

## FARMAKOLOŠKI IN VITRO MODELI ZA PREDKLINIČKO ISPITIVANJE LEKOVA - PRIMER hSERT TRANSFICIRANIH HUMANIH EMBRIONALNIH ČELIJA BUBREGA

Mihajlo Jakovljević<sup>1</sup> i Olivera Milovanović<sup>2</sup>

Predkliničko testiranje lekova je važan segment ispitivanja efikasnosti i bezbednosti leka u pretpostavljenoj indikaciji. Njegova svrha je u prikupljanju značajnog kvantuma informacija o leku pre ulaska u kliničku fazu ispitivanja na humanim subjektima. Pored ispitivanja na mikroorganizmima i animalnim modelima poslednjih decenija je usvojena tehnologija rada sa kultivisanim ćelijskim linijama humanog porekla. One pružaju jedinstvenu mogućnost ispitivanja uticaja leka na biohemijske transportne, signalizacione i anaboličke procese u pojednostavljenom okruženju sa drastično umanjenim uticajem homeostatskih mehanizama. Humane embrionalne ćelije bubreg su primer veoma zahvalne za kultivaciju i relativno otporne ćelijske linije. Metodološki rad koji je pred Vama iznosi detalje njihovog uzgajanja i rasejavanja. Kao primer stvaranja in vitro modela za testiranje lekova navodimo postupak transfekcije. On se odnosi na unošenje gena za membransku ekspresiju humanog transportera za serotonin na HEK293 ćelijama. Opisan je standardni metodološki pristup merenja ekspresije pomenutog transportera, učinka transfekcije. Uloga i značaj rada "serotoninske pumpe" su već dobro opisani u genezi poremećaja raspoloženja.

Cilj članka je da ukaže na izvodljivost i prednosti rada sa humanim ćelijskim linijama umesto alternativnih prokariotskih i animalnih modela. *Acta Medica Medianae* 2012;51(2):34-38.

**Ključne reči:** humane ćelijske linije, kultivacija, transfekcija, HEK293, hSERT

Univerzitet u Kragujevcu, Medicinski fakultet, Odeljenje za farmakologiju i toksikologiju, Kragujevac, Serbia<sup>2</sup>  
Univerzitet u Kragujevcu, Medicinski fakultet, Odeljenje za farmaciju, Kragujevac, Serbia<sup>2</sup>

*Kontakt:* Mihajlo Jakovljević  
Odeljenje za farmakologiju i toksikologiju,  
Univerzitet u Kragujevcu, Medicinski fakultet  
E- mail: jakovljevicm@medf.kg.ac.rs

### **Eksperimentalni modeli in vitro pretkliničkog ispitivanja lekova**

Svaka eksperimentalna supstanca sa zapaženim terapeutskim potencijalom u nekom humanom oboljenju ili poremećaju mora proći duge cikluse pretkliničkog razvoja leka. Ovakva praksa utemeljena je na dugoj svetskoj istoriji farmakovigilance u prepoznavanju ozbiljnih neželjenih dejstava lekova, prerano registrovanih na tržištu i odobrenih za humanu upotrebu (1). Takva jedinjenja su potom povučena iz upotrebe sa ozbiljnim posledicama kako po zajednicu pogođenu neželjnim događajem tako i po kompaniju koja je uložila ogromno vreme i resurse u razvoj novog leka (2, 3, 4).

Srećom po bolesnike, buran razvoj primenjene organske hemije, fiziologije i bazične

farmakologije u poslednjih vek i po, obezbedio nam je animalne modele određenih bolesti. Takvi su primeri indukovanih malignih tumora, konvulzivnih poremećaja ili dijabetesa kod glodara ili nižih primata. Tako smo naučili da saznamo više o efikasnosti u posmatranoj indikaciji i bezbednosti primene nekog leka pre prvih eksperimenata na humanim subjektima. Idući korak dalje, ka hijerarhijski nižim nivoima organizacije života, po biološkoj klasifikaciji po Lineu, usledili su in vitro laboratorijski eksperimenti na kultivisanim mikroorganizmima (5). Oni su mogli biti veoma korisni kod ispitivanja mikrobicidnog dejstva i rezistencije na antibiotike ili, znatno kasnije, mutagenog potencijala raznih klasa lekova.

Ipak, potpuno novu fazu u pretkliničkom razvoju lekova postavila je mogućnost vantelesne kultivacije ćelija sisara u in vitro uslovima. Rani zagovornici ovakvog razvoja uočili su prednosti izolovanog posmatranja bioloških procesa i uticaja lekova u pojednostavljenom veštačkom okruženju i odsustvu većine ometajućih homeostatskih mehanizama. Sam postupak kultivisanja eukariotskih ćelija in vitro razvijen je u poslednjih pola veka sa idejom da bi se, oponašajući uslove in vivo, mogle održavati ćelije i ispitivati njihov metabolizam i ponašanje u odnosu na razne

spoljašnje uticaje (6). Metodologija uzgajanja i razmnožavanja humanih ćelijskih linija, koja je kasnije prerasla u kultivisanje čitavih tkiva, predstavlja danas jedan od osnovnih postulata eksperimentalne biomedicine i korisno sredstvo u razvoju novih dijagnostičkih i terapijskih procedura. Današnji standardi dobre laboratorijske prakse i relativna jednostavnost tehnike rada sa ćelijskim kulturama in vitro, ishod su dugog procesa usavršavanja sastava medijuma za njihov rast i uslova sterilnog rada (6-9).

### **Humana ćelijska linija embrionalnog bubrega 293**

Većina animalnih ćelija pokazuje sposobnost opstanka, proliferacije i ispoljavanja određenog nivoa diferencijacije fenotipa u kulturi kroz više generacija, ukoliko im se obezbede odgovarajući uslovi u smislu vlažnosti, temperature, prisustva nutrijenata, oksigenacije, odgovarajućeg pH sredine i odsustva mikroorganizama. Po načinu nastanka, ćelijske linije grubo možemo podeliti u primarne i kontinuirane. Prve su izvedene mehaničkom ekscizijom i enzimskom digestijom direktno iz tkiva in vivo, imaju ograničen životni vek i relativno ih je teško održavati in vitro (6, 7). Kontinuirane linije, gde spada i HEK 293, najčešće su populacije monoklalnog porekla i mada često slabije diferencijirane od svojih primarnih srodnika, mogu uspešno biti imortalizovane onkogenim virusima i zapravo pretvorene u tumorske ćelije koje se mogu neograničeno propagirati i rasejavati u laboratorijskim uslovima. Svojstvena im je izražena sklonost mutacijama i morfološkim promenama fenotipa (8-10).

HEK 293 ćelije makromorfološki nalikuju fibroblastima a tačno progenitorsko tkivo iz struktura embrionalnog bubrega nije poznato. Proučavajući njihov genotip i prirodu i vrste više desetina proteina koje ekspimiraju u citosolu i na membrani a koji su unikatno svojstveni nervnom tkivu, Geri Šou postavlja hipotezu o njihovom neuralnom poreklu koja, ipak, do danas nije naišla na široki konsenzus stručnjaka (8, 9). Mi smo odabrali pomenutu liniju kao pogodnu za rad, zbog izvodljivog unosa gena za ciljnu belančevinu – prenosioca biogenih amina, čije se ponašanje može in vitro posmatrati pod uticajem ksenobiotskih liganda u uslovima jednostavnijim od onih koji in vivo vladaju u nervnoj sinapsi.

### **Primer eksperimentalnog postupka ugradnje gena za membranski serotonin transporter**

Kao izabrani primer metodologije in vitro proučavanja mehanizma dejstva leka ekspresiju membranskog transportera za serotonin. Na ćelijama embrionalnog bubrega arteficialno se unosi gen koji kodira pomenuti protein postupkom transfekcije. Transfekcija je unos stranog genetskog materijala koji najčešće kodira

ciljani protein a pomoću plazmida ili viralnog vektora (9,10,11). Pomenuti molekul je u poslednjih 20 godina čvrsto povezan sa patogenezom depresije, suicidalnim ponašanjem, impulsivnom agresivnošću i alkoholizmom (12-18). Pretpostavka je da izmenjen nivo ekspresije i/ili funkcije ovog molekula povećava verovatnoću pojave određenih duševnih oboljenja (15,16,19). Budući da je smešten na presinaptičkoj membrani neurona, važan je jer vrši naglo ponovno preuzimanje serotonina oslobođenog egzocitozom i time kontroliše njegovu koncentraciju u sinaptičkoj pukotini. Samim tim utiče na trajanje i intenzitet signala prenešenog vezivanjem ovog endogenog liganda za postasinaptičke 5HT receptore, kojih je za sada opisano 7 tipova (15, 16,19-23). Afinitet vezivanja lekova za SERT je fokus mnogih molekularno bioloških studija. Razlog tome je činjenica da se mehanizam dejstava više ključnih klasa lekova u neuronaukama zasniva na farmakološkom agonizmu ili antagonizmu prirodne uloge biogenih amina. Osnovni kandidati u ovoj grupi su antidepresivi klase selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina SSRI (escitalopram, fluvoksamin), noviji antipsihotici (ziprasidon), lekovi namenjeni terapiji gojaznosti (sibutramin), migrene (rizatriptan, naratriptan), određeni antiemetici i prokinetici (metoklopramid, ketanserin, alosetron, ciproheptadin, tegaserod).

### **Metodologija uzgajanja, rasejavanja i transfekcije na HEK293 ćelijama**

Posmatrajmo autentičnu, genotipski i morfološki tipiziranu, kontinuiranu HEK 293 liniju u duboko smrznutom stanju (-190 °C). Posebnost te linije ogleda se u tome da već sadrži unet i ekspimiran gen na membrani za humani transporter za serotonin (hSERT). Pomenutu kulturu je moguće komercijalno nabaviti iz neke od banki humanih ćelijskih linija ili iz akademskih izvora, poput Univerziteta Vanderbilt u Nešvilu, Tenesi, SAD, koji već niz godina ima iskustvo u tipizaciji i radu sa pomenutom linijom, te je više puta ustupao svoje linije drugim centrima u svrhu daljih ispitivanja (12,15,19,24).

Postupak rada sastoji se u naglom odmrzavanju linije do +37°C, čime se sprečava toksičnost kriokonzervansa blagovremenim potapanjem u hranjivi medijum. Pomenuta kultura je adherentna, epitelnog tipa, zasejava se na standardnim PVC, Petri šoljama površine 75cm<sup>2</sup> (Falcon) sa neophodnim presvlačenjem poli - D - lizinom. Održava se na osnovnom DMEM hranjivom medijumu sa dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (FCS - GIBCO, Grand Island, NY). Za pasažu i dalju propagaciju ćelija tokom rasta, dovoljno je isprati ćelije PBS puferom (NaCl 0.14 mM, KCl 2.7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM, pH 7.4), odvojiti ih od podloge i napraviti suspenziju pomoću komercijalnog tripsina u trajanju od nekoliko minuta a zatim promeniti medijum za odabranih 10 % ćelija na svaka 72 sata. Ostali uslovi čuvanja u inku-

batoru, u pogledu pH sredine, oksigenacije i otpornosti na kontaminaciju mikroorganizmima, ne razlikuju se bitno od ostalih humanih imortalizovanih linija (5% CO<sub>2</sub>, 37°C, pH 7.4).

Nakon ulaska u fazu stabilnog rasta, potrebno je obezbediti poznate koncentracije ispitivanih liganda za hSERT u rastvoru. Izlaganjem ćelijske linije rastućim koncentracijama i vremenu izlaganja posmatranom jedinjenju u definisanim uslovima, možemo izmeriti (uz poznat nivo ekspresije) tempo rada serotoninske „pumpe“ pre i posle ove intervencije (13,14,16, 20,25).

Pre svakog eksperimenta potrebno je vizuelno ispitati vitalnost linije i obezbediti konfluentnost (gustinu) veću od 75%. Proceduru počinjemo uklanjanjem starog medijuma i jednostrukim ispiranjem ćelija u Krebs–Ringer–Hepes puferu (M; NaCl, 4.7 mM KCl, 10 mM Hepes, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM Tris, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>) na sobnoj temperaturi. U svaku Petri šolju dodajemo 475 µl KRH pufera, sa dodatkom 1.8 g/L glukoze (gKRH). Kada planiramo da dodamo lek, ćelije ćemo preinkubirati sa željenim agensom tokom najmanje 20 minuta (pri 22°C). Pre planirane intervencije, kao kontrolu, proveravamo funkciju hSERT. Procedura se ne razlikuje značajno u prisustvu i odsustvu eksperimentalnog faktora a merenje se sastoji u sledećem:

- Pod pretpostavkom da je sinteza 5HT u citosolu zanemarljiva u odsustvu esencijalne aminokiseline triptofana u medijumu (kao supstrata od kog nastaje pomenuti transmitter).

- Posmatramo unos ekstracelularno dodatog 5HT poznate koncentracije (10 µM 5HT po populaciji brojnosti 3.5-6\*10<sup>5</sup> ćelija na 24 komorni flask), kao jedini ili barem dominantni izvor intracelularnog 5HT.

- Pri tome je neophodno dodati 50 µM pargilina i 50 µM askorbinske kiseline da bi se sprečila intracelularna degradacija unetog serotonina (5HT).

- Nakon raspoloživosti 5HT-*ea* ćelijama u trajanju od jednog minuta, potrebno je isprati kulturu dva puta hladnim KRH puferom i zameniti medijum novim kako bi se prekinuo dalji unos.

- Ovde se još jednom služimo aproksimacijom, da bi pojednostavili model proučavanja rada serotoninske pumpe i pretpostavlja se da je njegovo kretanje približno jednosmernom influksu od spolja ka unutra, odnosno zanemarujemo efluks biogenih amina van ćelija koji se „de facto“ događa u izvesnom obimu.

- Nakon pomenute procedure, pristupa se analizi brzine i obima neto preuzimanja 5HT pomoću fluorescentnog eseja (Neurotransmitter Transporter Uptake Assay Kit - R8174, MDS).

- Dobijene rezultate možemo ugraditi u jednostavan matematički model, koji nam omogućuje da kvantitativno tumačimo uticaj prisustva liganda na rad pumpe.

## Očekivani odgovor pri hipotetičkom eksperimentu ove vrste

Nakon izlaganja HEK 293 sa eksprimiranim humanim SERT na membrani, jedinjenjima sa dokazanim afinitetom vezivanja za pomenuti transporter za biogene amine, pretpostavljeni su sledeći ishodi:

- da antidepresivni agensi iz grupe SSRI, u skladu sa ranije potvrđenim osnovnim mehanizmom njihovog delovanja u patogenezi depresije, na našem primeru značajno (40%) inhibiraju rad SERT i obarajući tempo ponovnog preuzimanja 5HT i time verovatno ostavljaju značajno veću koncentraciju ovog signalnog molekula u zoni sinaptičke pukotine u humanom mozgu in vivo,

- da raznovrsni testirani antiemetici i prokinetici sa hipotetičkim osnovnim mehanizmom njihovog delovanja, posredstvom više tipova postsinaptičkih 5HT receptora na neuroendokrinim ćelijama digestivnog trakta, ne ometaju u većem obimu rad transportera za 5HT, tako da to nije značajan mehanizam njihovog dejstva u indikacijama za koje su registrovani u nekim zemljama, kako je vladajuće mišljenje,

- da uticaj antimigrenoznih supstanci novije generacije, potvrđene efikasnosti, takođe ne inhibira rad hSERT i shodno tome, pomenuta jedinjenja traže drugačije teoretsko i eksperimentalno fundiranje njihovog nedovoljno poznatog mehanizma dejstva u genezi vaskularnih glavobolja.

## Projekcije metodologije kultivisanja u budućnosti

Opisan je primer rutinske metodologije rada sa jednom vrstom humanih ćelijskih linija i transportera jednog endogenog liganda koji se smatra ključnim u genezi mnogih neuroloških oboljenja. U vremenu rastućeg interesovanja za matične ćelijske linije ovo je samo jedan od mnogih primera mogućnosti praktične primene jednostavnih modela u prekliničkom ispitivanju lekova. Osnovna prednost ovakvog kultivisanja ćelija i tkiva je njihovo humano poreklo u odnosu na rad sa kompleksnim animalnim modelima. Vrsna specifičnost otežava uopštavanje i primenu zapaženih rezultata na humanoj populaciji. Ostale prednosti su bezbednost rane procene relativne efikasnosti posmatranog agensa u datoj indikaciji i blagovremeno uočavanje nekih obrazaca toksičnosti lekova, poput mutagenosti i citotoksičnosti, tj. indukcije apoptoze. Nedostaci ove metodologije su drastična pojednostavljenost u odnosu na uslove in vivo i odsustvo homeostatskih mehanizama koji se suprotstavljaju dejstvu leka. Ipak, na vremenu koje dolazi i usavršavanju kultivisanja čitavih tkiva, možda jednog dana i samih organa, ostaje da pokažu trajno mesto ove metodologije u razvoju lekova za kliničku upotrebu.

## Zahvalnica

Autori bi iskoristili ovu priliku da se zahvale Grantu OI 175014 Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije za finansijsku pomoć kao i Grantu OAD

Austrijskog Saveznog Ministarstva za nauku, na finansiranju letnjeg istraživačkog boravka na Institutu za bazičnu farmakologiju Medicinskog Univerziteta u Beču, pod mentorstvom Profesora Mihaela Frajsmuta, na temelju kojeg je nastao ovaj članak.

## Literatura

- Mann R, Andrews E. Pharmacovigilance. 2nd ed. England: John Wiley & Sons Ltd: 2007.
- Botting J. The History of Thalidomide. Drug News Perspect 2002; 15(9): 604-11. [[CrossRef](#)]
- Arellano FM. The withdrawal of rofecoxib. Pharmaco epidemiol Drug Saf 2005; 14(3): 213-7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gottlieb S. Antihistamine drug withdrawn by manufacturer. BMJ 1999; 319(7201): 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ambrose CT. Carolus Linnaeus (Carl von Linné), 1707-1778: the Swede who named almost everything. Pharos Alpha Omega Alpha Honor Med Soc 2010; 73(2): 4-10.
- ECACC, European Collection of Cell Cultures. Fundamental Techniques in Cell Culture: A Laboratory Handbook. Sigma Aldrich; 2007. [Cited 20 Dec 2011] Available at: <http://www.sigmaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/ecacc-handbook.html>
- Bernice M. Tissue culture techniques – an introduction. Boston: Birkhauser; 1994: 247.
- Wernli U, Eibl R, Eibl D. CD 293 AGT™ medium for the cultivation of HEK 293 EBNA cells in small-scale bioreactors: an application report. Research 2005; 5: 1.
- Ohta T. Transfection. Nippon Rinsho 1996; 54(3): 757-64. [[PubMed](#)]
- Kingston RE, Chen CA, Okayama H. Calcium phosphate transfection. Curr Protoc Cell Biol 2003 Aug; Chapter 20:Unit 20.3. [[PubMed](#)]
- Liu L, Xu HM, Jiang H, Wang J, Song N, Xie JX. Recombinant adenovirus-mediated expression of GHS-R1a in HEK 293 cells. Neurosci Bull 2010; 26(3): 225-31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Adams SV, DeFelice LJ. Flux Coupling in the Human Serotonin Transporter. Biophys J 2002; 83(6): 3268-82. [[CrossRef](#)]
- Schmid JA, Just H, Sitte HH. Impact of oligomerization on the function of the human serotonin transporter. Biochem Soc Trans 2001; 29(Pt 6): 732-6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ofir R, Tamir S, Khatib S, Vaya J. Inhibition of serotonin re-uptake by licorice constituents. J Mol Neurosci 2003; 20(2): 135-40. [[CrossRef](#)]
- Blakely RD, De Felice LJ, Hartzell HC. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. J Exp Biol 1994; 196: 263-81. [[PubMed](#)]
- Gobbi M, Funicello M, Gerstbrein K, et al. N, N-dimethyl-thioamphetamine and methyl-thioamphetamine, two non-neurotoxic substrates of 5-HT transporters, have scant in vitro efficacy for the induction of transporter-mediated 5-HT release and currents. J Neurochem 2008; 105 (5): 1770-80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vlainić J, Jembrek MJ, Strac DS, Perić D. The effects of zolpidem treatment and withdrawal on the in vitro expression of recombinant alpha1beta2 gamma2s GABA (A) receptors expressed in HEK 293 cells. Arch Pharmacol 2010; 382(3): 201-12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kiss JP, Szasz BK, Fodor L, Mike A, Lenkey N, Kurkó D, et al. GluN2B-containing NMDA receptors as possible targets for the neuroprotective and antidepressant effects of fluoxetine. Neurochem Int 2012 Jan;60(2):170-6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ramamoorthy S, Giovanetti E, Qian Y, Blakely RD. Phosphorylation and regulation of antidepressant-sensitive serotonin transporters. J Biol Chem 1998; 273(4): 2458-66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Qian Y, Galli A, Ramamoorthy S, Rizzo S, DeFelice LJ, Blakely RD. Protein kinase C activation regulates human serotonin transporters in HEK-293 cells via altered cell surface expression. J Neurosci 1997; 17(1): 45-57. [[PubMed](#)]
- Walkembach J, Brüss M, Urban BW, Barann M. Interactions of metoclopramide and ergotamine with human 5-HT(3A) receptors and human 5-HT reuptake carriers. Br J Pharmacol 2005; 146(4): 543-52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Schaz U, Föhr KJ, Liebau S, Fulda S, Koelch M, Fegert JM, et al. Dose-dependent modulation of apoptotic processes by fluoxetine in maturing neuronal cells: an in vitro study. World J Biol Psychiatry 2011; 12(2): 89-98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Picard M, Morisset S, Cloix JF, et al. Pharmacological, neurochemical, and behavioral profile of JB-788, a new 5-HT1A agonist. Neuroscience 2010; 169(3): 1337-46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jayanthi LD, Ramamoorthy S. Regulation of monoamine transporters: influence of psychostimulants and therapeutic antidepressants. AAPS J 2005; 7(3): E728-38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Samuvel DJ, Jayanthi LD, Bhat NR, Ramamoorthy S. A role for p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of the serotonin transporter: evidence for distinct cellular mechanisms involved in transporter surface expression. J Neurosci 2005; 25(1): 29-41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## PHARMACOLOGICAL IN VITRO MODELS IN PRE-CLINICAL DRUG TESTING - EXAMPLE OF hSERT TRANSFECTED HUMAN EMBRYONIC KIDNEY CELLS

*Mihajlo Jakovljević and Olivera Milovanović*

Preclinical drug testing should be considered an important stage during examinations of its efficiency and safety in any likely indication observed. Purpose of the process is acquisition of substantial amount of particular drug-related data before approaching clinical trials in humans. Historical preclinical testing relied on available testing in microbe cultures and animal models. During recent decades laboratory techniques of human cell lines cultivation have been developed and improved. These provide unique possibility of drug acting mechanism testing in a simplified environment lacking basic homeostatic mechanisms. Some examples of these are measuring drug impact to biochemical transport, signaling or anabolic processes. Humane cell lines of embrional kidney 293 are an example of easy-to-grow and disseminate and quite enduring cell line. This methodological article notices some of the details of HEK293 cells cultivation and breeding. We took transfection as an example of in vitro model creation for drug testing. Transfection refers to gene introduction into HEK293 cellular genome in order to achieve membrane expression of coded protein. In our case it would be human serotonin transporter. Article contains description of one particular methodological approach in measuring human serotonin transporter expression. The role and importance of serotonin pump in affective disorders genesis was already widely recognized. Aim of the paper was to emphasize feasibility of cell cultivation and its advantages in comparison with alternative traditional methods. *Acta Medica Medianae 2012;51(2):34-38.*

**Key words:** *human cell lines, stem cells cultivation, HEK293, transfection, hSERT*