

Rast i produktivnost CHO DP-12 stanica u kemijski definiranim hranjivim medijima

Jelić, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:159:258410>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-12**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Ana Jelić

7630/BT

**RAST I PRODUKTIVNOST CHO DP-12 STANICA U
KEMIJSKI DEFINIRANIM HRANJIVIM MEDIJIMA**

ZAVRŠNI RAD

HRZZ projekt IP-2016-06-3848 „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica“

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

Zagreb, 2020.

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.

Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Igoru Slivcu i mag. ing. Marijanu Logarušiću na savjetima, prenesenom znanju, nesebičnoj pomoći, strpljenju i ugodnoj radnoj atmosferi tijekom izrade ovog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji, prijateljima i dečku na potpori, razumijevanju i vjeri u uspjeh.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologije

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Rast i produktivnost CHO DP-12 stanica u kemijski definiranim hranjivim medijima

Ana Jelić, 0058213387

Sažetak: Kulture CHO (eng. *Chinese Hamster Ovary*) stanica za proizvodnju rekombinantnih proteina zahtijevaju hranjive medije koji potiču rast stanica i sintezu proizvoda. Takvi mediji moraju osigurati visoku vijabilnost i koncentraciju stanica, a ujedno stimulirati sintezu i izlučivanje proizvoda izvan stanice. U ovom radu ispitan je utjecaj kemijski definiranih medija *Dynamis*, *CD CHO*, *EX-CELL* i *PowerCHO* na rast i produktivnost stanične linije CHO DP-12 u suspenzijskim kulturama uzgajanim u tikvicama (eng. *shake-flask*). U svrhu mjerenja koncentracije i vijabilnosti stanica u kulturi korišten je hemocitometar i bojilo tripan-plavo. Koncentracije supstrata (glukoze) i metabolita (laktata) u mediju mjerene su spektrofotometrijski. Procjena produktivnosti staničnih kultura analizirana je prema prisutnosti rekombinantnog humanog monoklonskog protutijela anti-IL8 detektiranog elektroforezom (SDS-PAGE) u medijima u kojima su uzgajane stanice. Rezultati pokazuju da se najbolji rast i najveća produktivnost postižu u mediju *Dynamis*, dok u medijima *CD CHO* i *EX-CELL* nije postignut zadovoljavajući rast stanica što znači da je za uzgoj u njima potrebna stupnjevita prilagodba.

Ključne riječi: CHO DP-12 stanična linija, kemijski definirani hranjivi medij, monoklonsko protutijelo, rast stanica

Rad sadrži: 28 stranica, 7 slika, 1 tablicu, 31 literaturni navod

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

Datum obrane: 1. rujna 2020.

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

Growth and Productivity of CHO DP-12 Cells in Chemically Defined Media

Ana Jelić, 0058213387

Abstract: The culture of CHO cells (*Chinese Hamster Ovary*) requires media that support growth and recombinant protein production. Such media must support high viable cell densities while ensuring synthesis of desired products. The aim of this study was to examine the effect of chemically defined media: *Dynamis*, *CD CHO*, *EX-CELL* and *PowerCHO*, on growth and productivity of CHO DP-12 cell line in suspension culture in shake-flasks. Cell concentration and viability were determined with hemocytometer and trypan blue. Spectrophotometry was used for measuring glucose and lactate concentrations in media. Production of recombinant human anti-IL8 monoclonal antibody was evaluated using SDS-PAGE. The study showed that the best growth and highest productivity were achieved in *Dynamis* medium. *CD CHO* and *EX-CELL* media did not result in satisfactory cell growth indicating that gradual adaptation to these media is required.

Keywords: CHO DP-12 cell line, cell growth, chemically defined media, monoclonal antibody

Thesis contains: 28 pages, 7 figures, 1 table, 31 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: Marijan Logarušić, mag. ing.

Defence date: September 1st 2020

Sadržaj

| | |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. Kultura životinjskih stanica | 2 |
| 2.1.1. Faze rasta životinjskih stanica | 3 |
| 2.1.2. Uvjeti uzgoja..... | 4 |
| 2.1.3. CHO stanična linija | 5 |
| 2.1.4. Suspenzijski rast | 5 |
| 2.2. Hranjivi mediji za uzgoj stanica | 6 |
| 2.2.1. Serum-free hranjivi mediji..... | 7 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 9 |
| 3.1. Materijali | 9 |
| 3.1.1. Mediji | 9 |
| 3.1.2. CHO stanična linija | 9 |
| 3.1.3. Kemikalije..... | 9 |
| 3.1.4. Otopine i puferi | 10 |
| 3.1.5. Uređaji i oprema | 12 |
| 3.2. Metode rada | 13 |
| 3.2.1. Uzgoj CHO stanične linije u suspenziji..... | 13 |
| 3.2.2. Određivanje broja stanica metodom <i>Trypan Blue</i> | 13 |
| 3.2.3. Određivanje koncentracije glukoze u hranjivom mediju..... | 14 |
| 3.2.4. Određivanje koncentracije laktata u hranjivom mediju | 15 |
| 3.2.5. Detekcija IgG u hranjivom mediju | 16 |
| 3.2.6. Određivanje specifične brzine rasta CHO DP-12 stanica | 17 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 18 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1. Prilagodba CHO DP-12 stanica na suspenzijski rast u različitim kemijski definiranim medijima | 19 |
| 4.2. Rast i produktivnost CHO DP-12 stanica u različitim kemijski definiranim medijima | 20 |
| 5. ZAKLJUČAK | 25 |
| 6. LITERATURA | 26 |

1. UVOD

Životinjske stanice imaju sposobnost pravilnog smatanja proteina i provođenja posttranslacijskih modifikacija zbog čega proteini dobiveni kulturom životinjskih stanica imaju bolju biološku aktivnost od onih sintetiziranih u mikroorganizama. Stoga kulture životinjskih stanica predstavljaju najvažniji sustav za proizvodnju terapijskih proteina i ostalih proizvoda korištenih u kliničke svrhe (Wurm, 2004). Široku primjenu pronašle su u proizvodnji virusnih cjepiva, imunologiji, toksikologiji te tkivnom inženjerstvu.

Pojedine stanične linije mogu imati neograničen broj staničnih dioba i rasti u suspenziji, što omogućava lakši uzgoj u većim volumenima korištenjem metoda jednakih onima kod kultura mikrobnih stanica (Ozturk, 2005).

Za uspješan rast i proliferaciju stanica, a ujedno i veću produktivnost potrebno je prilagoditi uvjete kultivacije *in vitro* i osigurati optimalnu temperaturu, pH vrijednost, sastav zraka i hranjivog medija. Hranjivi medij mora osigurati što veću gustoću i vijabilnost kulture te potaknuti sintezu i transport proizvoda izvan stanice (Ritacco i sur., 2018). Medij ima ulogu opskrbiti stanice hranjivim tvarima, stoga mora sadržavati ugljikohidrate, aminokiseline, vitamine, hormone i anorganske soli. Kao izvor faktora rasta, hormona i elemenata u tragovima uglavnom se koristi serum životinjskog porijekla, najčešće FBS (eng. *Fetal Bovine Serum*). Serum predstavlja potencijalni izvor bioloških kontaminanata, njegov nedefinirani sastav varira od šarže do šarže, a visoki udio proteina otežava pročišćavanje proizvoda. Uz to, cijena seruma je vrlo visoka, a zbog načina prikupljanja predstavlja i etički problem. Zbog toga se sve više primjenjuju mediji bez seruma i potpuno definiranog kemijskog sastava (Butler, 2013).

Sastav medija utječe na rast stanica i njihovu produktivnost, ekspresiju gena, kvalitetu produkta te metabolizam laktata i amonijaka.

Na tržištu postoji nekoliko kemijski definiranih hranjivih medija, različito dizajniranih za ubrzavanje rasta i postizanje veće gustoće stanica, produženu vijabilnost ili povećanje produktivnosti. Ne postoji univerzalni medij koji odgovara i jednako utječe na sve stanice, već se sastav medija razlikuje ovisno o tipu stanica u kulturi. Različite stanice imaju različite nutritivne potrebe, stoga je potrebno uložiti dosta vremena i znanja za konstrukciju i odabir odgovarajućeg hranjivog medija (Pan i sur., 2017).

Kako bi se utvrdilo na koji način različiti mediji utječu na rast i produktivnost stanične linije CHO DP-12, u ovom radu stanice su uzgajane u četiri različita kemijski definirana medija. Tijekom uzgoja stanica pratio se njihov rast, vijabilnost, potrošnja glukoze te proizvodnja laktata i rekombinantnog humanog monoklonskog protutijela anti-IL8.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kultura životinjskih stanica

Kultura životinjskih stanica je metoda uzgoja stanica izoliranih iz različitih tkiva životinja u umjetnom i kontroliranom okolišu, izvan tkiva iz kojeg originalno potječu (Khanal, 2017). Stanice u kulturi mogu se smatrati zasebnim organizmom, poput stanica mikroorganizama (Butler, 2004).

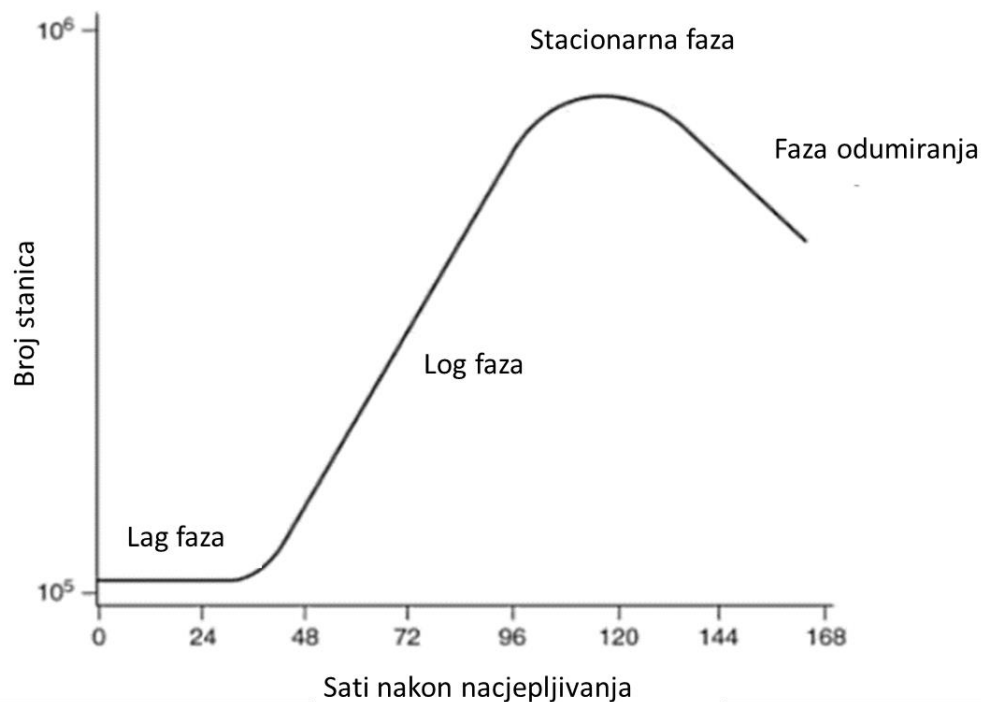
Prva kultura životinjskih stanica uspostavljena je 1907. godine, kada je Ross Harrison uzgajao stanice živaca embrija žabe i dokazao da stanice u žabljoj limfi mogu preživjeti, ali i rasti (Bhatia i sur., 2019). Danas se kultura životinjskih stanica smatra neizostavnim alatom u različitim biotehnološkim procesima te se koristi za istraživanje fiziologije i staničnih biokemijskih procesa, testiranje različitih tvari na specifičnim tipovima stanica (hormoni, faktori rasta, potencijalno toksične ili mutagene tvari), proizvodnji umjetnih tkiva ili sintezi visokovrijednih proizvoda u većoj količini (virusna cjepiva, monoklonska protutijela, terapijski rekombinantni proteini) (Butler, 2004).

Kulture stanica pripremljene iz tkiva izoliranih neposredno iz organizma, mehaničkim putem ili enzimskom razgradnjom, nazivaju se primarnim kulturama. Takve stanice imaju malu specifičnu brzinu rasta, heterogene su i posjeduju svojstva tkiva iz kojeg su izolirane. Subkultiviranjem primarne kulture nastaje stanična linija. Ako stanična linija nakon nekoliko subkultiviranja odumire radi se o konačnoj staničnoj liniji, međutim imortalizacijom ili transformiranjem može se postići neograničen broj staničnih dioba i uspostaviti kontinuirana stanična linija (Bhatia i sur., 2019). Glavna prednost kontinuiranih staničnih linija je veća brzina rasta i veća gustoća stanica te mogućnost rasta u suspenzijama i u medijima bez seruma. Međutim takve kulture pokazuju veću kromosomsku nestabilnost, fenotipski se razlikuju od tkiva iz kojeg su izolirane i ne posjeduju specifične tkivne markere (Alves i sur., 2008). Selekcijom ili kloniranjem stanica određenih karakteristika iz staničnih linija nastaju stanični sojevi koji zadržavaju osnovna svojstva stanične linije, ali se po nekom svojstvu od nje ipak razlikuju (Khanal, 2017).

Zbog mogućnosti korištenja istog tipa stanica i homogene kulture dobivaju se ponovljivi i pouzdani rezultati, a primjenom kulture životinjskih stanica omogućava se bolje razumijevanje utjecaja pojedinih tvari na određeni tip stanica. Kontrola staničnog okoliša znatno je bolja, a smanjuje se količina potrebnih reagensa i pokusnih životinja. Glavni problem predstavljaju visoki troškovi i potreba za posebno obučanim osobljem te promjena karakteristika stanica tijekom kontinuiranog uzgoja, čime se gube proizvodna svojstva (Butler, 2004).

2.1.1. Faze rasta životinjskih stanica

Stanice u kulturi prolaze različite faze rasta koje se grafički mogu prikazati kao sigmoidalna krivulja rasta (Slika 1.). Oblik krivulje ovisi o uvjetima uzgoja i dostupnosti hranjivih tvari. Poznavanje krivulje rasta važno je za uspostavljanje protokola eksperimenta, a ona se sastoji od lag faze, faze eksponencijalnog rasta (log faza), stacionarne faze i faze odumiranja.



Slika 1. Krivulja rasta stanica (Davis, 2011)

Nakon naciepljivanja na novi medij, stanicama je potrebno određeno vrijeme kako bi se na njega prilagodile. Taj period naziva se lag fazom, tijekom koje ne dolazi do porasta broja stanica ili je porast vrlo malen. Trajanje lag faze ovisi o fiziološkom stanju stanica, njihovoj brojnosti i fazi u kojoj se nalaze tijekom precijepljivanja. Stanice precijepljene u većoj početnoj koncentraciji ili one koje su precijepljene u fazi eksponencijalnog rasta imat će kraći period prilagodbe (Davis, 2011).

Log fazu karakterizira aktivna proliferacija i eksponencijalno povećanja broja stanica. Brzina rasta u ovoj fazi ovisi o karakteristikama stanične linije i uvjetima u kojima se ona uzgaja

(sastav medija, dostupnost kisika, temperatura...) (Davis, 2011). Kontinuirano udvostručavanje broja stanica traje sve dok u mediju ima dovoljno hranjivih sastojaka ili dok koncentracija proizvoda metabolizma ne dosegne vrijednost toksičnu za stanice. (Marić i Šantek, 2009).

U stacionarnoj fazi brzina rasta izjednačava se s brzinom odumiranja, zbog čega nema značajne promjene u broju stanica (Davis, 2011). Nakon stacionarne faze slijedi faza odumiranja u kojoj stanice umiru brže nego što nastaju nove te vijabilnost kulture značajno opada.

2.1.2. Uvjeti uzgoja

Kako bi se stanice u kulturi mogle dijeliti i održavati svoj metabolizam potrebno je uvjete uzgoja *in vitro* prilagoditi da budu što sličniji uvjetima *in vivo*. Fizikalno-kemijski parametri koji utječu na metabolizam stanica su temperatura, pH medija, udio CO₂ i O₂ te osmotski pritisak.

Nedostatak kisika uzrokuje smanjeni rast stanica, međutim prevelika koncentracija može dovesti do oksidativnog stresa, stoga se udio kisika od 30 do 60% smatra optimalnim za uzgoj životinjskih stanica (Amable i Butler, 2008).

Optimalna pH vrijednost medija ovisi o vrsti stanice te za većinu stanica iznosi između 7,0 i 7,4. Za puferiranje medija koristi se bikarbonatni pufer koji u ravnoteži sa CO₂ iz atmosfere održava vrijednost pH unutar optimalnih vrijednosti. Budući da CO₂ ima važnu ulogu u uzgoju animalnih stanica, kontrolira se njegov udio u atmosferi i postavlja na vrijednost od 2 do 10%.

Optimalna temperatura uzgoja, također, ovisi o vrsti stanica i o fiziološkoj temperaturi domaćina iz kojeg su izolirane, stoga se stanice porijeklom iz sisavaca uzgajaju pri temperaturi od 36 °C do 37 °C, dok je za stanice hladnokrvnih životinja optimalna temperatura znatno manja i iznosi između 18 °C i 25 °C.

Osmotski pritisak ima ulogu u regulaciji prolaska tvari kroz staničnu membranu, a kontrolira se dodatkom soli.

Važnu ulogu ima i sastav hranjivog medija koji mora sadržavati glukozu, aminokiseline, vitamine, minerale i hormone potrebne za regulaciju rasta i funkcionalnih karakteristika stanica (Ryan, 2008).

2.1.3. CHO stanična linija

Stanice ovarija kineskog hrčka (eng. *Chinese Hamster Ovary*, CHO) najčešće su korišteni ekspresijski sustav u proizvodnji terapijskih proteina. Danas se gotovo 70% terapijskih proteina proizvodi pomoću CHO stanica (Jayapal i sur., 2007). Zbog kvalitete i visokih prinosa proizvoda nadmašile su primjenu mikrobnih stanica i mogu se koristiti bez straha od prijenosa uzročnika različitih zaraza (Wurm, 2013).

Mala produktivnost animalnih stanica može se poboljšati korištenjem recesivnih markera dihidrofolat reduktaze (DHFR) i glutamin sintetaze (GS), čime se postiže amplifikacija gena od interesa i povećanje prinosa proizvoda. Posttranslacijskim modifikacijama u CHO stanicama, proizvode se rekombinantni proteini koji su strukturno i funkcionalno identični nativnim proteinima. Stanice ove stanične linije mogu se jednostavno prilagoditi na suspenzijski rast u serum-free medijima, u kojima postižu veliku gustoću (Kim i sur., 2012).

Zbog malog broja kromosoma ($2n=22$), kineski su hrčki intenzivno korišteni u različitim istraživanjima. Dr. Theodore T. Puck 1957. godine izolirao je ovarij ženke kineskog hrčka i uspostavio stabilnu i otpornu staničnu kulturu, kratkog generacijskog vremena, danas poznatu kao CHO (Jayapal i sur., 2007).

2.1.4. Suspenzijski rast

Većina staničnih linija uzgaja se kao adherentna kultura, u kojoj stanice rastu jedino ako su prihvaćene za podlogu. Svojstvo rasta hematopoetskih stanica neovisno o podlozi i prisutnosti drugih stanica iskorišteno je za uspostavu suspenzijskih kultura stanica koje originalno nemaju tu mogućnost. Fenotipskim se promjenama i modifikacijom površine stanica razvijaju stanične linije koje mogu rasti neovisno o podlozi. Tijekom procesa takve se kulture uzgajaju u tikvicama ili bioreaktorima, u kojima se hranjivi medij miješa kako ne bi došlo do stvaranja agregata i prihvaćanja za stijenke posuda. Suspenzijske kulture animalnih stanica mogu se tako uzgajati poput suspenzijskih kultura mikroorganizama kao što su kvasci i bakterije.

Suspenzijske kulture uspostavljene su zbog lakše kontrole procesa, veće dostupnosti hranjivih tvari stanicama, lakšeg prijenosa u veće mjerilo, a time i mogućnosti masovnije proizvodnje. Faza prilagodbe (lag faza) suspenzijskih stanica znatno je kraća zbog čega je moguće postići visoke koncentracije stanica i staničnog produkta (Bhatia i sur., 2019).

2.2. Hranjivi mediji za uzgoj stanica

Hranjivi medij je važan čimbenik u tehnologiji kulture stanica budući da osigurava preživljavanje stanica, potiče rast i proliferaciju te regulira stanične funkcije, čime direktno utječe na produktivnost stanica i kvalitetu konačnog proizvoda (Yao i Asayama, 2017).

Hranjivi mediji razvijeni su za različite vrste stanica i razlikuju se ovisno o kulturi i potrebama industrije za postizanje visoke gustoće stanica ili produženu vijabilnost. Osnovne komponente hranjivog medija koje se koriste, a koje potiču rast i proizvodnju rekombinantnih proteina su izvor ugljika, aminokiseline, vitamini, hormoni, faktori rasta, anorganske soli te elementi u tragovima i voda.

Najčešće se kao izvor ugljika i energije koristi glukoza, koja se procesom glikolize prevodi u piruvat, i dalje iz piruvata metabolizira do acetil-CoA. Acetil-CoA ulazi u citratni ciklus kojim se dobiva energija u obliku ATP-a. Povećana koncentracija glukoze, a time i piruvata dovodi i do povećanja koncentracije laktata koji zbog toksičnog djelovanja inhibira rast stanica. Kako bi se smanjile količine nastalog laktata, kao alternativni izvor ugljika mogu se koristiti ugljikohidrati poput galaktoze, fruktoze ili manoze.

Prisutnost aminokiselina, kao prekursora u sintezi proteina, neophodna je za rast i produktivnost stanica. Iako se u hranjivi medij dodaju i esencijalne i neesencijalne aminokiseline, najveća je potreba stanica za esencijalnim kiselinama (koje ne mogu same proizvoditi): histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan i valin. Glutamin se dodaje u znatno većoj koncentraciji jer se osim u sintezi proteina koristi i u sintezi nukleotida te kao izvor energije, a njegov nedostatak uzrokuje odgađanje početka eksponencijalnog rasta stanica.

Peptidi, mali proteini i hormoni imaju ulogu faktora rasta i dodaju se hranjivom mediju kako bi se stimulirao rast i proliferacija stanica. Najčešće se kao faktor rasta koristi inzulin (Ritacco i sur., 2018).

Vitamini djeluju kao koenzimi i prostetske skupine mnogih enzima, a budući da ih stanice ne mogu sintetizirati potrebno ih je, u malim koncentracijama, dodati u hranjivi medij. Najčešće se za stimulaciju rasta koriste vitamini B skupine.

Anorganske soli sudjeluju u održavanju ionske ravnoteže, osmotskog tlaka i pH (Arora, 2013). Najčešće se dodaju soli Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} i HCO_3^- (Burgener i Butler, 2005). Elementi u tragovima, poput mangana, bakra, cinka i svena važni su za normalno funkcioniranje enzima i rast stanica, a dodaju se u vrlo malim koncentracijama, najčešće ako medij ne sadrži serum (Arora, 2013).

Kako bi se spriječio rast nepoželjnih mikroorganizama (kontaminacija), moguće je u hranjivi medij dodati antibiotik. Međutim, korištenje antibiotika potrebno je što je moguće više izbjegavati jer ponekad može imati antimetabolički učinak i uzrokovati promjenu genotipa ili fenotipa stanica (Nema i Khare, 2012). Osim navedenih sastojaka, zbog osjetljivosti stanica potrebno je obratiti pažnju na čistoću vode koja se koristi u pripremi medija.

Ovisno o dodanim suplementima, sintetski se mediji mogu podijeliti na medije koje sadržavaju serum, medije bez seruma (eng. *serum-free media*), medije bez proteina (eng. *protein-free media*) i kemijski definirane medije (eng. *chemically defined media*) (Yao i Asayama, 2017).

2.2.1. Serum-free hranjivi mediji

Serum je bezstanična komponenta krvi, kompleksnog sastava koja sadrži smjesu različitih proteina, hormona, faktora rasta, vitamina i tvari u tragovima važnih za rast stanica (van der Valk, 2018). Budući da je sastav seruma kemijski nedefiniran te kvalitativno i kvantitativno odstupa od šarže do šarže može uzrokovati odstupanja u rezultatima i smanjenu reproducibilnost procesa. Najčešće se koristi fetalni goveđi serum (FBS, eng. *Fetal Bovine Serum*) koji zbog načina proizvodnje i porijekla predstavlja etički problem i potencijalni izvor mikrobnih kontaminanata poput bakterija, virusa, priona i mikoplazmi (Yao i Asayama, 2017).

Iako se u sastavu serum-free medija ne nalazi serum, medij i dalje može sadržavati komponente nedefiniranog sastava. Tako medij bez dodanih komponenti animalnog porijekla može sadržavati kvaščeve, bakterijske ili biljne ekstrakte. Medij bez dodanih proteina može sadržavati peptidne frakcije, ali ne i proteine, što značajno olakšava proces izolacije i pročišćavanja konačnog proizvoda. Kemijski definirani hranjivi mediji ne sadrže proteine, hidrolizate niti ostale komponente neodređenog sastava, a hormoni i faktori rasta koji se dodaju u ovaj medij moraju biti visoke čistoće (van der Valk i sur., 2010).

Osnovu serum-free medija čini smjesa DMEM/Ham F-12 (50:50 v/v), u koju se dodaju hormoni, faktori rasta, vitamini, masne kiseline i elementi u tragovima, uz neophodan dodatak inzulina, transferina i selena (Gstraunthaler, 2003).

Eagle-ov osnovni medij (Eagle's Basal Media) prvi je kemijski definirani hranjivi medij, koji s dodatkom seruma životinjskog porijekla osigurava potrebne faktore rasta, 13 aminokiselina, 8 vitamina i 6 ionskih skupina. Dulbeccova modifikacija Eagle-ovog osnovnog medija (DMEM), s 4 puta većom koncentracijom aminokiselina i vitamina omogućava postizanje znatno veće gustoće stanica. Ham's F-12 medij svojim složenim sastavom

omogućava uzgoj klonskih kultura stanica, a kombinacijom ovih dvaju medija nastaje osnovni medij koji se koristi za uzgoj brojnih staničnih linija (Butler, 2013).

Mediji koji ne sadrže serum specifični su za određeni tip stanica (Barnes i sur., 1987.), stoga nadomjestak seruma komponentama određenog sastava zahtijeva mnogo vremena, znanja i iskustva te korištenje velikog broja tvari visoke čistoće, koje komercijalno nisu lako dostupne, što značajno povećava cijenu u odnosu na medije koji sadrže serum. Međutim, mediji bez seruma mogu pospješiti rast, povećati produktivnost stanica i olakšati proces izolacije proizvoda, zbog čega je potražnja za takvim medijima sve veća, što smanjuje njihovu cijenu (van der Valk i sur., 2018.)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Mediji

Tijekom izrade ovog rada korištena su četiri različita kemijski definirana medija:

- Dynamis™ AGT™ Medium, Gibco, SAD (*Dynamis*)
- CD CHO Medium (1X), Chemically Defined Medium, Gibco, SAD (*CD CHO*)
- EX – CELL ® CD CHO Serum – Free Medium for CHO Cells, Chemically Defined, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD (*EX-CELL*)
- PowerCHO ®-2 CD, Chemically Defined Selective Medium, Lonza, Verviers, Belgija (*PowerCHO*)

3.1.2. CHO stanična linija

U ovom je radu korištena CHO DP-12 stanična linija fibroblasta ovarija kineskog hrčka adaptirana na suspenzijski rast. Ova stanična linija proizvodi rekombinantno humano monoklonsko protutijelo anti-IL8, izotip IgG. Pohranjena je u *American Type Cell Collection* (ATCC) banci 8 Manassas, Virginia, SAD, pod oznakom (ATCC®CRL 12444TM).

3.1.3. Kemikalije

Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Rh-inzulin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Metotreksat (MTX), Cerilliant, SAD

GlutaMAX™, Gibco, SAD

Anti-Clumping Agent, Gibco, SAD

Antibiotik antimikotik, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

β -merkaptoetanol, LKB, Bromma, Švedska

Bromfenol plavo, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Coomassie plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

EDTA (Kompleksal III), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Octena kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Glicerol, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Protein Markers, Lonza Rockland, Maine, SAD

Mini-Protean® TGX™ gelovi, Bio-Rad, Hercules, SAD

3.1.4. Otopine i puferi

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

| | |
|-------------------------|---------------------------|
| fosfatni pufer (pH 7,5) | 0,150 mol L ⁻¹ |
| klor-4-fenol | 2 mmol L ⁻¹ |
| 4-aminoantripin (PAP) | 0,8 mmol L ⁻¹ |
| glukozaoksidaza (GOD) | ≥ 20 kU L ⁻¹ |
| peroksidaza (POD) | ≥ 1,0 kU L ⁻¹ |

Standard za određivanje glukoze

| | |
|---------|------------------------------------------------------|
| glukoza | 100 mg dL ⁻¹ (5,55 mmol L ⁻¹) |
|---------|------------------------------------------------------|

Reagens za određivanje laktata (L-Lactic Acid Assay Kit, Megazyme, Bray, Irska)

R1: pufer (pH 10)

D-glutamat

NaN₃

R2: NAD⁺/PVP

R3: D-glutamat transaminaza

R4: L-laktat dehidrogenaza

Standard za određivanje laktata

L-laktat

0,15 mg mL⁻¹

Pufer za uzorke za SDS elektroforezu

2 mM EDTA III

2% (m/v) SDS

10% (v/v) glicerol

0,001% (v/v) bromfenol plavo

5% (v/v) β-merkaptoetanol

50 mM Tris-HCl pufer (pH 6,8)

Pufer za proteinsku elektroforezu

0,1% (m/v) SDS

25 mM Tris-glicin pufer (pH 6,8)

Coomassie otopina za bojanje gelova

0,25% Coomassie plavo boja

10% ledena octena kiselina

50% glicerol

destilirana voda

3.1.5. Uređaji i oprema

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Memmert, Njemačka

Tresilica, Biosan shaker PSU-10i, Biosan, Riga, Latvija

Komora za sterilni rad (*laminar flow cabinet*), Kambič, Slovenija

Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka

Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

Neubauerova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright-Line, Njemačka

Ploče s jažicama, Corning, SAD

Laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, kivete, laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice)

Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija

Hladnjak (-80 °C), DF 290, NUVE, Turska

Vrtložna miješalica, IKA, Njemačka

Spektrofotometar Thermo Scientific Genesys 10 S UV/Vis, SAD

Centrifuga, ECEN-205, MRC Lab, Izrael

Erlenmeyer tikvice za uzgoj stanica, Corning, SAD

Sistem za vertikalnu elektroforezu CVS10D, Clever Scientific Ltd., Rugby, Velika Britanija

Sustav napajanja za elektroforezu, Consort, Turnhout, Belgija

3.2. Metode rada

3.2.1. Uzgoj CHO stanične linije u suspenziji

Stanice zamrznute na temperaturi od $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u ampulama volumena 1 mL i koncentraciji od 1×10^7 stanica mL^{-1} odmrznute su uranjanjem ampule u vodenu kupelj temperature $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, nakon čega je sadržaj prenesen u sterilnu kivetu s $5\text{-}10\text{ mL}$ hranjivog medija. Sadržaj je potom centrifugiran, a supernatant pažljivo dekantiran. Talog stanica resuspendiran je u mediju *PowerCHO* i prenesen u Erlenmeyerovu tikvicu, gdje su stanice uzgajane do koncentracije od 4×10^6 stanica mL^{-1} .

Stanice su uzgajane u kemijski definiranim medijima s dodatkom sljedećih komponenti (na 100 mL medija): MTX ($10\text{ }\mu\text{L}$), rh-inzulin ($20\text{ }\mu\text{L}$), GlutaMAX™ (4 mL), Anti-Clumping ($250\text{ }\mu\text{L}$) i antibiotik (1 mL). Erlenmeyerove tikvice s kulturama smještene su u inkubator na temperaturu od $36,6\text{ }^{\circ}\text{C}$, u atmosferu s 5% CO_2 te na tresilicu podešenu na 160 rpm . Broj stanica, potrošnja glukoze i proizvodnja laktata praćeni su svakodnevno, sve do smanjenja vijabilnost kulture ispod 60% .

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*

Vijabilnost kulture i broj stanica određeni su korištenjem bojila tripan-plavo. Zbog narušenog integriteta membrane mrtvih stanica bojilo može difundirati u citosol, zbog čega su mrtve stanice pod svjetlosnim mikroskopom plavo obojene i razlikuju se od živih koje nisu obojene. Uzorak za brojanje pripremljen je resuspendiranjem $10\text{ }\mu\text{L}$ suspenzije stanica u $10\text{ }\mu\text{L}$ bojila tripan-plavo. $10\text{ }\mu\text{L}$ tako obojene suspenzije nanoseno je na Neubauerovu komoricu.

Neubauerova komorica služi za precizno određivanje broja stanica. Sastoji se od 9 ugraviranih kvadrata, a stanice se broje u 4 velika kvadrata smještene u kutovima i podijeljena na 16 (4×4) malih kvadrata. Broj stanica računa se pomoću formule:

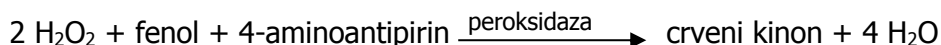
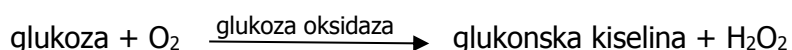
$$\text{broj stanica mL}^{-1} = \text{broj stanica izbrojanih u sva 4 kvadrata} \times 5\ 000 \quad [1]$$



Slika 2. Neubauerova komorica za brojanje stanica (Anonymus 1, 2020).

3.2.3. Određivanje koncentracije glukoze u hranjivom mediju

Koncentracija glukoze u hranjivom mediju određena je enzimatsko kolorimetrijskom metodom, pomoću komercijalnog Glucose (GOD-PAP) testa proizvođača *BIOLABO*, koji se temelji na sljedećim reakcijama:

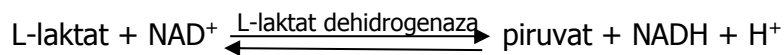


Ostatak uzorka suspenzije nakon određivanja broja stanica centrifugiran je 4 minute na 1500 rpm, a koncentracija glukoze određena je u izdvojenom supernatantu. Uzorak za mjerenje pripremljen je na način da je 10 μL uzorka medija ili standardne otopine glukoze dodano u 1 mL reagensa. Slijepa proba, umjesto uzorka sadrži isti volumen destilirane vode. Svi uzorci, uključujući slijepu probu i standard pripremljeni su u tri paralele i inkubirani 10 minuta pri 37 $^{\circ}\text{C}$, nakon čega je spektrofotometrom određena apsorbancija pri valnoj duljini od 500 nm. Na temelju razvijenog obojenja određena je koncentracija crvenog kinona, proporcionalna koncentraciji glukoze, prema formuli:

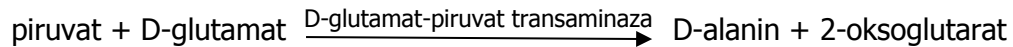
$$\text{koncentracija glukoze [mmol L}^{-1}\text{]} = \frac{A_{\text{uzorka}}}{A_{\text{standarda}}} \times c_{\text{standarda}} \quad [2]$$

3.2.4. Određivanje koncentracije laktata u hranjivom mediju

Koncentracija laktata u hranjivom mediju određena je pomoću komercijalnog *Megazyme*[®] kompleta reagensa. Metoda se temelji na dvije reakcije. U prvoj reakciji se djelovanjem enzima L-laktat dehidrogenaze, L-laktat oksidira do piruvata, pri čemu nastaje NADH.



S obzirom na to da je navedena reakcija reverzibilna i može ići u smjeru redukcije piruvata u laktat potrebno je pomaknuti ravnotežu prema sintezi piruvata. Nastali piruvat u prisutnosti D-glutamata, u reakciji D-glutamat-piruvat transaminaze prevodi u D-alanin i 2-oksoglutarat.



Količina NADH dobivenog u prvoj reakciji u stehiometrijskom je odnosu s količinom laktata u hranjivom mediju, a mjeri se spektrofotometrijski pri 340 nm.

Uzorci za mjerenje pripremljeni su prema uputama proizvođača. Volumeni svih otopina navedenih u protokolu umanjani su za ¼ kako bi se povećala iskoristivost kompleta reagensa. U 375 µL deionizirane vode dodano je 25 µL uzorka, odnosno standardne otopine L-laktata za pripremu standarda, 125 µL pufera (pH 10), 25 µL otopine NAD⁺/PVP te 5 µL otopine D-glutamat-piruvat transaminaze. Slijepa proba umjesto uzorka sadržavala je 25 µL deionizirane vode. Nakon inkubacije 3 minute spektrofotometrijski je određena apsorbancija pri 340 nm (A_1). Nakon dodatka 5 µL otopine L-laktat dehidrogenaze uzorci su lagano promiješani i inkubirani još 10 minuta te je apsorbancija ponovno izmjerena (A_2).

Koncentracija laktata računa se pomoću formule:

$$c_{laktat} [mmol L^{-1}] = \frac{V \times M}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A \times 11,1 \quad [3]$$

V – konačni volumen [mL]

M – molarna masa L-laktata [g mol⁻¹]

ε – molarni apsorpcijski koeficijent NADH pri 340 nm [3600 l mol⁻¹ cm⁻¹]

d – debljina kivete [cm]

v – volumen uzorka [mL]

$\Delta A = A_2 - A_1$

3.2.5. Detekcija IgG u hranjivom mediju

Prisutnost proizvedenog IgG u hranjivom mediju određena je SDS elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE). Proteini u uzorcima razdvojeni su metodom po Leammli-ju (Leammli, 1970). Nakon što je uzorcima (12 µL) dodano 3 µL pufera za uzorke za elektroforezu po Leammli-ju, tretirani su 3 minute u vrućoj vodenoj kupelji. Smjesa standardnih proteina (5 µL) i uzorci (10 µL) nanoseni su u jažice na komercijalnom *Bio-Rad* gelu. Elektroforeza je provedena u aparatu za vertikalnu elektroforezu, pri stalnom naponu od 180 V. Migracijom boje brom fenol plavo praćen je tijek elektroforeze te je po njezinom završetku gel skinut s ploče i tijekom 2 sata inkubiran u otopini *Coomassie* plavo boje. Odbojavanje gela provedeno je u otopini za odbojavanje.

3.2.6. Određivanje specifične brzine rasta CHO DP-12 stanica

Specifična brzina rasta računa se prema jednadžbi:

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad [4]$$

x – masa stanica

dx – povećanje biomase stanica

dt – vremenski interval

Specifična brzina rasta (μ) konstantna je u log fazi, a približno vrijedi i za fazu usporenog rasta pa vrijedi jednadžba:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad [5]$$

Obzirom na to da je masa proporcionalna broju stanica, tada je:

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{\Delta t} \quad [6]$$

N – broj stanica u 1 mL na kraju log faze

N_0 – broj stanica u 1 mL na početku log faze

Δt – vremenski interval (h)

4. REZULTATI I RASPRAVA

Uzgoj životinjskih stanica potrebno je provoditi pri fizikalno-kemijskim uvjetima što sličnijima onima *in vivo*, kako bi se osigurao njihov optimalan rast i produktivnost. To uključuje parametre poput temperature, pH vrijednosti, osmolalnosti i opskrbu stanica odgovarajućim nutrijentima iz medija. Budući da se dodatkom komponenti animalnog porijekla, poput limfe, plazme i seruma osigurava opskrba odgovarajućim nutrijentima upravo su se ove tekućine koristile kao medij u početcima istraživanja kultura stanica. Dodatak mediju, od 2 do 20% (v/v) seruma, i danas se koristi kao izvor aminokiselina, vitamina, hormona, lipida, minerala i faktora rasta (Moraes i sur., 2008).

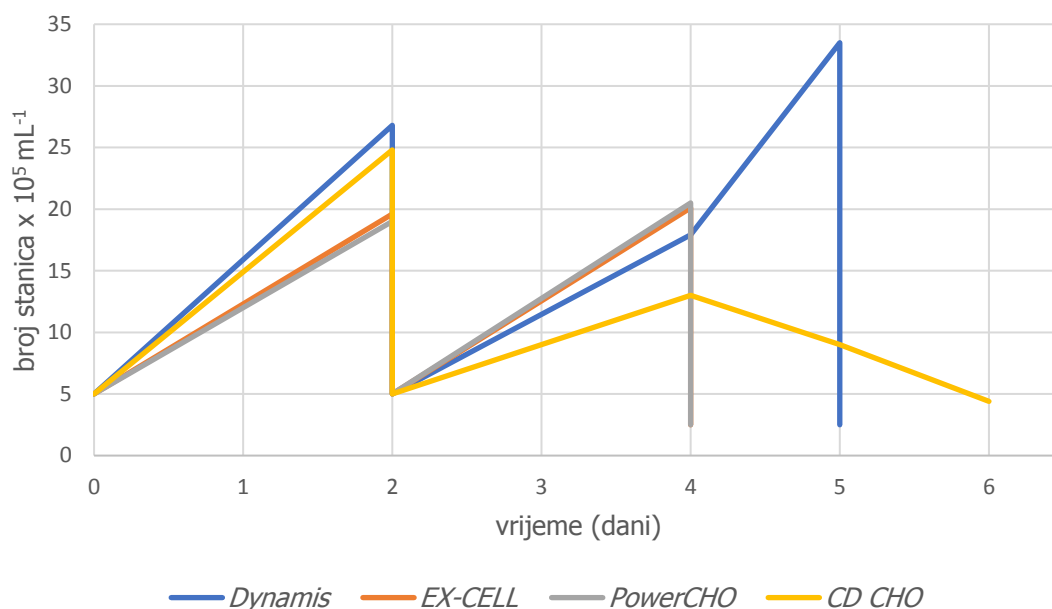
S vremenom su se korištenjem komponenti animalnog porijekla i nedefiniranog sastava počeli javljati problemi poput visoke cijene, slabe dostupnosti i etičkih pitanja zbog načina proizvodnje. Nadalje, zbog varijacija u sastavu seruma postoje razlike u procesima, odnosno razlike u rastu i produktivnosti stanica od šarže do šarže. Prisutnost proteina otežava pročišćavanje rekombinantnog proteina, a komponente animalnog porijekla predstavljaju potencijalni izvor kontaminanata poput priona, mikoplazmi i virusa (Butler, 2013). Iz navedenih razloga danas se sve više koriste mediji bez dodatka seruma i potpuno kemijski definirani mediji.

Takvi mediji specifični su za pojedine vrste stanica i različito utječu na različite tipove stanica (Moraes i sur., 2008). Pojedini mediji formulirani su da stimuliraju rast stanica, dok drugi održavaju, metaboličke funkcije i potiču sintezu proteina (Brunner i sur., 2010).

Kako bi se odabrao optimalan medij za uzgoj određenog tipa stanica potrebno je odrediti u kojem mediju stanice relativno brzo rastu, postižu najveću koncentraciju i proizvode zadovoljavajuću količinu proizvoda. Tu je često potrebno naći kompromis između navedenih uzgojnih/tehnoloških parametara, ili se ponekad pri izboru medija daje prednost jednom od navedenih parametara. Cilj ovog rada bio je prilagoditi stanica uvjetima u različitim medijima te utvrditi koji je, od četiri dostupna medija (*Dynamis*, *CD CHO*, *EX-CELL* ili *PowerCHO*) adekvatan za uzgoj CHO DP-12 stanica i proizvodnju monoklonskog protutijela anti-IL8.

4.1. Prilagodba CHO DP-12 stanica na suspenzijski rast u različitim kemijski definiranim medijima

Budući da su prije početka eksperimenta stanice uzgajane u jednom mediju (*PowerCHO*) potrebno ih je precijepiti u različite medije i prilagoditi na uvjete u njima. To se postiže postupnim smanjivanjem udjela početnog medija u mediju koji se ispituje. Po 5×10^5 stanica mL^{-1} iz početnog medija precijepljeno je u različite kemijski definirane medije, u ukupnom volumenu od 20 mL. Korišteni mediji su: *Dynamis*, *CD CHO*, *EX-CELL* i *PowerCHO*. Kada je postignuta koncentracija 2×10^6 stanica mL^{-1} ponovno je precijepljeno po 5×10^5 stanica mL^{-1} u svježe hranjive medije. Taj postupak ponovljen je nakon što je ponovno postignuta koncentracija od oko 2×10^6 stanica mL^{-1} .



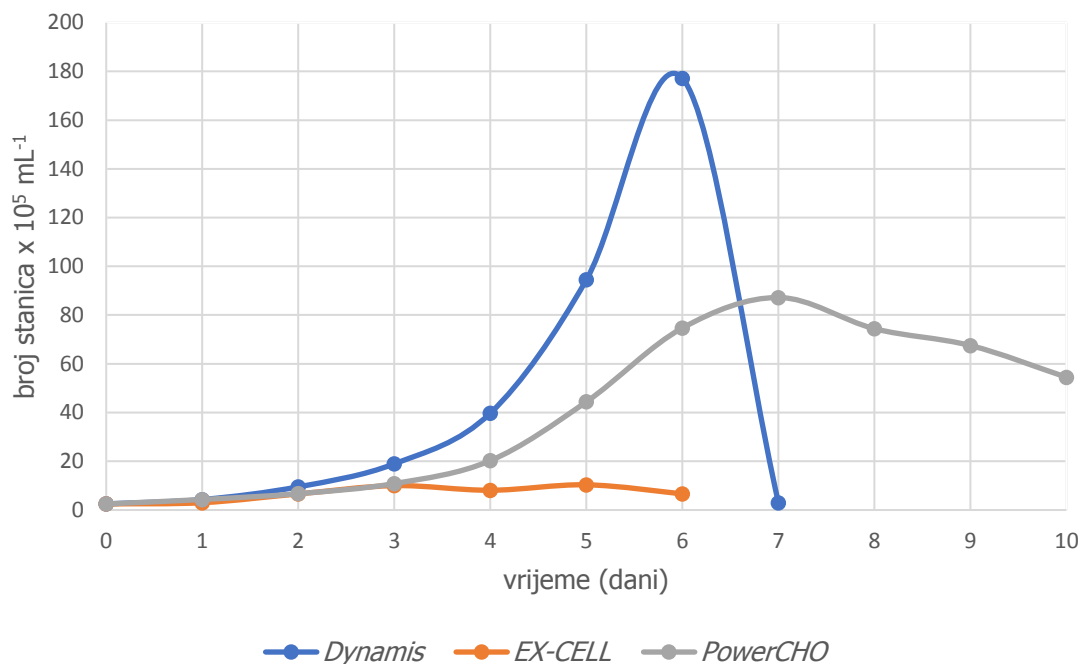
Slika 3. Ovisnost broja stanica o vremenu tijekom prilagodbe CHO DP-12 stanica na suspenzijski rast u različitim kemijski definiranim medijima.

Stanice u *CD CHO* mediju nakon prvog precijepljivanja nisu ponovno postigle potrebnu koncentraciju (2×10^6 stanica mL^{-1}), zbog čega se smatra da se nisu prilagodile na medij te ovaj medij u nastavku eksperimenta nije korišten.

Stanice u ostala tri medija uspješno su se prilagodile pa je po $2,5 \times 10^5$ stanica mL^{-1} precijepljeno u svježe pripremljene medije.

4.2. Rast i produktivnost CHO DP-12 stanica u različitim kemijski definiranim medijima

Kako bi se odredio učinak medija na rast CHO DP-12 stanica broj stanica u mL kulture praćen je metodom tripan plavo, svaka 24 sata, od naciepljivanja do trenutka kada je vijabilnost kulture pala ispod 60%.



Slika 4. Krivulje rasta CHO DP-12 stanica u različitim kemijski definiranim hranjivim medijima.

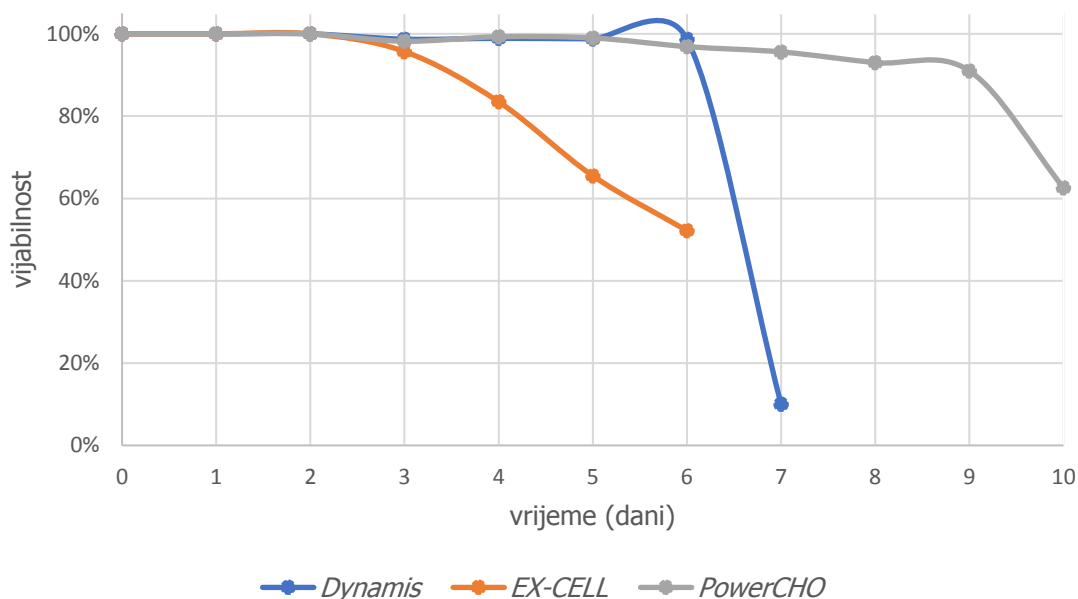
Tablica 1. Specifična brzina rasta μ (h^{-1}) CHO DP-12 stanica u različitim kemijski definiranim hranjivim medijima.

| Hranjivi medij | <i>Dynamis</i> | <i>EX-CELL</i> | <i>PowerCHO</i> |
|---------------------------|----------------|----------------|-----------------|
| μ (h^{-1}) | 0,0305 | 0 | 0,0214 |

Stanične linije ovisno o vrsti i proizvodu imaju različite nutritivne potrebe, zbog kojih mediji ne djeluju jednako na njihov rast i produktivnost. Različiti klonovi iste stanične linije zahtijevaju različite uvjete za postizanje optimalnog rasta, stoga je potrebno formulirati i odabrati medij optimalan za pojedinu vrstu stanice i proces koji se provodi (Dimasi, 2011). Na

osnovu krivulje rasta (Slika 4.) može se uočiti značajna razlika utjecaja medija na rast CHO DP-12 stanica. Najveći prinos, od $1,77 \times 10^7$ stanica mL^{-1} kao i najveća specifična brzina rasta ($0,0305 \text{ h}^{-1}$) postignuti su u mediju *Dynamis*. Nešto manju koncentraciju ($8,72 \times 10^6$ stanica mL^{-1}) i manju specifičnu brzinu rasta stanice su postigle u mediju *PowerCHO*, dok je najsporiji rast i najmanji prinos, od 1×10^6 stanica mL^{-1} postignut u mediju *EX-CELL*.

Specifične brzine rasta CHO DP-12 stanica u pojedinim medijima navedene su u Tablici 1. U mediju *EX-CELL* stanice nisu ušle u eksponencijalnu fazu rasta, potrebnu za određivanje specifične brzine rasta. Zbog toga je za specifičnu brzinu rasta u tom mediju uzeta vrijednost 0 h^{-1} .

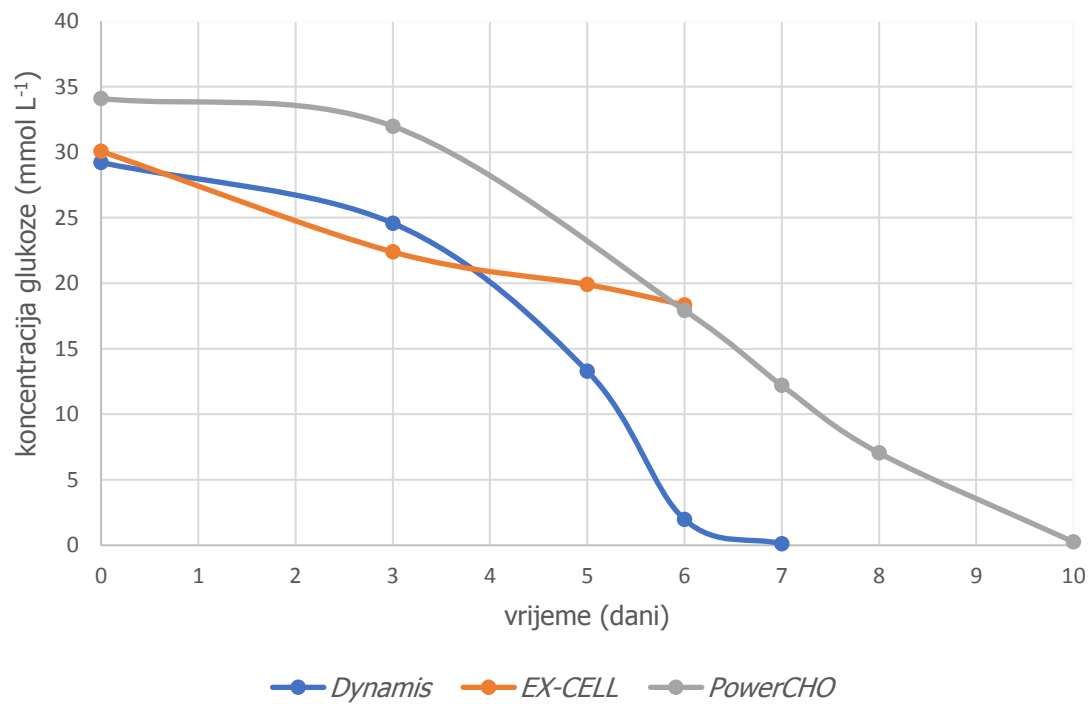


Slika 5. Vijabilnost kulture CHO DP-12 stanica u ovisnosti o vremenu, u različitim kemijski definiranim hranjivim medijima.

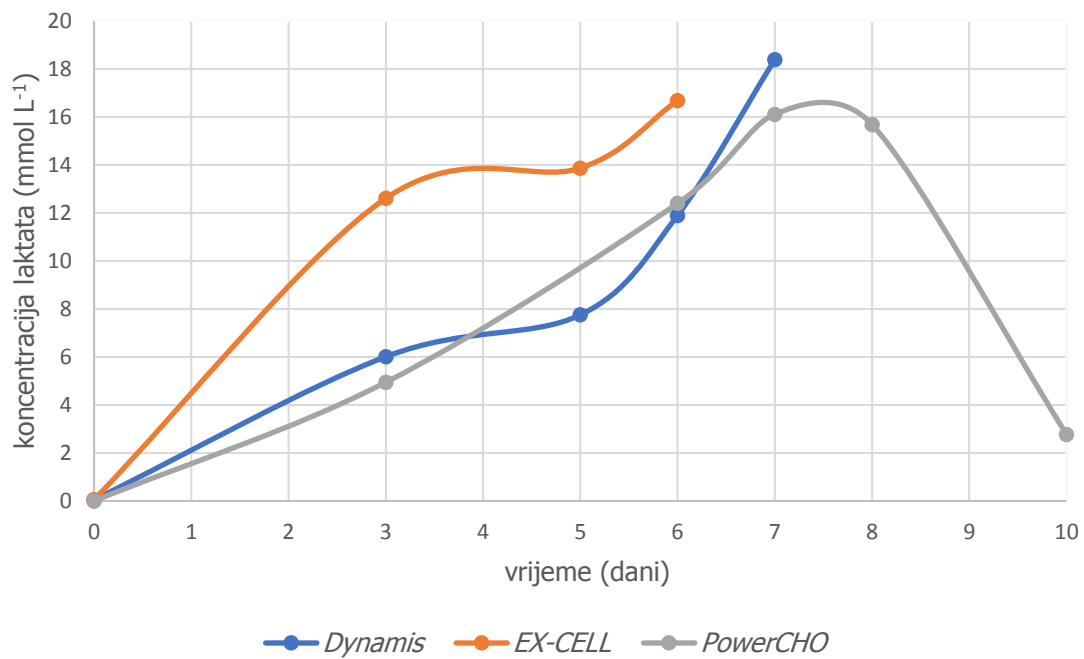
Osim različitih koncentracija koje su stanice postigle u pojedinim medijima, razlikuje se i vrijeme tijekom kojeg je vijabilnost kulture bila veća od oko 60%. Smanjenjem vijabilnosti postupak uzgoja postaje neisplativ zbog smanjenog prinosa, a kultura se onečišćuje mrtvim stanicama i njihovim proteinima. Praćenjem vijabilnosti kulture stanica u ovisnosti o vremenu (Slika 5.) i usporedbom tih podataka s krivuljom rasta (Slika 4.) uočava se da se u mediju *PowerCHO* stanice najduže zadržavaju u stacionarnoj fazi i ostaju vijabilne značajno dulje nego u preostala dva medija.

Tijekom uzgoja CHO DP-12 stanica, osim broja stanica, praćena je koncentracija glukoze i laktata u hranjivom mediju, a dobiveni rezultati prikazani su na slici 6.

a)



b)



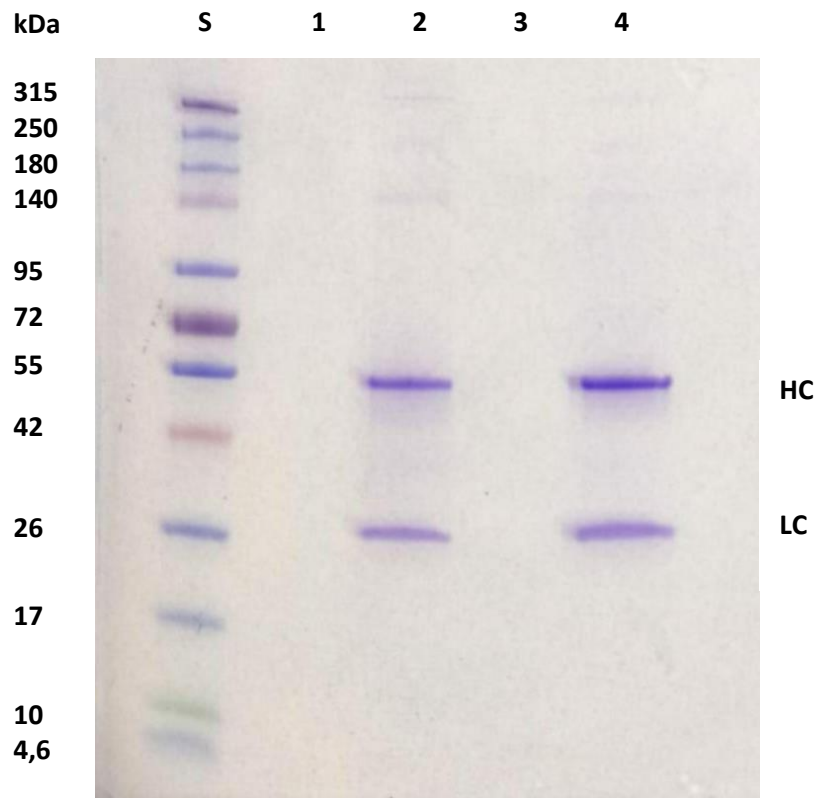
Slika 6. Metabolizam CHO DP-12 stanica; (a) potrošnja glukoze, (b) proizvodnja laktata tijekom uzgoja u različitim kemijski definiranim hranjivim medijima.

Kao jedan od glavnih izvora ugljika i energije za CHO stanice koristi se glukoza. Stanice glukoze koriste kao izvor energije u obliku ATP-a i troše ju za rast i sintezu biomase te sintezu proteina (Zamorano i sur., 2010), stoga se koncentracija glukoze u hranjivom mediju s vremenom smanjuje, što je vidljivo na slici 6. a. Nedostatak glukoze u hranjivom mediju može biti limitirajući faktor koji dovodi do smrti stanica. Konzumacijom glukoze, kao jedan od produkata metabolizma nastaje laktat, čija koncentracija s vremenom raste (Slika 6. b). Visoke koncentracije laktata u mediju djeluju inhibitory na rast stanica (Ritacco i sur., 2018).

Usporedbom potrošnje glukoze (Slika 6. a) s krivuljom rasta (Slika 4.) uočava se manja potrošnja glukoze tijekom lag faze i naglo smanjenje koncentracije glukoze tijekom eksponencijalne faze rasta. U mediju *EX-CELL* stanice nisu postigle visoku koncentraciju, stoga je potrošnja glukoze vrlo mala. U mediju *Dynamis* stanice su potrošile gotovo svu glukoze iz medija, zbog čega se nakon postizanja maksimalne koncentracije stanica 7. dana uzgoja već sljedeći dan broj živih stanica naglo smanjio. Broj stanica po mL kulture smanjuje se zajedno s koncentracijom glukoze i u mediju *PowerCHO*.

Koncentracija laktata prati krivulju rasta stanica i povećava se tijekom uzgoja, kao što je prikazano na slici 6. b. Najveći porast koncentracije laktata uočava se u eksponencijalnoj fazi rasta, nakon čega se, u stacionarnoj fazi, sinteza laktata usporava. Najviše laktata proizvele su stanice uzgajane u mediju *Dynamis*, što je i očekivano s obzirom da je u tom mediju poraslo najviše stanica. Nešto manje laktata u mediju, ali više u odnosu na broj stanica i utrošenu glukoze proizvedeno je u mediju *EX-CELL*. U nedostatku glukoze stanice proizvode manje laktata ili ga čak počinju koristiti kao izvor ugljika (Martinez i sur., 2013), stoga se po završetku eksponencijalne faze koncentracija laktata u mediju *PowerCHO* smanjuje.

Produktivnost stanične linije, odnosno proizvodnja monoklonskog protutijela IgG pratila se metodom SDS-PAGE. Analizirani su uzorci medija *PowerCHO* i *Dynamis* prije naciepljivanja i u trenutku kada je koncentracija stanica u tim medijima bila najveća. Budući da u mediju *EX-CELL* nije postignut zadovoljavajući broj stanica po mL, produktivnost u ovom mediju nije mjerena.



Slika 7. Gel nakon SDS-PAGE uzoraka medija *PowerCHO* i *Dynamis* uzetih prije naciepljivanja i na kraju eksponencijalne faze rasta. **S** - standardi; **1** – *PowerCHO*, 0. dan; **2** – *PowerCHO*, 7. dan; **3** – *Dynamis*, 0. dan; **4** – *Dynamis*, 6. dan. Na gelu su kod uzoraka 2 i 4 vidljive vrpce koje predstavljaju dijelove rekombinantnog imunoglobulina (IgG₁) proizvedenog od stanica, tj. laki (LC) i teški (HC) lanac.

Rezultati gel elektroforeze prikazani su na slici 7. S obzirom na to da su mediji kemijski definirani i ne sadrže velike količine proteina, u uzorcima medija prije naciepljivanja nema vidljivih proteinskih vrpca (uzorak 1), a vrpce vidljive u uzorcima 2 i 4 pripadaju proizvedenom rekombinantnom proteinu koji je monoklonsko protutijelo IgG₁. Budući da se radi o složenoj proteinskoj molekuli koja je prilikom pripreve uzoraka za elektroforezu podvrgnuta reducirajućim uvjetima, na gelu su vidljive dvije vrpce koje predstavljaju laki (LC) odnosno teški lanac (HC) imunoglobulinske molekule. Proteinske vrpce u uzorku medija *Dynamis* (uzorak 4) intenzivnije su nego u uzorku medija *PowerCHO* (uzorak 2) jer je u mediju *Dynamis* postignuta veća koncentracija stanica, a samim time veća je i koncentracija proizvedenog proteina.

5. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja upućuju na sljedeće zaključke:

1. Najveća brzina rasta kao i najveća koncentracija CHO DP-12 stanica zabilježena je u mediju *Dynamis AGT*. Medij *PowerCHO* također se pokazao prikladnim za uzgoj stanica, međutim u njemu se postiže znatno manji broj stanica u odnosu na medij *Dynamis AGT*.
2. Stanična linija CHO DP-12 nije pokazala zadovoljavajući rast u medijima *CD CHO* i *EX-CELL*. Zbog ovakvog ishoda, potrebno je modificirati postupak prilagođavanja stanica na te medije.
3. Uspješan rast stanica u medijima *Dynamis AGT* i *PowerCHO* rezultirao je proizvodnjom humanog monoklonskog protutijela anti-IL8 detektiranog elektroforezom.

6. LITERATURA

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.

Amable P., Butler M. (2008) Cell metabolism and its control in culture. 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. 101 – 102.

Anonymus 1 (2020) <https://www.researchgate.net/figure/Neubauer-chamber_fig1_274063071> Pristupljeno 09. lipnja 2020.

Arora M. (2013) Cell Culture Media: A Review, *Materials and Methods* **3(175)**: 1 – 29.

Barnes D., McKeehan W. L., Sato G. H. (1987) Cellular Endocrinology: Integrated physiology in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **23**: 659 – 662.

Bhatia S., Naved T., Sardana S. (2019) Introduction to Pharmaceutical Biotechnology: Animal tissue culture and biopharmaceuticals, 3. izd. IOP Publishing. str. 1 – 24.

Brunner D., Frank J., Appl H., Schöffl H., Pfaller W., Gstraunthaler G. (2010) Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media Interactive Online Database. *ALTEX* **27**: 53 – 62.

Burgener A., Butler M. (2005) Medium Development. U: Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies (Ozturk S. S., Hu W.-S., ured.), CRC Press. str. 52.

Butler M. (2004) Animal Cell Culture and Technology, 2. izd., Garland Science/Bios Scientific Publishers, New York. str. 1 – 3.

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

Davis J.M. (2011) Animal Cell Culture: Essential Methods. Wilry-Blackwell, Chichester.

Dimasi L. (2011) Meeting Increased Demands on Cell-Based Processes By Using Defined Media Supplements. *BioProcess International* **9(8)**: 48 – 57.

Gstraunthaler G. (2003) Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Serum-free Cell Culture. *ALTEX – Alternatives to animal experimentation* **20(4)**: 275 – 281.

Jayapal K. P., Wlaschin K. F., Hu W. S., Yap M. G. S. (2007) Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress* **103**: 40 – 47.

Khanal S. (2017) Animal Cell Culture: Introduction, Types, Methods and Applications < <https://microbeonline.com/animal-cell-culture-introduction-types-methods-applications/> > Pristupljeno 27. lipnja 2020.

Kim J. Y., Kim Y., Lee G. M. (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**: 917 – 930.

Leammler U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680 – 685.

Marić, V., Šantek, B. (2009) Biokemijsko inženjerstvo, Golden marketing-Tehnička knjiga. str. 41 – 43.

Martinez V. S., Dietmair S., Quek L.-E., Hodson M. P., Gray P., Nielsen L. K. (2013) Flux Balance Analysis of CHO Cells Before and After a Metabolic Switch From Lactate Production to Consumption. *Biotechnology and Bioengineering* **110**: 660 – 666.

Moraes A. M., Zucatelli Mendonça R., Suazo C. A. T. (2008) Culture media for animal cells, 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. 111 i 117.

Nema R., Khare S. (2012) An animal cell culture: Advance technology for modern research. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **3**: 219 – 226.

Ozturk S. S. (2005) Cell Culture Technology-An Overview. U: Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies (Ozturk, S. S., Hu, W.-S., ured.), CRC Press. str. 1 – 6.

Pan X., Streefland M., Dalm C., Wijffels R. H., Martens D. E. (2017) Selection of chemically defined media for CHO cell fed-batch culture processes. *Cytotechnology* **69**: 39 – 56.

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

Pristupljeno 11. lipnja 2020.

van der Valk J., Bieback K., Buta C., Cochrane B., Dirks W., Fu J., Hickman J., Hohensee C., Kolar R., Liebsch M., Pistollato F., Schulz M., Thieme D., Weber T., Wiest J., Winkler S., Gstraunthaler G. (2018) Fetal bovine serum (FBS): Past – present – Future, *ALTEX – Alternatives to animal experimentation* **35(1)**: 99 – 118.

van der Valk J., Brunner D., De Smet K., Fex Svenningsen Å., Honegger P., Knudsen L. E., Lindl T., Noraberg J., Price A., Scarino M. L., Gstraunthaler G. (2010) Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicology in Vitro* **24**: 1053 – 1063.

Wurm F. M. (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology* **22(11)**: 1393 – 1398.

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

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

Zamorano F., Vande Wouwer A., Bastin G. (2010) A detailed metabolic flux analysis of an underdetermined network of CHO cells. *Journal of Biotechnology* **150**: 497 – 508.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in blue ink, reading "Ana Jelić", is positioned above a horizontal line.

ime i prezime studenta