

Rast CHO stanica u bazalnom hranjivom mediju s proteinskim hidrolizatom sjemenki lana i albuminom

Galić, Mia

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:432717>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-03**



Repository / Repozitorij:

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



A

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij biotehnologija

Mia Bokulić

7676/BT

ZAVRŠNI RAD

Mentor: izv.prof.dr.sc. Igor Slivac

U Zagrebu, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Rast CHO stanica u bazalno hranjivom mediju s proteinskim hidrolizatom sjemenki lana i albuminom

Mia Bokulić, 0058214001

Sažetak: U ovom radu obrađena je tema uzgoja adherentnih stanica ovarija kineskog hrčka CHO DP-12 u bazalnom hranjivom mediju (DMEM) sa sljedećim dodacima: 10% fetalnog goveđeg seruma (standard), s dodatkom albumina i hidrolizata proteina uljne pogače lana te s dodatkom samog albumina. Albumin je glavni protein u fetalnom goveđem serumu te se ispituje njegov značaj za rast i održavanje stanica, dok se biljni proteinski hidrolizati često dodaju kao zamjena proteinima životinjskog podrijetla. Krajnji cilj ovakvih ispitivanja jest pronaći optimalan medij za uzgoj stanica sa što manjom količinom dodanog seruma, budući da postoji mnogo problema vezanih za upotrebu seruma kao što su cijena, sigurnost, potencijalne kontaminacije te etička pitanja vezana za proizvodnju seruma. Eksperiment je proveden na način da su stanice uzgajane u navedenim medijima te je određenih dana bojom Trypan plavo praćen rast stanica. Rezultati pokazuju da je najveća koncentracija i najbrži rast u mediju koji sadrži 10% fetalnog goveđeg seruma, a najmanja koncentracija u mediju koji je sadržavao samo albumin. Albumin sa ili bez dodanih lanenih hidrolizata nije jednakovrijedna zamjena za fetalni serum.

Ključne riječi: CHO DP-12, albumin, hranjivi medij, serum, proteinski hidrolizati uljne pogače lana

Rad sadrži: 29 stranica, 7 slika, 27 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: izv.prof.dr.sc. Igor Slivac

Pomoć pri izradi: mag.ing. Marijan Logarušić

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor 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

CHO cell growth in basal nutrient medium with flaxseed protein hydrolysate and albumin

Mia Bokulić, 0058214001

Abstract: The subject of this thesis is culturing adherent chinese hamster ovary cell line CHO DP-12 in basal culture media (DMEM) containing different supplements: 10% fetal bovine serum (standard), with different concentrations of albumin and protein hydrolysates and with the addition of albumin itself. Albumin is the major protein in fetal bovine serum and its effect on cell growth and maintenance is examined in order to find the optimal medium for culturing serum-free cells, as there are many problems regarding serum use such as price, safety, potential contamination, and ethical issues related to serum production. The experiment was carried out in such a way that the cells were grown in the previously mentioned media, and on certain days the cells were counted using the Trypan blue method, thus monitoring their growth and development. The results show that the highest concentration and the fastest growth is in the medium containing 10% of fetal bovine serum, and the lowest concentration in the medium containing only albumin. Supplementation of DMEM with albumin and/or flaxseed hydrolysates cannot be recommended as serum replacement.

Keywords: CHO DP-12, albumin, cell culture medium, serum, flaxseed protein hydrolysate

Thesis contains: 29 pages, 7 figures, 27 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ph.D. Igor Slivac, Associate professor

Technical support and assistance: mag.ing. Marijan Logarušić

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu HRZZ projekta IP-2016-06-3848 „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica” pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Igora Slivca te uz pomoć mag. ing. Marijana Logarušića.

SADRŽAJ

1. UVOD	3
2. TEORIJSKI DIO	
2.1. Kultura životinjskih stanica	4
2.1.1. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica.....	5
2.1.2. Faze rasta životinjskih stanica.....	6
2.1.3. Stanična linija ovarija kineskog hrčka (CHO).....	7
2.2. Hranjivi medij za uzgoj stanica	8
2.2.1. Fetalni goveđi serum.....	10
2.3. Biljni hidrolizati u biotehnologiji	10
2.3.1. Hidrolizati lana i konoplje.....	11
2.4. Albumin	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	
3.1. Materijali	12
3.1.1. Kemikalije.....	13
3.1.2. Otopine.....	13
3.1.3. Uređaji i oprema.....	13
3.1.4. Stanična linija CHO DP-12.....	14
3.2. Metode	15
3.2.1. Uzgoj CHO DP-12 stanica u Petrijevim zdjelicama.....	15
3.2.2. Praćenje utjecaja albumina i hidrolizata na rast CHO stanica.....	16
3.2.3. Određivanje broja stanica metodom <i>Trypan Blue</i>	17
3.2.4. Određivanje koncentracije glukoze u hranjivom mediju.....	18
3.2.5. Određivanje koncentracije laktata u hranjivom mediju.....	19
3.2.6. Određivanje specifične brzine rasta stanica.....	20
3.2.7. Određivanje specifične brzine potrošnje glukoze.....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Rast CHO DP-12 u medijima s različitim udjelima seruma, hidrolizata i albumina....	21
4.2. Praćenje potrošnje glukoze i nastajanja laktata.....	24
5. ZAKLJUČAK	26
6. LITERATURA	26

1. UVOD

Posljednjih nekoliko godina, potražnja za kulturama životinjskih stanica postala je sve veća, uzevši u obzir njihovu neizostavnu ulogu u mnogim bioprocesima i istraživanjima. No, njihov uzgoj izvan živog organizma zahtjeva posebne fizikalno-kemijske uvjete i upotrebu odgovarajućeg medija kako bi stanice što uspješnije rasle i bile održavane u optimalnom stanju. Taj medij trebao bi sadržavati izvore ugljika, aminokiselina, vitamina, hormona te faktora rasta kako bi se stanicama održala što bolja proliferacija (Radošević, 2020.).

U ovom radu promatra se utjecaj različitih medija na rast stanica stanične linije ovarija kineskoga hrčka. Navedena stanična linija najčešće se koristi u svrhu proizvodnje rekombinantnih proteina (Jaypal i sur., 2007.). Stoga, potreban je medij koji će stimulirati povećanje koncentracije stanica te istovremeno potaknuti sintezu bioloških tvari i produkata. Mediji utječu na ekonomičnost procesa te je potrebno osigurati što veću produktivnost. (Hodge, 2005.). Iz navedenih razloga, najčešće se koristi serum koji sadrži sve potrebne komponente za rast i razvoj stanica te je dosad pokazao zadovoljavajuće rezultate. On potiče adheziju stanica za podlogu te osigurava stanicama potrebne proteine za transport hranjivih tvari (Moraes i sur., 2008.). Trenutno se najviše koristi fetalni goveđi serum (kr. FBS), a koristi se kao univerzalni dodatak medijima za uzgoj stanica u istraživanjima, biotehnologiji i farmaceutskoj proizvodnji (Puck i sur., 1958.).

Međutim, zbog niza nedostataka seruma (cijena, mogućnost kontaminacije, etički razlozi) sve se više govori o alternativama (Baker, 2016.). To mogu biti mediji bez seruma (tzv. serum-free mediji), mediji bez proteina i kemijski definirani mediji. Mediji bez seruma sadrže ključne proteine iz seruma, poput albumina, transferina i inzulina, a često sadrže i proteinske hidrolizate kao izvor ostalih hranjivih tvari. Oni su kao takvi, krajnji cilj većine sustava uzgoja (Van der Valk i sur., 2018.). Sve veći interes za upotrebu biljnih proteinskih hidrolizata izazvala je potraga za medijem koji konkurira mediju sa životinjskim serumom te u kojem je rizik po biološku sigurnost sveden na minimum te se najčešće koriste proteinski hidrolizati dobiveni iz soje, pšenice, riže i sl. (A. Siemensma i sur., 2010.).

Ovaj rad opisuje istraživanje utjecaja medija s albuminom u kombinaciji s proteinskim hidrolizatima uljne pogače lana te medija koji sadrži samo albumin. Proveden je uzgoj u više različitih medija, sa različitim koncentracijama albumina i proteinskih hidrolizata s ciljem usporedbe rasta u mediju sa 10% seruma. U tim medijima praćen je rast stanica, potrošnja glukoze te proizvodnja laktata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA

Kultura životinjskih stanica podrazumijeva uzgoj stanica u umjetnom hranjivom mediju u posebno kontroliranim uvjetima. Navedene životinjske stanice izoliraju se iz različitih životinjskih tkiva. Ovakav način uzgoja sadrži prednost u odnosu na korištenje tkiva životinja, a to je da se homogena populacija stanica može dobiti rastom u kontroliranim uvjetima kroz više generacija.

Kulture životinjskih stanica prvotno su služile kao metoda za proučavanje ponašanja stanica i tkiva *in vitro*, a prihvaćena je kao eksperimentalna metoda 1952. godine te je tada započela i njezina šira primjena. Prvi komercijalni proizvod kulture životinjskih stanica bilo je cjepivo protiv dječje paralize. Nakon toga uspostavljene su kulture stanica koje imaju mogućnost jednostavnog i neograničenog rasta u suspenziji te je time omogućen uzgoj u bioreaktorima (Radošević, 2020.).

Kako bi se kultura životinjskih stanica mogla primjenjivati, potrebno je da se stanice koje se izdvajaju iz tkiva mogu uzgajati u umjetnom mediju i ponašati se kao zasebni organizam u *in vitro* uvjetima. Kako su se stanice prije izdvajanja nalazile u svom prirodnom okolišu, bile su pod kontrolom kemijskih, prostornih i neuralnih mehanizama rasta te prenošenjem tih stanica u novu sredinu mora doći do prilagođavanja na nove uvjete i do brzog rasta te kao posljedica toga stanice podliježu dediferencijaciji, degeneraciji ili transformaciji (M. Butler, 2005.).

Kulture životinjskih stanica danas najčešće se koriste u istraživanjima metaboličkih puteva, testiranjima tvari na specifičnim tipovima stanica (npr. metaboliti, hormoni, faktori rasta), proizvodnji umjetnih tkiva te sintezi visokovrijednih proizvoda u velikim količinama (virusna cjepiva, monoklonska antitijela itd.). Imaju veliki značaj u modernim istraživanjima i biotehnološkim procesima (M. Butler, 2005.).

Stanice koje su pripravljene iz tkiva uzetih neposredno iz organizma nazivaju se primarnim kulturama. Subkultiviranjem (precjepivanjem) i imortalizacijom se postižu svojstva stanične linije te zadržavaju funkcije koje su specifične za tkivo iz kojeg potječu. Subkultiviranje rezultira onime što se naziva sekundarnom kulturom, no takve stanične kulture nakon višestrukog subkultiviranja ulaze u fazu replikativne sensencije. Ta faza završava odumiranjem stanica i zbog toga se te kulture nazivaju i smrtna stanična linija. Kako bi se dobila besmrtna tj. kontinuirana stanična linija potrebno je provesti postupak imortalizacije (Alves i sur.2008.).

Najviše korištene stanične linije danas su kontinuirane te su dostupne u bankama stanica. Morfološkim i funkcionalnim karakteristikama razlikujemo tri vrste stanica koje se koriste kao kulture životinjskih stanica: epitelne stanice, koje su adherentnog tipa te spljoštenog i poligonalnog oblika; fibroblastne stanice, također adherentnog tipa i izduženog oblika; limfoblastne stanice rastu u suspenziji i sfernog su oblika (Freshney, 2010.).

Najpoznatija je stanična linija HeLa, humana stanična linija epitelne morfologije, no u biotehnološkim procesima najčešće se koristi stanična linija CHO tj. stanice ovarija kineskog hrčka, koja također ima epitelnu morfologiju (M. Butler, 2005.).

2.1.1. UVJETI UZGOJA ŽIVOTINJSKIH STANICA

Najvažniji aspekt prilikom rada sa kulturama stanica jest održavanje aseptičnih uvjeta iz razloga što postoji velika mogućnost kontaminacije. Njih uzrokuju mikroorganizmi, najčešće bakterije, kvasci i plijesni. Iz tog razloga potrebno je poznavati tehnike rada u aseptičnim uvjetima i opremu potrebnu za takav rad. Glavna oprema za rad jest laminar tj. komora za sterilan rad. On omogućava sterilne uvjete rada cirkulacijom zraka kroz HEPA filter. Uz laminar, osnovnu opremu čine CO₂ inkubator, autoklav i svjetlosni mikroskop. CO₂ inkubator osigurava konstantnu temperaturu, vlažnost i koncentraciju stanica. Autoklav se koristi za sterilizaciju te je potrebno prije svakoga rada sa stanicama autoklavirati sav pribor i otopine, a mikroskop služi za svakodnevno praćenje razvitka i rasta stanica. Uz navedenu osnovnu opremu, važna je i tzv. dodatna oprema, a ona uključuje pipete, posuđe, zamrzivače, centrifuge, miješalice itd. Jako je važno prije rada sterilizirati radnu površinu (najčešće 70%-tni etanol) te uključiti UV-rasvjetu. Kao i pri gotovo svakom radu u laboratoriju, potrebno je nositi zaštitnu odjeću, a poželjno je koristiti i rukavice (Freshney, 2010.).

Stanicama su za rast potrebni i optimalni uvjeti. Optimalna temperatura stanične kulture ovisi o optimalnoj temperaturi organizma iz kojeg je izolirana. Kod humanih stanica, sisavaca i općenito toplokrvnih životinja to je 37°C, kod ptica to je temperatura od 38°C, a kod hladnokrvnih životinja ta temperatura se kreće u rasponu od 18-25°C. Najčešće se temperatura namjesti na nešto nižu od optimalne, iako pri takvoj temperature stanice sporije rastu, iz razloga što ako se namjesti na višu može doći do adaptivnog šoka te to može biti pogubno za stanice. Temperaturu je potrebno održavati konstantnom, ali su dozvoljena odstupanja od 0,5°C. Također, vrlo je važno i održavanje optimalne pH vrijednosti. Za većinu stanica ona se podešava na 7-7,4. Promjenu pH vrijednosti može uzrokovati CO₂ (povisuje pH) i laktat

(snižava pH). Te promjene možemo uočiti dodavanjem fenola u hranjivu podlogu, a on, ovisno o promjeni pH, mijenja boju u narančastu ili pak u ružičastu/ljubičastu. Dodatak bikarbonatnog pufera pridonosi stabilizaciji pH (Freshney, 2010.).

Koncentraciju CO₂ također je nužno održavati s obzirom da ona utječe na pH te se postavlja najčešće na 2 do 10%. Osmotski tlak regulira prolazak tvari kroz staničnu membranu, a kontrolira se dodavanjem soli. Sastav hranjivog medija mora sadržavati glukozu, aminokiseline, vitamine, minerale i hormone, jer su ti supstrati nužni za energiju te za rast i funkcionalne karakteristike stanica (Ryan 2008.).

2.1.2. FAZE RASTA ŽIVOTINJSKIH STANICA



Slika 1. Krivulja rasta stanica (Davis 2011.)

Rast stanica u kulturi može se prikazati sigmoidalnom krivuljom (slika 1.). Na krivulji jasno razlikujemo lag fazu (faza sporog rasta), log fazu (faza eksponencionalnog rasta), stacionarnu fazu te fazu odumiranja. Rast stanica ovisi najviše o dostupnosti hranjivih tvari i o uvjetima uzgoja stanica (Davis,2011.).

Stanicama je potrebno da se nakon naciepljivanja prilagode na novi medij i to nazivamo lag fazom te je tijekom te faze rast veoma spor ili ga nema uopće (Davis,2011.). Također, tijekom lag faze adherentne stanice resintetiziraju elemente glikokaliksa te se vežu za prihvatnu površinu. Ova faza traje između 2 i 24 h (Leo i sur., 2008.). Trajanje ovisi o stanju stanica te o njihovoj brojnosti prilikom preciepljivanja. Stanice koje su naciepljene u većoj količini imat će kraću lag fazu, isto kao i one koje su preciepljene u fazi eksponencijalnog rasta (Davis,2011.).

Log faza jest faza u kojoj se broj stanica eksponencijalno umnožava te dolazi do aktivne proliferacije. Na trajanje ove faze najviše utječu gustuća naciepljenih stanica, brzina rasta te dostupnost površine za rast. Za vitalnost stanica su veoma važni I sastav medija, temperatura, pH, dostupnost kisika itd. Ova faza će trajati sve dok ima dovoljno hranjivih sastojaka (Davis,2011.).

Nakon eksponencijalne faze, dolazi do usporavanja rasta zbog postizanja konfluentnosti i nedostatka hranjivih tvari. Tada stanice ulaze u stacionarnu fazu, u kojoj je brzina rasta jednaka brzini odumiranja. To je također i posljedica nakupljanja metabolita u mjeri koja je toksična za stanice. Stacionarna je veoma bitna budući da dolazi do sinteze proteina specifičnih za pojedine vrste stanica i ostalih sekundarnih metabolita koji su ponekad važni, pa je slučaj da se ona dodatkom svježije hranjive podloge može produljiti.

Na poslijetku dolazi do odumiranja stanica, uzrokovano nedostatkom hranjivih tvari, kisika te iscrpljenošću stanica. Brzina odumiranja stanica ovdje je znatno veća od brzine rasta. Postoje dva različita mehanizma stanične smrti – nekroza tj. programirana stanična smrt i apoptoza tj. smrt pod utjecajem vanjskih faktora (Leo i sur., 2008.).

2.1.3. STANIČNA LINIJA OVARIJA KINESKOG HRČKA (CHO)

Stanična linija ovarija kineskog hrčka (CHO) najviše se koristi u proizvodnji rekombinantnih protein te je kao takva najčešće korištena linija u tu svrhu (gotovo 70%) (Jaypal i sur.,2007.). To su epitelne stanice, rastu pojedinačno, stabilne su i lako se održavaju. Koriste se kao adherentne zbog dobrog rasta, ali mogu se koristiti i kao suspenzijske. Zbog kvalitete i visokih prinosa nadmašile su primjenu mikrobnih stanica te se mogu koristiti bez straha od rizika zaraze (Wurm, 2013.). CHO stanična linija je vrlo dobro proučena i nacionalne regulatorne institucije (FDA i EMA) su odobrile primjenu ovih linija u biotehnoškoj proizvodnji. Također ove stanice se mogu prilagoditi na medij bez seruma (serum-free medij) te je dobro

proučen način korištenja u velikim postrojenjima. Do sada su razvijene visoko produktivne stanične linije koje mogu proizvesti i do 10 g L⁻¹ proteina (Wurm i Wurm, 2017.).

Ovu staničnu liniju prvi put je uspostavio Theodore T. Puck 1957. godine, uvidjevši da će ona postati uspješna za korištenje zbog malog broja kromosoma (2n kod kineskog hrčka iznosi 22) (Jayapal i sur.,2007.).

2.2. HRANJIVI MEDIJ ZA STANICE

Kultura stanica kineskog hrčka za moderne industrijske primjene, poput ekspresije rekombinantnih proteina, zahtjeva medije koji podržavaju rast i razvoj. Takvi mediji trebaju poduprijeti povećanje gustoće stanica s istovremenom stimulacijom sinteze bioloških produkata (Hodge,2005.). Općenito, gotovo svi mediji za stanične kulture zahtjevaju slične osnovne hranjive tvari, a to su voda, izvori ugljika, dušika i fosfata, određene aminokiseline, masne kiseline, vitamin i soli. Potrebno je točno izračunati količinu ovih komponenti ovisno o potrebama različitih kultura, kako bi se održala i produljila vitalnost stanica.

U većini medija, osobito kemijski definiranih za stanične kulture sisavaca (u ovom slučaju CHO kulture), kao primarni izvor ugljika i energije se koristi glukoza. Stanice glikolizom pretvaraju glukožu u piruvat i dalje oksidiraju dobiveni piruvat u Krebsovom ciklusu. Kao produkt energije dobije se do 36 mol ATP-a po molu glukoze. Kao alternativa glukozi, mogu se koristiti i ostale heksoze kao što su galaktoza, fruktoza i manoz. Ukoliko je koncentracija glukoze povećana, dolazi do nakupljanja laktata koji ima toksično djelovanje na stanice.

Stanice sisavaca mogu biti vrlo osjetljive na nečistoće u vodi, a ti elementi najčešće uključuju elemente u tragovima, bakterije, endotoksin te organske tvari. Kako bi se spriječile kontaminacije staničnih kultura tim nečistoćama, preporuka je koristiti visoku pročišćenu vodu. Tipični sustavi pročišćavanja uključuju destilaciju, mikrofiltraciju i reverznu osmozu. Čistoća vode se izražava preko vodljivosti ili otpora te je poželjno da sadrži niski udjel organskog ugljika i da ne sadrži endotoksin. Većina komercijalno dostupne vode u bocama posebno dizajnirana za stanične kulture zadovoljava navedene uvjete te mora postojati jamstvo da ne sadrži mikrop plazmu koja može zaraziti staničnu kulturu sisavaca.

Ključne komponente u medijima (posebno onima za uzgoj CHO stanica) su aminokiseline. Istraživanja pokazuju da minimalne promjene u sastavu aminokiselina mogu promijeniti profil rasta. Također se pokazalo da optimizacija koncentracije aminokiselina u medijima povećava gustoću stanica za više od 50% i titar za više od 25%. Uz povećanje rasta broja stanica,

aminokiseline pridonose zaštiti stanica koje rastu u bioreaktoru. Njih možemo podijeliti na esencijalne i neesencijalne. Esencijalne uključuju histidine, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan i valin. Uglavnom su sve navedene potrebne u medijima za uzgoj, a pokazalo se da se mnoge od njih troše brzo u procesima CHO stanica. Leucin, valin, izoleucin i fenilalanin je potrebno dodavati u većim koncentracijama iz razloga što se one brže troše budući da su povezane sa transportnim sustavom. Neesencijalne aminokiseline uključuju alanin, arginin, asparagin, asparaginsku kiselinu, cistein glutaminsku kiselinu, glutamin, glicin, prolin, serin i tirozin. Većina ovih aminokiselina ima značajan učinak na rast stanica i proizvodne učinke, a iako stanice u kulturi mogu sintetizirati ove aminokiseline, većina medija sadrži gotovo sve navedene aminokiseline te one imaju značajan učinak na procese stanica u kulturi (Ritacco i sur., 2018.).

Lipidi su glavne komponente membrana, a mogu poslužiti i kao izvori energije i signalne molekule. CHO stanice uglavnom mogu same sintetizirati lipide, međutim dodatak lipida pokazao se korisnim za vitalnost stanica i glikozilaciju proteina. Učinak lipida na stanice varira o vrstama lipida i prekursora. Masne kiseline i kolesterol nisu dobro topljivi u mediju te ih nije poželjno dodavati, osim u vrlo niskim koncentracijama (Ritacco i sur., 2018.).

Vitamini su također značajni za rast stanica. Većina stanica zahtjeva kompleks vitamin B, koji potiču rast i razmnožavanje stanica. Oni su često prisutni u mediju zbog topljivosti u vodi. Također, u medij se dodaju i antibiotici radi smanjenja mogućnosti kontaminacije, posebno ako nije moguće sterilizirati materijal (Freshney, 2010.).

Mediji mogu utjecati na ekonomičnost procesa, operativnost i logistiku. Cijena medija može uvelike varirati, ovisno o formulaciji. Mala povećanja produktivnosti obično mogu opravdati značajno povećanje medijskih troškova, ali skupe medije ili medijske priloge treba ocijeniti u odnosu na njihov utjecaj na produktivnost (Hodge, 2005.).

Podjela medija prema sintetskom sastavu može biti na medije koje sadržavaju serum, medije bez seruma (eng. serum-free media), medije bez proteina (eng. protein-free media) i kemijski definirane medije (eng. defined media) (Yao i Asayama, 2017.). Mediji bez seruma često sadrže ključne proteine u serumu, poput albumina, transferina i inzulina. Mogu sadržavati i proteinske hidrolizate. Iako se mnogi nedostaci seruma uklanjaju u takvim medijima, njihov visoki sadržaj proteina može uzrokovati probleme s pročišćavanjem, a mnoge komponente serum-free medija mogu se dobiti iz životinjskih izvora (Hodge, 2005.).

2.2.1. FETALNI GOVEĐI SERUM

Serum je smjesa koja se dodaje u medij za uzgoj stanica te mu je glavna uloga stimulacija rasta i staničnih aktivnosti. To je bezstanična krvna komponenta te se dobiva zgrušavanjem krvi životinjskog podrijetla. Također, serum potiče adheziju stanica, inhibira djelovanje tripsina te osigurava stanicama proteine potrebne za transport hranjivih tvari (Moraes i sur., 2008). Serum koji se trenutno najviše koristi za uzgoj staničnih kultura sisavaca jest fetalni goveđi serum (eng. fetal bovine serum-FBS). Koristi se kao univerzalni dodatak u medijima za uzgoj kulture stanica u istraživanjima, biotehnologiji i farmaceutskoj proizvodnji. FBS je predstavljen krajem 1950.-ih (Puck i sur., 1958.) kako bi se potaknuo rast u staničnoj kulturi, zato što sadrži važne komponente za rast stanica i održavanje njihovih funkcija. Iako su dostupni i goveđi serumi alternativnog podrijetla, najčešće se koristi FBS zbog niskog udjela imunoglobulina i faktora komplementa. FBS se prikuplja iz krvi nerođene teladi u bilo kojoj razvojnoj fazi dvije trećine trudnoće.

No, zbog niza nedostataka u smislu kvalitete i produktivnosti te brige o zaštiti životinja, sve više se govori o alternativama seruma. Neki od problema koje se vežu za FBS su nepoznati sastav, sezonska i zemljopisna varijabilnost (Baker, 2016.) te nenamjerna interakcija s ispitanim tvarima koja može dovesti do zabrinutosti za sigurnost laboratorijskog osoblja u smislu endotoksina, mikroplazmi i virusa ili priona (Dormont, 1999.). Cijeli proces dobivanja krvi od telećeg fetusa nije još zakonski reguliran unatoč postojećoj Direktivi EU 2010/63/EU o korištenju životinja u znanstvene svrhe. Radi svih navedenih razloga, razvijeno je nekoliko strategija za smanjenje ili zamjenu korištenja FBS-a u medijima stanične kulture. Nedavno se pokazalo da su oslobađanja aktiviranih trombocita humanih donatora jedna od najperspektivnijih alternative seruma, budući da kemijski definirani mediji još nisu opcija. Može se reći da je kemijski definirani medij bez seruma krajnji cilj većine sustava uzgoja te se raspravlja o primjerima (Van der Valk i sur., 2018.).

2.3. PROTEINSKI HIDROLIZATI U BIOTEHNOLOGIJI

Kao što je navedeno, serumi životinjskog podrijetla, uključujući goveđi serum, često su uzročnici infekcija te se zbog toga u industriji nastoje koristiti medije koji nisu životinjskog podrijetla. Prvi korak prema takvim medijima bez seruma bili su proteinski hidrolizati životinjskog podrijetla. Potraga za medijem koji konkurira mediju sa serumom životinjskog podrijetla, ali bez pratećih rizika po biološku sigurnost izazvala je sve veći interes za uporabu biljnih proteinskih hidrolizata, poput onih dobivenih iz soje, pšenice, riže, graška i sjemenki

pamuka (A. Siemensma i sur., 2010.). Proteinski hidrolizati definirani su kao "mješavine polipeptida, oligopeptida i aminokiselina koje se proizvode iz izvora proteina djelomičnom hidrolizom". Proteini obavljaju brojne ključne funkcije u tijelu, uključujući izgradnju i popravak tkiva, signalizaciju stanica i opskrbu energijom (4 kcal/g proteina) te također obavljaju enzimske i strukturne funkcije (McCarthy i sur., 2013.). Proteinski hidrolizati komercijalno su dostupni iz animalnih tkiva, mliječnih proizvoda, mikroorganizama i biljaka. Poznati su i kao potencijalni izvori metabolizirajućih komponenti uključujući aminokiseline, oligopeptide, soli željeza, lipide i neke elemente u tragovima (Chun i sur., 2007.).

Daleko najvažniji spojevi koje hidrolizati opskrbljuju su aminokiseline i peptidi. Trenutno još nije moguće odgovoriti na pitanje imaju li veću ulogu u rastu i aktivnosti stanica male peptidne frakcije ili veliki peptidi. Postoji više različitih hipoteza o mogućoj ulozi proteinskih hidrolizata. Jan i sur. (1994.), Schlaeger (1996.) i Heidemann i sur. (2000) su pretpostavili da mješavine različitih peptida niske molekulske mase opskrbljuju stanice aminokiselinama koje mogu oponašati optimizirani sadržaj slobodnih aminokiselina u mediju bez proteina. Ipak, Rasmussen i sur. (1998) zaključili su da bi peptidi u biljnim hidrolizatima mogli funkcionirati kao čimbenici rasta CHO stanica. Heidemann i sur. (2000) također sugeriraju potencijalni učinak oligopeptida veće molekulske kao čimbenike rasta ili preživljavanja. Mediji s niskim udjelom proteina i bez proteina, obogaćeni hidrolizatima proteina biljnog podrijetla, mogu učinkovito podržati rast i produktivnost CHO staničnih linija u odsutnosti seruma (Verhoeve i sur. 2001).

2.3.1. HIDROLIZAT LANA

Lan je jednogodišnja biljka iz porodice *Linnaceae* i jedna od najstarijih ratarskih kultura s prostora Azije i Kavkaza. Različiti dijelovi biljke lana, stabljika i sjemenke, koriste se u različite svrhe (Amin i Thakur, 2014.). Laneno sjeme bogato je uljem koje uglavnom sadrži polinezasićene masne kiseline, ali što je još važnije bogato je proteinima (22,4% proteina u cijelom suhom sjemenu) (Oomah & Mazza, 1993.). Za proizvodnju proteinskog hidrolizata uglavnom se koristi uljna pogača lana. Uljna pogača je nusprodukt dobiven nakon ekstrakcije ulja iz sjemenki, a lanena pogača konkretno nastaje kao kruti ostatak zaostao hladnim prešanjem lanenih sjemenki. Najzastupljeniji minerali u pogači lana su kalcij, kalij, fosfor i mangan. Također su bogate i masnim kiselinama, najviše linolenska, linolna i oleinska. (Ogunronbi, 2011.) Pogača lana je vrlo bitan izvor proteina (cca. 27%) te polisaharida (cca.10%) (Gutierrez, 2010.).

2.4. ALBUMIN

Kemijski definirani dodaci koji pospješuju rast i produktivnost sve više privlače znanstvenike koji se bave projektima optimizacije stanične kulture. Rekombinantni proteini se koriste kao takvi u proizvodnji biofarmaceutika, cjepiva i matičnih stanica. Njihovo korištenje je vrlo važan korak u kretanju prema preoizvodnji hranjivih medija bez korištenja životinjskih izvora. Rekombinantni proteini omogućuju zamjenu proteina koji su u prošlosti bili dostupni samo putem izvora životinja ili frakcioniranjem krvi donora (Sargent, 2012.).

Jedan od takvih proteina jest i albumin. Albumin je najzastupljeniji protein u serumu te ima mnoge funkcije u staničnoj kulturi. Povećava opće zdravlje i produktivnost stanica transportom lipida koji vežu toksine. Također, veže slobodne radikale koji mogu oštetiti stanice i uzrokovati apoptozu. Zbog navedenih prednosti, dodavanjem albumina u medij bez seruma osigurava se povećanje rasta i bolja produktivnost (Sargent, 2012.). Potencijalna primjena goveđeg ili humanog serumskog albumina za staničnu kulturu, nusprodukt je fizikalno-kemijskih i biokemijskih svojstava molekule. Vrlo važna uloga albumina jest i interakcija sa liganfima ili bioaktivnim čimbenicima koji utječu na rast stanica u kulturi, kao što su hormoni, faktori rasta, lipidi, aminokiseline itd. Interakcija albumina sa stanicom u odnosu na te čimbenike može imati utjecaj na aktivnost, metabolizam i preživljavanje stanice (Francis, 2009.). Albumin se također koristi u drugim područjima proizvodnje, posebno u formulacijama za stabilizaciju virusnih i proteinskih cjepiva. U mnogim staničnim linijama znanstvenici su uspjeli ukloniti serum iz medija, no morali su nadopuniti bilo goveđim albuminom (BSA) ili serumskim albuminom dobivenim iz donatora ljudske krvi (pHSA) za održavanje zdravih stanica. Do nedavno nisu bile dostupne rekombinantne opcije albumina, pa je to uklanjanje seruma s nekih staničnih linija učinilo gotovo nemogućim. Sada kada je rekombinantni albumin dostupan, jasno je da će se usvajanje ovog proteina nastaviti, osobito u staničnim linijama gdje se serum još uvijek koristi ili gdje se dodaju proteini. Korištenje rekombinantnog albumina može pomoći kod prijelaza na serum-free medije pri uzgoju staničnih kultura (Sargent, 2012.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Pri izradi ovog eksperimentalnog rada korišteni su proteinski hidrolizati uljne pogače lana dobiveni djelovanjem enzima *Neutraxe* (HLN) i *Protamexa* (HLP). Korišteni proteinski hidrolizati pripremljeni su u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije.

3.1.1. Kemikalije

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Sigma, ST. Louis, SAD
- Fetalni goveđi serum (FBS), Gibco BRL, SAD
- Tripsin-EDTA, Sigma, St. Louis, SAD
- Tripan-plavo, Sigma, St. Louis, SAD
- Octena kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Phosphate buffered saline (PBS), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Antibiotik antimikotik, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Metotreksat (MTX), Cerilliant, SAD
- Rh-inzulin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Elementi u tragovima A, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Elementi u tragovima B, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Goveđi serumski albumin (BSA), Sigma-aAldrich, SAD
- Proteinski hidrolizata dobiven djelovanjem enzima *Protamex*
- Proteinski hidrolizat dobiven djelovanjem enzima *Neutrase*

3.1.2. Otopine

Reagens za određivanje glukoze (Glucose GOD-PAP, BIOLABO, Maizy, Francuska)

- fosfatni pufer (pH 7.5) $0,150 \text{ molL}^{-1}$
- klor-4-fenol 2 mmolL^{-1}
- 4-Aminoantipirin (PAP) 0.8 mmolL^{-1}
- glukozaoksidaza (GOD) $\geq 20 \text{ kU L}^{-1}$
- peroksidaza (POD) $\geq 1.0 \text{ kU L}^{-1}$

Reagensi za određivanje laktata (L-Lactatic Acid Assay Kit, Megazyme, Bray, Irska)

- R1: Pufer (pH 10)
D-glutamat i natrijev azid (0,02% w/v) kao konzervans
NaN₃
- R2: NAD⁺/PVP
- R3: D-glutamat-piruvat transaminaza
- R4: L-laktat dehidrogenaza

3.1.3. Uređaji i oprema

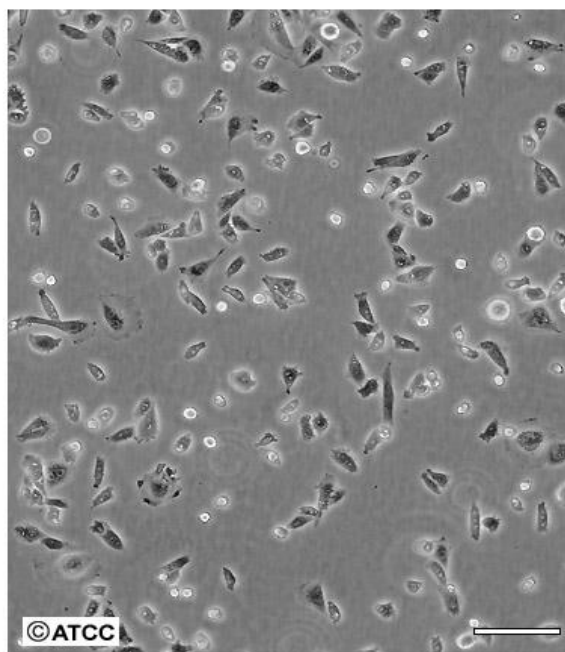
- inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Iskra PIO, Slovenija

- komora za sterilni rad (laminar flow cabinet), Kambič, Slovenija
- inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Neubaerova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright - Line, Njemačka
- Petrijeva zdjelica, TPP, Švicarska
- ploče s jažicama, Corning, SAD
- laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, kivete, epruvete)
- laboratorijska vaga, Boeco, Njemačka
- hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- hladnjak (-80 °C), , DF 290, NUVE, Turska
- spektrofotometar Thermo Scientific Genesys 10 S UV/VIS, SAD

3.1.4. Stanična linija CHO DP-12

Stanična linija CHO DP-12 je adherentna stanična linija fibroblasta ovarija kineskog hrčka (Slika 2). Navedena stanična linija proizvodi anti-IL8, rekombinantno humano monoklonsko protutijelo, izotopa IgG. Pohranjena je u American Type Cell Collection banci 8 Manassas, Virginia, SAD, kao stanična linija (ATCC®CRL 12444TM).

ATCC Number: **CCL-61**
Designation: **CHO-K1**



Low Density

Scale Bar = 100µm

Slika 2. CHO DP-12 stanična linija. (Izvor: <https://www.atcc.org/products/ccl-61>)

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj CHO DP-12 stanica u Petrijevim zdjelicama

Uzgoj započinje odmrzavanjem stanica koje se čuvaju zamrznute u mediju za zamrzavanje na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ampule sa zamrznutim stanicama (1 mL) u koncentraciji od $5 \cdot 10^6$ stanica mL^{-1} odmrznu se naglim uranjanjem u vodenu kupelj na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sadržaj se prenese u sterilnu kivetu te se u nju doda 5 mL medija za uzgoj. Stanice se odvajaju centrifugiranjem tijekom 5 minuta na $1000\text{ okretaja min}^{-1}$. Supernatant se zatim pažljivo ukloni, a talog stanica se resuspendira u mediju za uzgoj. Stanice se prebace u petrijevu zdjelicu koja se stavlja u inkubator na temperaturu od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz odgovarajuću atmosferu (95 % zraka + 5 % CO_2). Za uzgoj stanica korišten je bazalni DMEM hranjivi medij kojemu su naknadno dodane određene komponente potrebne za uzgoj CHO DP-12 stanica: fetalni goveđi serum (5% v/v), rekombinantni humani inzulin (0.02 % v/v), metotreksat (0.01% v/v), elementi u tragovima A (0.1 % v/v), elementi u tragovima B (0.1 % v/v) te antibiotik (1% v/v). Pod inverznim mikroskopom se svakodnevno vrši provjera prihvaćanja stanica za podlogu, njihova morfologija, brojnost i opće stanje. Nagla promjena boje DMEM medija, koji standardno sadrži fenolno crvenilo kao indikator, često ukazuje na pojavu kontaminacije u kulturi, stoga je nužno pratiti i boju tijekom uzgoja. Nakon što prekriju više od 80% dostupne površine za rast, stanice se precjepljuju.

3.2.2. Praćenje utjecaja albumina i hidrolizata na rast CHO DP-12 stanica

Za potrebe ovog eksperimenta pripremljeno je šest različitih medija. Tijekom pripreme, u DMEM medij su dodane sve komponente prethodno spomenute u poglavlju 3.2.1., izuzev FBS-a. Također, dodane su i komponente čiji se učinak na rast CHO DP-12 htio ispitati, a navedene su u tablici 1. Prethodno uzgojene stanice su nacjepljene na ploču sa 24 jažice u početnoj koncentraciji od $25\ 000\text{ st. mL}^{-1}$ u 0,5 mL jednog od pripremljenih medija.

Tablica 1. Sastav ispitivanih medija za uzgoj stanica.

Medij	Komponenta dodana u DMEM medij:	Skraćeni naziv:
-------	---------------------------------	-----------------

Medij 1.	10% fetalni goveđi serum	10% FBS
Medij 2.*	4 g L ⁻¹ goveđi serumski albumin + 0,5 g L ⁻¹ proteinskog hidrolizata lana dobivenog djelovanjem enzima <i>Neutrased</i>	4 g L ⁻¹ BSA + 0,5 g L ⁻¹ HLN
Medij 3.*	1 g L ⁻¹ goveđi serumski albumin + 0,5 g L ⁻¹ proteinskog hidrolizata dobivenog djelovanjem enzima <i>Neutrased</i>	1 g L ⁻¹ BSA + 0,5 g L ⁻¹ HLN
Medij 4.*	4 g L ⁻¹ goveđi serumski albumin + 0,5 g L ⁻¹ proteinskog hidrolizata djelovanjem enzima <i>Protamed</i>	4 g L ⁻¹ BSA + 0,5 g L ⁻¹ HLP
Medij 5.*	1 g L ⁻¹ goveđi serumski albumin + 0,5 g L ⁻¹ proteinskog hidrolizata dobivenog djelovanjem enzima <i>Protamed</i>	1 g L ⁻¹ BSA + 0,5 g L ⁻¹ HLP
Medij 6.*	4 g L ⁻¹ goveđi serumski albumin	4 g L ⁻¹ BSA

* Dodan 1% FBS 48h nakon postavljanja stanične kulture

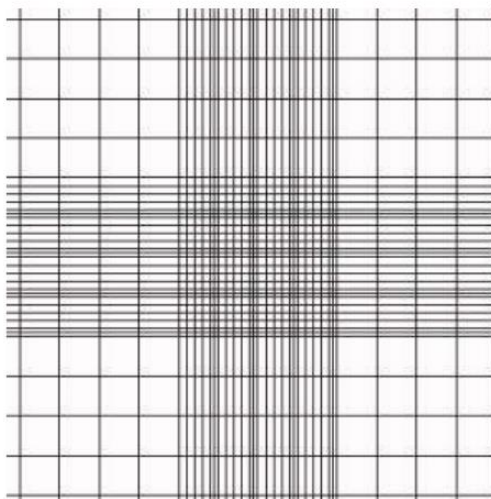
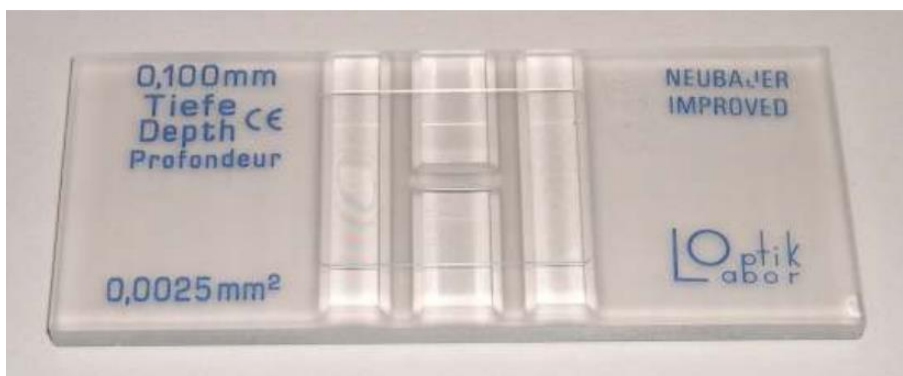
Prethodno uzgojene stanice su naciepljene na ploču sa 24 jažice u početnoj koncentraciji od 25 000 st. mL⁻¹ u 0,5 mL jednog od pripremljenih medija.

Rast je praćen brojanjem stanica kroz 10 dana u Neubaerovoj komorici uz dodatak bojila tripan-plavo. Nakon 2. dana u jažice s albuminom i hidrolizatima dodano je po 0,5 g L⁻¹ seruma iz razloga što se stanice nisu dobro prihvatile na podlogu. Prije svakog brojanja, iz jažica je izuzeto 0,5 mL medija koji je pohranjen u Eppendorf kivete te stavljen u zamrzivač kako bi se sačuvalo za analize glukoze i laktata. Zatim je jažica isprana sa 0,1 mL PBS-a kako bi se uklonili ostatci medija. Nakon toga, dodano je 0,1 mL tripsina kako bi se stanice odvojile od podloge te se inkubira 10 minuta na 37°C. Zatim se pod reverznim mikroskopom provjerilo djelovanje tripsina (ukoliko su se stanice odvojile od podloge bit će kružnog oblika). Odvojenim stanicama dodano je 0,2 mL medija sa serumom kako bi se zaustavila reakcija tripsinizacije. Stanice se resuspendiraju te se uzme 10 µL suspenzije stanica za bojanje.

3.2.3. Određivanje broja stanica metodom Trypan plavo

Za određivanje broja stanica koristi se metoda tripan-plavo. Uzorak za bojanje se priprema tako da prethodno uzetih 10 μL suspenzije stanica pomiješamo sa 10 μL tripan-plavo bojila. Taj uzorak se resuspendira te se od njega uzima alikvot od 10 μL i nanosi se na Neubenbauerovu komoricu, koja se sastoji od 9 kvadrata (slika 3.) čija je površina 0,0025 mm^2 i dubina 0,1 mm. Brojanje stanica se provodi unutar 4 kvadrata koja su podijeljena na 16 manjih kvadrata. Mrtve se stanice razlikuju od živih po tome što se zbog oštećene membrane boje plavo, dok se žive stanice ne oboje. Broj stanica se računa prema formuli:

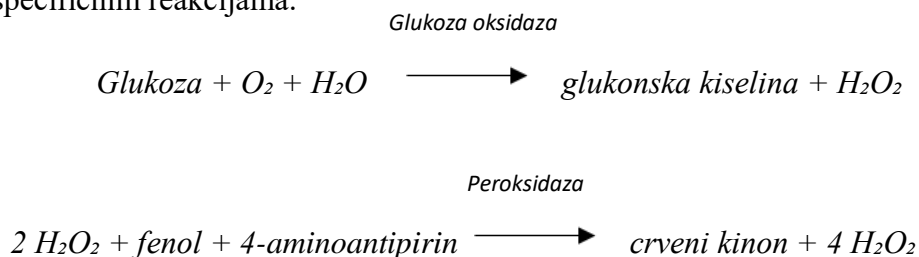
$$\text{Broj stanica / mL suspenzije} = (\text{broj stanica izbrojenih u sva 4 kvadrata}) \times 5000 \times \text{faktor razrjeđenja} \quad [1]$$



Slika 3. Neubaureova komorica i shema mrežice za brojanje stanica u komorici. (Izvor: <https://vdocuments.mx/ofb-vezba-6.html>)

3.2.4. Određivanje koncentracije glukoze u hranjivom mediju

Koncentracija glukoze određuje se PAP metodom. To je kolorimetrijska metoda koja služi za in vitro određivanje koncentracije. Određivanje glukoze iz uzoraka medija odvija se prema sljedećim specifičnim reakcijama:

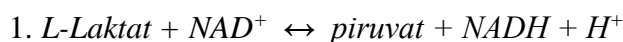


Standard za određivanje je glukoza koncentracije $5,5 \text{ mmolL}^{-1}$. Uzorak je pripremljen na način da je u epruvetu otpipetirano 1 mL otopine reagensa, te 10 μL uzorka medija za uzgoj ili standarda glukoze. Slijepa proba je umjesto uzorka sadržavala destiliranu vodu. Uzorci su zatim inkubirani na temperaturi od $37 \text{ }^\circ\text{C}$ kroz 10 minuta. Koncentracija glukoze proporcionalna je koncentraciji crvenog kinona koja se određuje spektrofotometrijski na temelju intenziteta obojenja njegove otopine. Mjerenje apsorbancije se provodi pri valnoj duljini od 500 nm. Koncentracija glukoze se izračuna prema formuli:

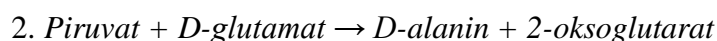
$$\text{Koncentracija glukoze} = \frac{A(\text{uzorka})}{A(\text{standard})} \times 5 \text{ mM } [gL^{-1}] \quad [2]$$

3.2.5. Određivanje koncentracije laktata u hranjivom mediju

Određivanje L-mliječne kiseline zahtijeva dvije enzimske reakcije trajanju od cca. 10 min. U prvoj reakciji koju katalizira L-laktat dehidrogenaza, L-mliječna kiselina (L-laktat) se oksidira u piruvat pomoću NAD^+ .



Međutim, budući da ravnoteža reakcije (1.) čvrsto ide u korist L-mliječne kiseline i NAD^+ , potrebna je još jedna reakcija kako bi se zadržao produkt piruvata. To se postiže pretvorbom piruvata u D-alanin i 2-oksoglutarat uz pomoć enzima D-glutamat-piruvat-transaminaza (D-GPT) uz suvišak D-glutamata.



Količina NADH nastala u gornjoj reakciji u stehiometrijskom je odnosom s količinom L-mliječne kiseline. Nastali NADH mjeri se pri apsorbanciji od 340 nm. Reagensi za određivanje laktata uzeti su iz posebnog kita za određivanje laktata (© Megazyme 2018.) U kivetu za

mjerenje apsorbancije uzorka dodamo 0,375 mL destilirane vode, 0,025 mL uzorka za određivanje, 0,125 mL smjese pufera pH 10 i D-glutamata, 0,025 mL otopine NAD⁺/PVP te 0,005 mL otopine D-GTP, zatim nakon otprilike 3 minute inkubacije izmjerimo apsorbanciju A₁ pri valnoj duljini od 350 nm. Nakon toga dodajemo 0,005 mL otopine L-LDH. Potrebno je pričekati 10 minuta na sobnoj temperaturi te izmjeriti apsorbanciju A₂. Koncentracija laktata računa se pomoću slijedeće formule:

$$\text{Koncentracija (laktat)} = 0,3204 \times \Delta A(L\text{-laktat}) \times 11,1 \times \text{factor razrjeđenja} \quad [\text{gL}^{-1}] \quad [3]$$

3.2.6. Određivanje specifične brzine rasta CHO stanica

Specifična brzina rasta stanica (μ) određuje se prema jednadžbi:

$$\mu = \frac{\ln(N) - \ln(N_0)}{\Delta t} \quad [4]$$

Gdje je:

μ - specifična brzina rasta (h^{-1})

N – broj stanica na kraju log faze

N_0 – broj stanica na početku log faze

Δt – vremenski interval (h)

3.2.7. Određivanje specifične brzine potrošnje glukoze (q_{glc})

Specifična potrošnja supstrata, u ovom slučaju glukoze određuje se prema sljedećoj jednadžbi:

$$q_{\text{glc}} = \frac{\Delta S}{T} \times \frac{\ln(N) - \ln(N_0)}{N - N_0} \quad [5]$$

Gdje je:

q_{glc} – specifična potrošnja glukoze ($\text{mmol stanica}^{-1} \text{ dan}^{-1}$)

N – konačni broj stanica

N_0 – početni broj stanica

T – vrijeme (dan)

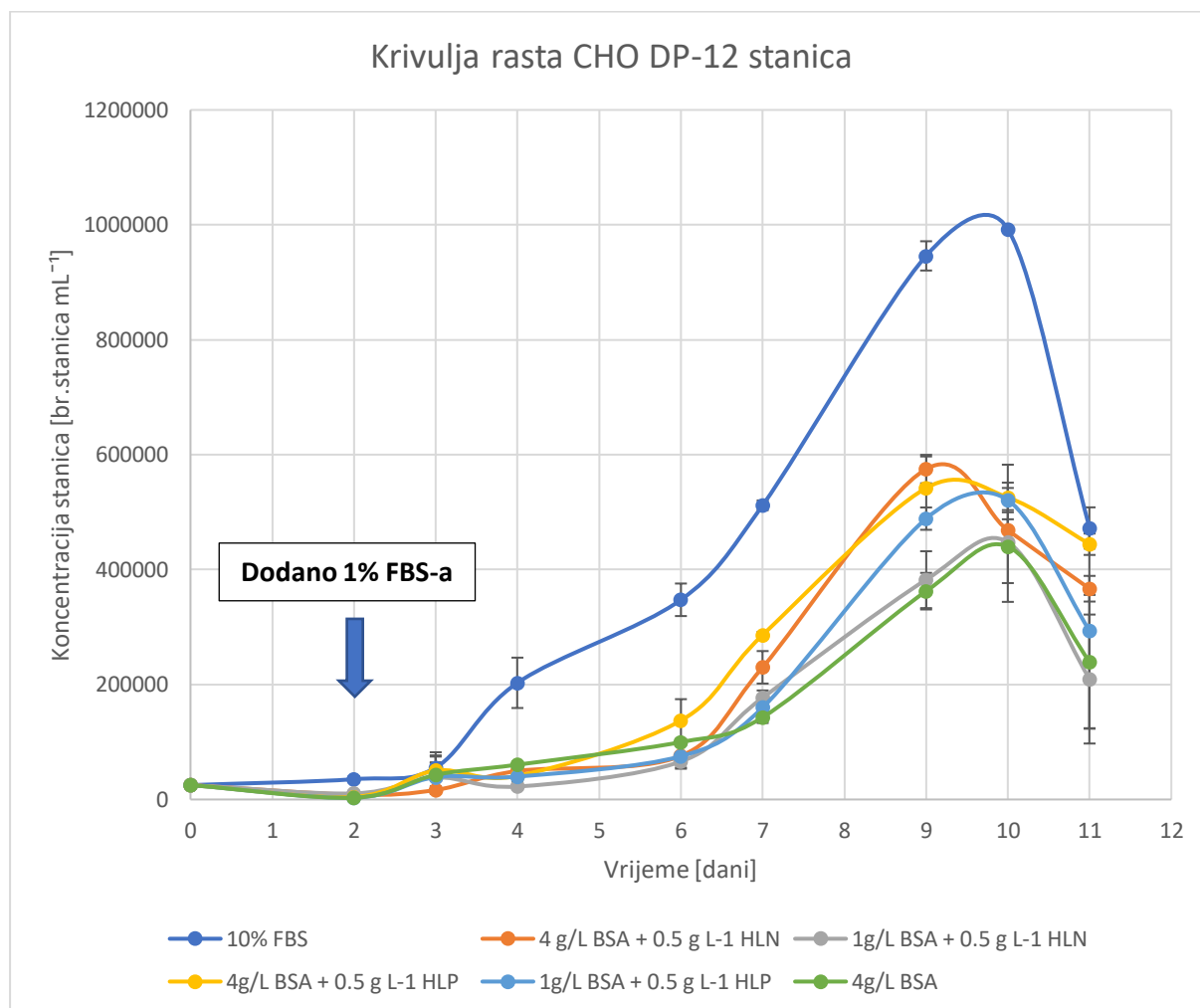
4. REZULTATI I RASPRAVA

Rani razvoj i potreba za rješavanjem problema vezanih za komponente životinjskog podrijetla rezultirali su primjenom rekombinantnih proteina koji zamjenjuju komponentne životinjskog podrijetla. (Francis, 2010.) Iako se serum i danas koristi kao glavni izvor proteina, vitamina, hormona itd., problemi vezani uz isti sve se više ističu. Etička pitanja, visoke cijene, mogućnosti kontaminacije te slaba dostupnost su uzroci sve većeg ispitivanja i korištenja medija bez seruma (tzv. *serum-free*) medija i kemijski definiranih medija. (Butler, 2013.) Radi svih navedenih razloga, potražnja za optimalnim medijem za uzgoj stanica je sve veća. Albumin se smatrao vrlo poželjnim čimbenikom uzgoja stanica i staničnih linija u odsutnosti seruma, budući da je najzastupljeniji protein u serumu. Istraživanja su pokazala da ima mnoge funkcije u staničnoj kulturi te da ima pozitivan utjecaj na opće zdravlje i produktivnost stanica te je to posljedica fizikalnih, kemijskih i biokemijskih svojstava molekule. Zbog navedenih prednosti, dodavanjem albumina u medij bez seruma osigurava se povećanje rasta i bolja produktivnost. (Sargent, 2012.) Stoga je i cilj ovoga rada bio proučiti rast stanica u mediju s albuminom, te s albuminom u kombinaciji sa proteinskim hidrolizatima lana i konoplje u odnosu na rast stanica u mediju sa serumom.

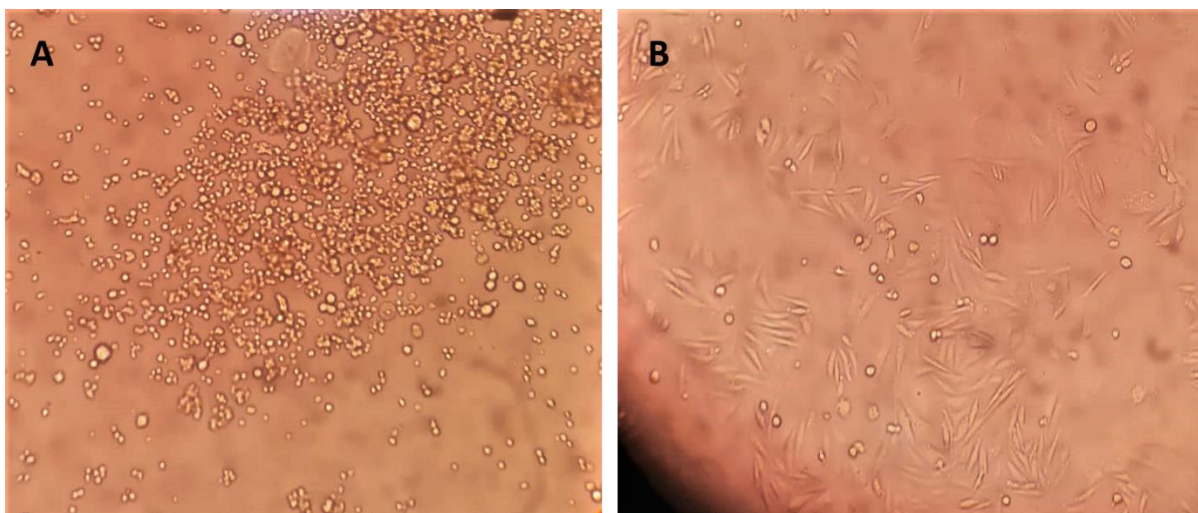
4.1. Rast CHO DP-12 u medijima s različitim udjelima seruma, proteinskih hidrolizata i albumina

Stanice su naciepljene u početnoj koncentraciji od 25 000 st./mL u 0,5 mL DMEM medija za uzgoj s različitim koncentracijama seruma (FBS) i proteinskih hidrolizata lana (HL) te goveđeg albumina (BSA). Kao što je navedeno u prethodnom poglavlju, pripremljeno je više medija koji su sadržavali 10% FBS-a, 4 g L⁻¹ albumina + 0,5 g L⁻¹ hidrolizata lana, 1 g L⁻¹ albumina + 0,5 g L⁻¹ hidrolizata lana, 4 g L⁻¹ albumina + 0,5 g L⁻¹ hidrolizata konoplje, 1 g L⁻¹ albumina + 0,5 g L⁻¹ hidrolizata konoplje te jedan samo s albuminom (4 g L⁻¹). Za navedenu koncentraciju hidrolizata dodanih u medij odlučili smo se na temelju rezultata ostvarenih u ranijim istraživanjima (Logarušić i sur., 2021.). Prema tim rezultatima suplementacija DMEM medija, sa smanjenim udjelom seruma, daje nesto začajnniji stanični rast i produktivnost. Rast stanica je praćen brojanjem stanica kroz 10 dana pomoću svjetlosnog mikroskopa i hemocitometra (Neubaerova komorica) uz dodatak bojila tripan-plavo. Rezultati praćenja rasta stanica grafički su prikazani krivuljama (slika 4.). Nakon drugog dana dodano je 1 % (0,5 g L⁻¹

1) seruma u medije 2., 3., 4., 5. i 6. zbog niže navedenih razloga. Na slici 5. a) i b) prikazane su stanice prije i poslije dodatka 1 % seruma te je jasno vidljivo da su stanice dan nakon dodatka seruma poprimile očekivanu morfologiju i izduženi oblik te su čvršće prijanjale za podlogu.



Slika 4. Rast stanica CHO DP-12 u bazalnom hranjivom mediju (DMEM) s različitim udjelima dodanog seruma (FBS) i proteinskim hidrolizatima lana (HLP i HLN). U medije suplmenetirane BSA i proteinskim hidrolizatima, 48h nakon nakon postavljanja kulture dodan je FBS (1%) kako bi se potaklo stanice na adheziju i rast.

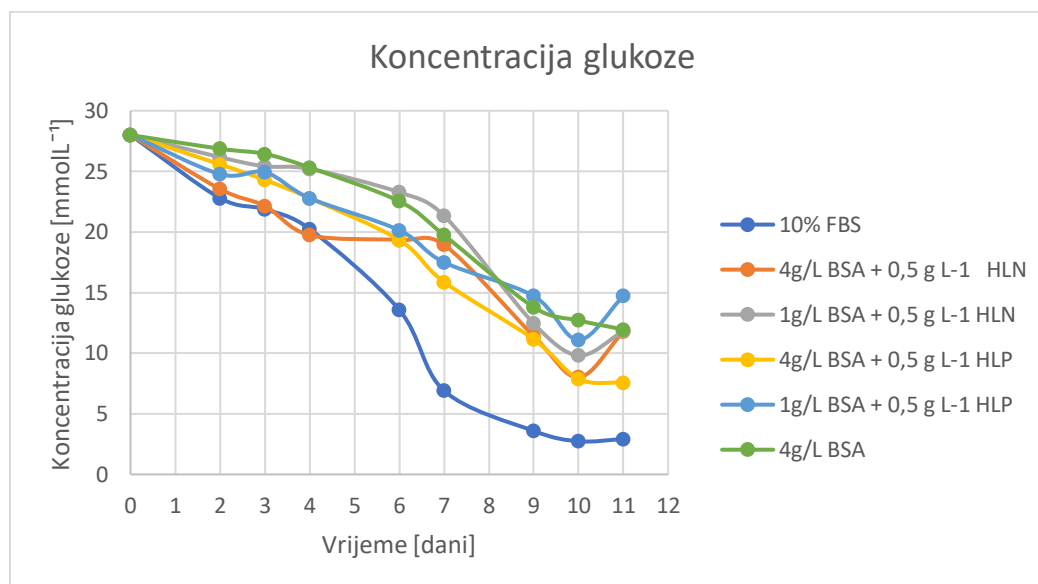


Slika 5. A) CHO DP-12 stanice u mediju s albuminom i hidrolizatima, a bez seruma; B) CHO DP-12 stanice u istom mediju dan nakon dodatka 0,5 g L⁻¹ seruma.

Iz krivulje rasta jasno je vidljivo da je u mediju s 10% seruma postignut najbolji rast stanica. Taj rezultat ne začuđuje s obzirom da se radi o standardnom sastavu medija, u kojem se redovito odvija njihov uzgoj. Stanice u mediju bez seruma nisu pokazivale isti trend rasta te su i morfološki ukazivale na nepovoljnost uvjeta u kojem su postavljene (zrnatost citosola, loša adhezija) (slika 5A). Porast broja stanica u tim medijima zapažen je tek nakon dodatka 0,5 g L⁻¹ seruma u medije, 48h sati od naciepljivanja (slika 5B). To je zbog toga što neke komponente seruma potiču adheziju stanica, a što sam albumin, sa ili bez hidrolizata, u mediju ne čine (Moraes i sur., 2008.). Iz tog su razloga stanice naciepljene u mediju bez seuma počele zamjetno rasti tek 48 sati nakon dodatka 0,5 g L⁻¹ seruma. Najslabiji rast su postigle stanice koje su rasle samo uz dodatak albumina. To je također očekivano, s obzirom na nedostatak većih količina seruma ili hidrolizata kao izvora aminokiselina, vitamina, hormona i faktora rasta. Pri uobičajenom uzgoju CHO-stanica preporuča se dodavanje fetalnog goveđeg seruma u količinama između 5% i 10% te je pri tome rast stanica najbrži. (Ozturk i Palsson, 1991.) U medijima koji su sadržavali veću koncentraciju albumina (4 g L⁻¹) uz dodatak 0,5 g L⁻¹ hidrolizata (mediji 2 i 4), može se zapaziti bolji rast nego kod onih sa manjom koncentracijom albumina. Pri prvom mediju krivulja doseže vrh između devetog i desetog dana. Nakon toga koncentracija stanica je već idućeg dana mnogo manja. Slično je i kod ostalih medija, dok su 2 i 4 najviše vrijednosti dosegli nešto ranije u usporedbi s ostalim medijima.

4.2. Praćenje potrošnje glukoze i nastajanja laktata

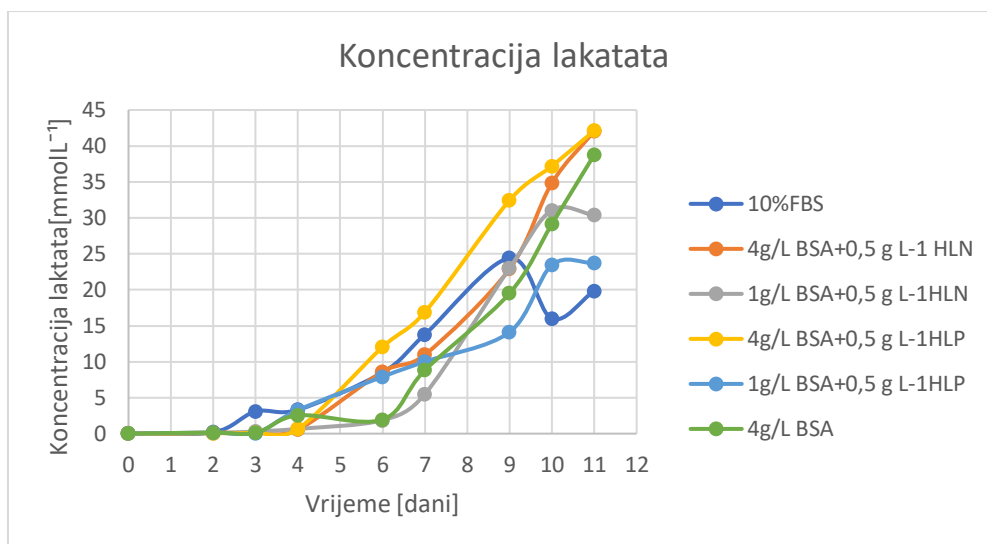
Tijekom uzgoja stanica svakodnevno su izdvajani uzorci medija (0.5 mL), te su u njima određivane koncentracije metabolita. Praćena je potrošnja glukoze te nastanak laktata u pojedinim uvjetima uzgoja. Rezultati su prikazani u obliku krivulje (slika 6. i 7.).



Slika 6. Koncentracija glukoze u medijima tijekom uzgoja stanične kulture CHO DP-12.

Iz krivulje je vidljivo da koncentracija glukoze pada s porastom broja stanica. Kao što je već spomenuto, glukoza je u većini medija primarni izvor energije te je zato i očekivano da potrošnja glukoza pada s povećanjem broja stanica. Tako je u mediju koji sadrži 10% seruma utvrđen najveći pad koncentracije glukoze, a u mediju koji sadrži samo albumin najmanji je pad koncentracije. Najveći pad jest u eksponencijalnoj fazi rasta stanica, budući da stanice tada najviše troše glukozu. U lag-fazi koncentracija stanica jest manja, pa je stoga potrošnja glukoze manja, što je također vidljivo na krivulji.

Ako uspoređujemo krivulju rasta i krivulju potrošnje glukoze, može se uočiti da je u mediju koji sadrži 10% seruma tijekom eksponencijalne faze nagli pad koncentracije glukoze, dok je tijekom lag-faze smanjena potrošnja glukoze. To je također i slučaj kod ostalih medija, ali kako je u tim medijima manji porast broja stanica tako i koncentracija glukoze sporije opada.



Slika 7. Koncentracija laktata u medijima tijekom uzgoja stanične kulture CHO DP-12.

Laktat je produkt metabolizma stanica do kojeg dolazi trošenjem glukoze. Kako se glukoza troši i njezina koncentracija u mediju pada, tako istovremeno koncentracija laktata s raste. Važno je napomenuti da je glukoza često limitirajući faktor i da može dovesti do smrti stanica, budući da što je veća koncentracija glukoze, nastaje veća koncentracija laktata koji ima nepovoljno djelovanje na stanični rast (Ritacco i sur., 2018.). Ako promatramo stanični uzgoj s 10% seruma, može se primjetiti da koncentracija laktata prati krivulju rasta. Koncentracija laktata najviša je tijekom eksponencijalne faze jer tada stanice najbrže rastu, a kasnije tijekom stacionarne faze se proizvodnja laktata smanjuje te se nakupljeni laktat dijelomčno i razgrađuje.

Tablica 2. Učinak sastava hranjivog medija (DMEM) na najveću specifičnu brzinu rasta stanica (μ_{\max}), broj stanica te specifičnu brzinu potrošnje glukoze (q_{glc}).

Medij	Dodatak mediju (DMEM)	μ_{\max} (h^{-1})	Najveći broj stanica	q_{glc} ($\text{mmol stanica}^{-1} \text{ dan}^{-1}$)
1	FBS 10%	0,0242	992500	$9,61 \cdot 10^{-6}$
2	Albumin 4 g L^{-1} HLN $0,5 \text{ g L}^{-1}$ FBS $0,5 \text{ g L}^{-1}$	0,0196	575000	$1,14 \cdot 10^{-5}$
3	Albumin 1 g L^{-1} HLN $0,5 \text{ g L}^{-1}$ FBS $0,5 \text{ g L}^{-1}$	0,0173	447604	$1,11 \cdot 10^{-5}$
4	Albumin 4 g L^{-1} HLP $0,5 \text{ g L}^{-1}$ FBS $0,5 \text{ g L}^{-1}$	0,0222	541916	$1,22 \cdot 10^{-5}$
5	Albumin 1 g L^{-1} HLP $0,5 \text{ g L}^{-1}$ FBS $0,5 \text{ g L}^{-1}$	0,0239	520958	$1,03 \cdot 10^{-5}$
6	Albumin 4 g L^{-1} FBS $0,5 \text{ g L}^{-1}$	0,0231	440119	$1,11 \cdot 10^{-5}$

U tablici 2. je vidljivo da je najveća specifična brzina rasta (μ_{max}) tamo gdje je postignut najveći broj stanica, tj. u mediju s 10% FBS-a. Najveća specifična brzina rasta računa se tijekom log-faze što znači da stanice tad najbrže i najujednačenije rastu. Također, poprilično visoke brzine rasta ostvarene su u medijima 5 i 6, ali one su trajale relativno kratko pa je najveći postignuti broj stanica u kulturi ostao nizak. Specifična brzina potrošnje glukoze ne razlikuje se značajno u ispitivanim uvjetima. Ako se dobivene vrijednosti usporede s konačnim koncentracijama laktata (slika 7.) to znači da su stanice u standardnom mediju s 10% FBS-a učinkovitije trošile glukozu na rast.

5. ZAKLJUČCI

1. Testirani udjeli proteinskih hidrolizata sjemenki lana, HLN i HLP, te BSA, dodanih u DMEM, nisu povoljno utjecali na rast CHO DP-12 stanica te nisu dobra zamjena za fetalni goveđi serum.
2. Bazalni medij (DMEM) koji sadrži 10% seruma (FBS) bolje pogoduje rastu CHO DP-12 stanica u usporedbi s medijem koji sadrži samo 1% FBS te je suplementiran s BSA i proteinskim hidrolizatima HLN i HLP.

6. LITERATURA

Aiello G., Fasoli E., Boschin G., Lammi C., Zanoni C., Citterio A., Arnoldi, A. (2016) Proteomic characterization of hempseed (*Cannabis sativa* L.). *Journal of Proteomics* 147: 187.–196.

R.E. Aluko, Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Proteins: Composition, Structure, Enzymatic Modification, and Functional or Bioactive Properties; 2017.; DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00007-X> , 121.-133. str.

Alves P. M., Carrondo M. J. T., Cruz P. E. (2008) Introduction to animal cell technology, U: *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy* (Castilho L. R., Moraes A. M., Augusto E. F. P., Butler M., ured.), Taylor & Francis Group. str. 4.

M. Butler, Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68 (2005) 283–291, doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1980-8>

Butler M. (2013) Serum-free media: standardizing cell culture system. *Pharmaceutical Bioprocessing* 1(4): 315. – 318.

Callaway, J. C. (2004) Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* 140, 65–72.

Chun, B. H., Kim, J. H., Lee, H. J., Chung, N. H. Usability of size-excluded fractions of soy protein hydrolysates for growth and viability of Chinese hamster ovary cells in proteinfree suspension culture. (2007.) *Bioresource Technol.* 98, 1000–1005.

Davis J.M. (2011) *Animal Cell Culture: Essential Methods*. Wilry-Blackwell, Chichester
Geoffrey L. Francis, Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications, *Cytotechnology* (2010) 62 str. :1–16. ; DOI 10.1007/s10616-010-9263-3

Freshney, R. I. (2010) *Animal Cell Culture: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6. izd., John Wiley & Sons Inc., Hoboken

Gutierrez C., Rubilar M., Jara C., Verdugo M., Sineiro J., Shene C. (2010) Flaxseed and flaxseed cake as a source of compounds for food industry. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10, 454.-463.

Hodge G., Media Development for Mammalian Cell Culture- May 1, 2005.
BioPharm International, Volume 18, Issue 5, Str. 40.–45.

Jayapal K. P., Wlaschin K. F., Hu W. S., Yap M. G. S.(2007)- Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting

Leo, P., Galesi, A. L. L., Suazo, A. T. S., Moraes, A. M. (2008) *Animal cells: basic concepts*. U: *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy* (Castilho, L. R., Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Butler M., ured.), Taylor & Francis Group, New York, str. 20.-27.

Logarušić, M.; Gaurina Srček, V.; Berljavac, S.; Leboš Pavunc, A.; Radošević, K.; Slivac, I. Protein Hydrolysates from Flaxseed Oil Cake as a Media Supplement in CHO Cell Culture. *Resources* **2021**, *10*, 59

Marambe H.K., J.P.D. Wanasundara, Protein From Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.); 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00008-1> ; str. 133.-145.

McCarthy A.L., Yvonne C. O’Callaghan and Nora M. O’Brien, Protein Hydrolysates from Agricultural Crops—Bioactivity and Potential for Functional Food Development, 2013. doi:10.3390/agriculture3010112

Moraes A. M., Mendonca, R. Z., Suazo, C. A. T. (2008) Culture media for animal cell. U: Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy (Castilho, L. R., Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Butler M., ured.), Taylor & Francis Group, New York, str. 111-122.

Ozturk, S.S., Palsson, B.O. (1991) Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 2. Effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor. *Biotechnol. Prog.* 7, 481.-493.

Ogunronbi, O., Jooste, P. J., Abu, J. O., Van der Merwe, B. (2011) Chemical composition, storage stability and effect of cold-pressed flaxseed oil cake inclusion on bread quality. *J. Food Process. Pres.* 35, 63.-79.

Radošević K., Kulture životinjskih stanica, OSVJEŽIMO ZNANJE, *Kem. Ind.* 69 (9-10) (2020) 561–562;

Ritacco F. V., Wu Y., Khetan A. (2018) Cell Culture Media for Recombinant Protein Expression in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells: History, Key Components, and Optimization Strategies, *Biotechnology Progress* 34(6): 1407. – 1426.

Ryan, J.A. (2008) Introduction to animal cell culture; str. 2.-6.;

<https://www.corning.com/catalog/cls/documents/application-notes/CLS-AN-042.pdf>

Sargent B. , Defined Supplements – The Role of Recombinant Proteins in Biopharmaceutical Manufacturing, 2012., <https://cellculturedish.com/defined-supplements-the-role-of-recombinant-proteins-in-biopharmaceutical-manufacturing/>

Van der Valk J., Fetal Bovine Serum (FBS): Past – Present – Future; Jan van der Valk, Christiane Buta, Brett Cochrane, Wilhelm G. Dirks, Jianan Fu, James J. Hickman, Christiane Hohensee, Roman Kolar, Manfred Liebsch, Francesca Pistollato, Markus Schulz, Daniel Thieme, Tilo Weber, Joachim Wiest, Stefan Winkler and Gerhard Gstraunthaler; Consensus Report, 2018.

Wurm F. M. (2013) CHO Quasispecies-Implications for Manufacturing Processes. - *Processes* 1: 296 – 311.

Wurm, F. M., Wurm, M. J. (2017) Cloning of CHO Cells, Productivity and Genetic Stability—A Discussion. *Processes* 5, str. 20.

Yao T., Asayama Y. (2017) Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology* 16: 99. – 117

Slika 2. : <https://www.atcc.org/products/ccl-61>

Slika 3. : <https://vdocuments.mx/ofb-vezba-6.html>