. Ukoliko su neke greške računskog tipa, prikažite kako ste došli do točnog rješenja.

Tekst:

Andrija je odlučio nasaditi adherentne stanice 1.1.B4 kako bi uspješno uzgojio kolonije koje će tretirati citostatikom. U tu svrhu, presadio je stanice u vrlo visokom broju kako ne bi umrle. Odsisao je stari medij vakuum sisaljkom, isprao je petrijevu zdjelicu bikarbonatnim puferom te je stanice tripsinizirao. Kada je odsisao tripsin, neutralizirao je stanice s medijem RPMI bez seruma i nasadio ih je u novu netretiranu petrijevu zdjelicu. Drugi dan je stanice tretirao adriamicinom (stock 1 M) koncentracijama 0,1 μM , 0,2 μM , 0,5 μM , 2 μM i 5 μM te je redom iz stocka adriamicina dodao volumene u petrijevu zdjelicu (volumena 2 ml) 10 μl , 5 μl , 2 μl , 1 μl i 0,5 μl . Pustio je da kolonije rastu tri do četiri dana nakon čega ih je fiksirao kristal violetom i brojao kolonije koje su preživjele. Na temelju vrijednosti IC_{50} odredio je jačinu citostatika te je nakraju suzio skalu kako bi dobio preciznije rezultate.

ZADATAK 4. Nasadili ste stanice fibroblasta koje su nastale kao primarna kultura iz kože miša. Iako ste stanice uzgajali u visoko hranjivom mediju DMEM with high glucose tjedan dana bez presađivanja, uočili ste da primjenom metode mitotske selekcije skoro uopće nije bilo stanica koje su se odlijepile od podloge. Kada ste stanice pogledali na mikroskopu vidjeli ste da je konfluentnost T-boce 98%.

- Što točno znači pojava fenomena da se stanice nisu odlijepile od podloge metodom mitotske selekcije?
- Zašto se javio ovaj fenomen ako znate da imate dovoljno hranidbenog medija i seruma u petrijevoj zdjelici čak i tjedan dana nakon zadnjeg presađivanja stanica? Objasnite što mislite u koju fazu staničnog ciklusa su stanice ušle nakon tjedan dana i zašto.
- Kada biste umjesto fibroblasta na isti način uzgajali staničnu liniju HeLa, da li bi se one odlijepile od podloge mitotskom selekcijom kada se ne bi presađivale tjedan dana ako je riječ o istom eksperimentu i istim uvjetima? Zašto?

ZADATAK 5.

- Izračunajte koncentraciju stanica ako koristite 0,1 mm hemocitometar.
- Kako se zove hemocitometar na slici?

