

Učinak hidrolizata soje na proliferaciju tumorske stanične linije HeLa

Kelava, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:159:106621>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološkifakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ivana Kelava

6117/BT

**UČINAK HIDROLIZATA SOJE NA
PROLIFERACIJU TUMORSKE STANIČNE
LINIJE HeLa**

Završni rad

MODUL: Tehnologija vitamina i hormona

MENTOR: Izv. prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Zagreb, 2015.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije
Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom
izv. prof. dr.sc. Višnje Gaurine Srček.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Višnji Gaurini Srček na vodstvu,
razumijevanju, strpljenju i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci i strpljenju tokom školovanja.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno - biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

UČINAK HIDROLIZATA SOJE NA PROLIFERACIJU TUMORSKE STANIČNE LINIJE HeLa

Ivana Kelava, 6117/BT

Sažetak: Kulture životinjskih stanica upotrebljavaju se u svim područjima biotehničkih znanosti. Rast, metabolizam i proliferacija stanica osigurana je dodatkom seruma koji pruža stanici sve potrebne nutrijente. Primjena seruma ima brojne nedostatke, a razvojem procesa s kulturama životinjskih stanica porasli su zahtjevi za smanjenjem upotrebe seruma te razvoja medija bez dodatka seruma. Cilj ovog rada bio je ispitati učinak različitih koncentracija seruma na rast stanične linije HeLa te utrošak glukoze u mediju za uzgoj. Ispitan je i učinak dodatka hidrolizata soje na rast HeLa stanica te mogućnost zamjene dijela seruma hidrolizatom soje. Medij s dodatkom 10% seruma pokazao se kao najbolji za rast i prinos HeLa stanica, a medij s 0,5% seruma pokazao je najsporiji rast i najniži prinos. Dodatak 5 g/L hidrolizata pri različitim volumnim udjelima FBS pokazao je da se ne može koristiti kao zamjena za proteine sadržane u serumu, izuzev medija s 10% FBS.

Ključne riječi: HeLa stanična linija, hidrolizat soje, vijabilnost stanica

Rad sadrži: 23 stranice, 6 slika, 4 tablice, 13 literarnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i električnom obliku (pdf format) pohranjen u: Knjižnici

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Rad predan: rujna, 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate study Biotechnology

Department of Bioengineering

Laboratory for Cell Technology and Biotransformation

EFFECT OF SOY HYDROLYSATE ON PROLIFERATION OF HeLa TUMOR CELL LINE

Ivana Kelava, 6117/BT

Abstract: Animal cell cultures are used in many fields of biotechnical science. Growth, metabolism and proliferation of cells are ensured by using a serum which provides the cells with all necessary nutrients. Development of animal cell culture and many disadvantages of serum using resulted in demands to find a suitable medium without serum. The purpose of this work was to test the effects of different serum concentrations on the growth of HeLa cell line and the consumption of glucose in the medium. The effect of soy hydrolysate and its possibility to replace a part of a serum was also tested. It was shown that the best medium for cell growth and cell yield was obtained with 10% serum while media containing 0.5% of serum resulted in the lowest cell growth and yield. It was shown that addition 5 g/L of soy hydrolysate in combination with different concentrations of FBS could not be used as a substitute for serum proteins, except when 10% FBS was used.

Keywords: HeLa cell line, soy hydrolysate, cell viability

Thesis contains: 23 pages, 6 figures, 4 tables, 13 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Ph.D. Višnja Gaurina Srček, Associate Professor

Thesis delivered: September, 2015

SADRŽAJ

| | |
|--|-------------------------------------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | Error! Bookmark not defined. |
| 2.1. Kulture životinjskih stanica | Error! Bookmark not defined. |
| 2.1.1. Mediji za uzgoj životinjskih stanica | 2 |
| 2.1.2. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica | Error! Bookmark not defined. |
| 2.2. Hidrolizati proteina kao dodatak medijima za uzgoj životinjskih stanica | Error! Bookmark not defined. |
| 2.2.1. Hidrolizat soje | 6 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 8 |
| 3.1. Materijali | 8 |
| 3.1.1. Kemikalije | 8 |
| 3.1.2. Otopine i puferi | 8 |
| 3.1.3. Uređaji i oprema | 8 |
| 3.1.4. Stanična linija HeLa | 9 |
| 3.2. Metode rada | Error! Bookmark not defined. |
| 3.2.1. Uzgoj HeLa stanične linije u T-bocama | 10 |
| 3.2.2. Određivanje učinka dodataka hidrolizata na rast stanica HeLa i određivanje broja stanica metodom tripan-plavo | Error! Bookmark not defined. |
| 3.2.3. Određivanje koncentracije glukoze u mediju za uzgoj | Error! Bookmark not defined. |
| 3.2.4. Izračunavanje parametara rasta HeLa stanica | Error! Bookmark not defined. |
| 4. REZULTATI | Error! Bookmark not defined. |
| 4.1. Učinak dodatka različitih volumnih udjela seruma na rast HeLa stanica .. | Error! Bookmark not defined. |
| 4.2. Učinak dodatka hidrolizata soje na dinamiku rasta HeLa stanica | Error! Bookmark not defined. |
| 4.2. Učinak dodatka hidrolizata soje kao zamjene za dio seruma na dinamiku rasta HeLa stanica | Error! Bookmark not defined. |

| | |
|---------------------|-------------------------------------|
| 5. RASPRAVA | Error! Bookmark not defined. |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 21 |
| 7. LITERATURA | 22 |

1. UVOD

Kulture životinjskih stanica upotrebljavaju se u svim područjima biotehničkih znanosti. Koriste se kako bi se bolje shvatile metaboličke aktivnosti unutar stanice, u ispitivanjima toksičnosti, proizvodnji terapijskih proteina, virusnih cjepiva te u proizvodnji umjetnih tkiva. Kulture stanica se održavaju u točno određenim uvjetima unutar inkubatora, a za postizanje dobre reproducibilnosti vrlo je važan sastav medija u kojem se kultura održava.

Stanična linija HeLa prvi put je izolirana 1951. iz adenokarcinoma vrata maternice pacijentice Henriette Lacks i u potpunosti je prilagođena na *in vitro* uzgoj u laboratorijskim uvjetima. Kao tumorska stanična linija može se neograničeno umnažati dok su joj osigurane hranjive tvari i uvjeti uzgoja, a danas se koristi u brojnim laboratorijima za ispitivanja kontrole lijekova, za praćenje učinka različitih spojeva, a također je pogodna kao domaćin za ekspresiju različitih rekombinantnih proteina i cjepiva (Hendrick i sur., 2006). Obzirom na primjenu ove stanične linije, istraživanja kinetike rasta i uvjeta uzgoja su od velike važnosti za temeljna istraživanja i biotehnološku primjenu.

HeLa stanice uobičajeno rastu u medijima kao što je DME medij uz dodatak 5-10% (v/v) seruma, najčešće fetalnog telećeg seruma (FBS). Dodatak seruma u medij za uzgoj ima brojne nedostatke koji su vezani uz periodičke krize u opskrbi, varijacije u šaržama, mogućnostima kontaminacije virusima i mikoplazmama te visoku cijenu. Stoga se nastoji razviti medije bez dodatka seruma ili pak dio seruma zamijeniti drugim izvorima proteina poput različitih hidrolizata biljaka.

U skladu s navedenim cilj ovog rada je bio ispitati učinak različitih koncentracija seruma na rast HeLa stanica i utrošak glukoze u mediju za uzgoj. Također ispitan je i učinak dodatka hidrolizata soje na rast HeLa stanica te mogućnost zamjene dijela seruma hidrolizatom soje.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kulture životinjskih stanica

Kultura životinjskih stanica podrazumijeva laboratorijsku tehniku *in vitro* uzgoja stanica izoliranih iz životinjskog tkiva. Ova metoda zahtjeva posebne uvjete kao što su sterilnost, odgovarajuća temperatura i pH, faktore rasta i druge potrebne nutrijente. Principe metode uspostavio je Wilhem Roux krajem 19., a procvat je doživjela sredinom 20. stoljeća.

Uzgoj započinje uspostavljanjem primarne kulture, koju čine stanice izolirane direktno iz ciljnog životinjskog tkiva ili organa. Uspostavljanje se provodi enzimskom, kemijskom ili mehaničkom razgradnjom tkiva, slijedi selekcija željenih stanica i daljnji uzgoj u Petrijevim zdjelicama ili T-bocama. Stanice koje se koriste dijele se na epitelne, limfoblastne i fibroblastne. Njihovo umnažanje odvijati će se sve dok populacija stanica ne postane limitirana prostorom ili nutrijentima za rast a tada je stanice potrebno precijepiti.

Stanične linije podrazumijevaju kulturu koja se sastoji od stanica originalno prisutnih u primarnoj kulturi. Obzirom na životni vijek razlikujemo konačne (netransformirane) i kontinuirane (transformirane) stanične linije (Nema i Khare, 2012.). Konačne stanične linije karakterizirane su ograničenim brojem generacija (20-80), a karakteristike kontinuirane stanične linije su uspješna proliferacija, smanjena potreba za serumom, brži rast, promijenjena morfologija stanica (Freshney, 2000.).

Brojne prednosti uporabe kulture stanica uključuju dostupnost selektivnog medija, jednostavnost izvedbe DNA profiliranja, reducirani volumeni reagensa, smanjena uporaba pokusnih životinja i dr. Nedostaci uključuju promjene biokemijskih i enzimskih karakteristika u ovisnosti o hranjivom mediju te promjene karakteristika samih stanica nakon dugotrajnog *in vitro* uzgoja.

Metode kultiviranja životinjskih stanica primjenu nalaze u biokemijskim i fiziološkim istraživanjima kao što su sinteza visokovrijednih proizvoda, ispitivanje učinaka različitih tvari na određene tipove stanica (Butler, 2004.).

2.1.1. Medij za uzgoj životinjskih stanica

Medij za uzgoj životinjskih stanica sastoji se od prikladnih izvora energije koje stanica može jednostavno iskoristiti te spojeva koji reguliraju stanični ciklus. Ne postoji medij koji odgovara svim stanicama, on se bira prema tipu stanice i mora sadržavati određene nutrijente,

imati puferske karakteristike, biti izotoničan i sterilan. Važni parametri koji se prate prilikom uzgoja životinjskih stanica su osmolarnost, pH, temperatura, koncentracija O₂ i CO₂, te koncentracija nutrijenata potrebnih za rast i diobu stanica.

Hranjivi medij za uzgoj životinjskih stanica mora sadržavati ugljikohidrate, aminokiseline, vitamine, anorganske soli hormone, lipide, proteine i različite mikronutrijente. Glukoza se najčešće koristi kao izvor energije i ugljika, većinom je prisutna u početnoj koncentraciji od 10-25 mM. Osim glukoze, upotrebljavaju se i fruktoza, maltoza i galaktoza a njihovom uporabom moguće je smanjiti brzinu glikolize. Koncentracije prisutnih aminokiselina su u rasponu 0,1-0,2 mM, a potrebne su za sintezu nukleotida, proteina i lipida. Osmolarnosti medija pridonose anorganske soli koje se dodaju u obliku Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻ i HCO₃⁻. Soli također kontroliraju pH vrijednost, osmotski tlak i djeluju kao enzimski kofaktori. Vitamini i hormoni prisutni su u niskim koncentracijama a bitni su kao enzimski kofaktori. Lipidi se u medij dodaju u obliku palmitinske, stearinske, linolne, linolenske kiseline itd. Lipidi se dodaju jer imaju strukturnu ulogu a koriste se i kao izvor i zaliha energije. Navedene komponente nalaze se u vodi, koja mora biti visoke čistoće što se postiže metodama mikrofiltracije, reverzne osmoze itd.

Najčešće korišteni mediji za uzgoj životinjskih stanica su: BME (*Basal Medium Eagle's*) oblikovan 1955. godine za mišje L i humane HeLa stanice; EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) oblikovan kao poboljšanje BME; DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*) i GMEM (*Glasgow's Modification of Eagle's Medium*) koji sadrže veću koncentraciju aminokiselina i vitamina od EMEM i BME.

Za uzgoj životinjskih stanica koristi se serum, koji potiče proliferaciju stanica i druge stanične aktivnosti, te vezanje stanica za podlogu. Serum sadrži faktore rasta, adhezijske faktore, aminokiseline, vitamine, hormone, proteine, lipide i minerale. Postoje goveđi, konjski i humani serum te fetalni teleći serum (FBS) koji se najčešće koristi. Serumi se dobivaju zgrušavanjem krvi životinjskog podrijetla a mediju se najčešće dodaju u volumnom udjelu 5-10% (v/v).

Posljednjih godina nastoji se upotrebljavati *serum-free* mediji (SFM), jer postoje određeni nedostaci uporabe seruma. Razlika u kemijskom sastavu između šarži seruma, mogućnost njegove kontaminacije te kemijska nedefiniranost njegove su glavne mane. Poteškoće pri pročišćavanju i izdvajanju proizvoda predstavljaju proteini prisutni u serumu (Butler, 2004.) Nameće se i etičko pitanje okrutnosti prema životinjama. *Serum-free* medij

selektivan je za određeni tip stanica, a samim time daje mogućnost proliferacije i diferencijacije stanica (mijenjanjem koncentracije i vrsta faktora rasta). Nedostatak uporabe medija bez seruma uključuje sporiju proliferaciju stanica, ograničen vijek njihova života, nižu maksimalnu koncentraciju stanica te visoku cijenu potrebnih dodataka kao što su hormoni i faktori rasta.

2.1.2. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica

Uvjeti uzgoja životinjskih stanica od iznimne su važnosti jer oponašaju *in vivo* uvjete kako bi stanica rasla u što prirodnijem okolišu. Oni uključuju manipulaciju fizikalno-kemijskih parametara kao što su:

- pH

Većina životinjskih staničnih linija pokazalo je dobar rast pri pH vrijednosti od 7,4 te je mala razlika između različitih staničnih sojeva. Ipak, pokazalo se da stanice fibroblasta rastu bolje u bazičnim uvjetima (pH 7,4-7,7), dok neke transformirane stanice zahtijevaju kiseliji okoliš (pH 7,0-7,4).

- CO₂

pH vrijednost medija ovisi o ravnoteži otopljenog ugljičnog dioksida i bikarbonata, stoga je bitna regulacija CO₂. Optimalna vrijednost iznosi 5-7% CO₂, a postiže se uzgojem u inkubatoru. Često je potrebno optimirati razinu CO₂ prema uputama proizvođača medija.

- Temperatura

Vrijednosti temperature između 36-37°C optimalne se za uzgoj humanih staničnih linija i staničnih linija sisavaca, dok stanične linije koje potječu od hladnokrvnih životinja (npr. ribe) podnose temperaturu između 15°-26°C. Odstupanja od optimalnih vrijednosti ne bi smjela biti veća od ±0,5°C.

- Osmotski pritisak

Uzgoj životinjskih stanica optimalan je pri 260-320 mOsm/kg.

- Viskoznost

Viskoznost medija najčešće igra uloga u sustavima s miješanjem stanica, a nema utjecaj na rast stanica u kulturi.

2.2. Hidrolizati proteina kao dodatak medijima za uzgoj životinjskih stanica

Hidrolizati proteina su prema definiciji proizvodi koji mogu nastati enzimskim, alkalnim, kiselinskim i fermentacijskim metodama. Dana definicija obuhvaća sve produkte proteinske hidrolize, a to su peptidi, aminokiseline i minerali prisutni u proteinima te kiseline i lužine koje se koriste za regulaciju pH. Ovisno o upotrijebljenim enzimima, hidrolizati proteina mogu imati različite grupe na bočnim lancima (karboksilnu, amino, imidazolnu, sulfhidrilnu...). Navedene grupe imaju različite utjecaje na životinjske, mikrobne i biljne stanice te stanice insekata.

Razvoj kulture životinjskih stanica u samim počecima uključivao je uporabu seruma koji je služio kao izvor nutrijenata, hormona, faktora rasta te kao inhibitor proteaza. Kao što je prethodno već opisano, serum sudjeluje u vezanju stanica za podlogu, dijeljenju stanice te pružanju zaštite od mehaničkih oštećenja. Danas se nastoji koristiti medij bez seruma jer je rizik kontaminacije seruma prevelik, otežana je izolacija i pročišćavanje proizvoda i ograničeni su njegovi izvori. Uporaba medija bez seruma zahtijeva dodatak određenih komponenti – hormona, inzulina, transferina, lipida, rekombinantnih proteina i nutrijenata iz sintetskih, biljnih ili mikrobioloških izvora (Jayme, 1999., Mizrahi i Lazar 1991.). Hidrolizati proteina, dobiveni hidrolizom proteina iz tkiva biljaka, kvasaca i životinja, služe kao supstituenti proteina iz seruma. Njihova uloga jest obogaćivanje medija, povećanje stabilnosti glutamina, poboljšanje vijabilnosti stanica i kulture, te poboljšanje njihove produktivnosti.

Kvaliteta hidrolizata proteina ovisi o početnoj sirovini, hidrolizirajućem sredstvu, parametrima procesa te stupnju hidrolize (omjer amino dušika i ukupnog dušika) (Lobo-Alfonso i sur., 2010.). Faktori koji također utječu na kvalitetu su koncentriranje, pasterizacija i sušenje hidrolizata.

Prednosti uporabe hidrolizata proteina u mediju bez seruma su:

- Tehničke prednosti- zamjena seruma je postupak koji može biti dugotrajan zbog nedefiniranosti njegova sastava, hidrolizati proteina pružaju blagotvorne faktore

prisutne u serumu, uz smanjenje varijabilnosti i eliminaciju većine rizika vezanih uz uporabu seruma.

- Proizvodne prednosti- hidrolizati proteina proizvode se u velikim mjerilima, relativno su stabilni i mogu se skladištiti pod posebnim uvjetima. Troškovi su smanjeni jer nema velike razlike u sastavu među šaržama, zbog čega je moguće i predvidjeti prinos.
- Regulatorne prednosti- koriste se hidrolizati porijeklom od biljaka i kvasaca kako bi se izbjegla kontaminacija do koje može doći ukoliko se upotrijebe hidrolizati životinjskog podrijetla. Time se izbjegava proces uklanjanja potencijalno kontaminiranih dodataka iz sirovine.

Nedostaci uporabe hidrolizata proteina u mediju bez seruma su:

- Nedostatak biokemijski definiranog sastava- koncentracija hidrolizata proteina koja se upotrebljava varira od 100-2,5 mg/L, ovisno o tome dodaje li se u kombinaciji s drugim nutrijentima ili sama. Teži se ujednačenom biokemijskom sastavu jer on uvelike utječe na prinos produkta. Nedostatak kemijske definicije može zakomplicirati proces pročišćavanja i izdvajanja proizvoda.
- Poteškoće pri obradi-produženo je vrijeme obrade zbog sastojaka hidrolizata koji su manje topljivi te zaostaju u procesu filtracije. Primjetilo se i da proteinski hidrolizati utječu na *upstream* procese s kationskim lipidima (Lobo-Alfonso i sur., 2010.).
- Problemi nabave-poteškoće nastaju prilikom nabave hidrolizata proteina jer su izvori limitirani, te se pokazalo da proces proizvodnje nije isplativ (Lobo-Alfonso i sur., 2010.).
- Regulatorni problemi-regulatorne agencije i biofarmaceutski proizvođači inzistiraju na visokoj razini čistoće proizvoda, te traže osiguranje da proizvod nije kontaminiran nikakvim tvarima životinjskog porijekla.

2.2.1. Hidrolizat soje

Soja (lat. *Glycinemax*) je godišnja biljka iz porodice mahunarki (*Fabaceae*) koja potiče iz jugoistočne Azije. Pripitomljena je prije više od 3000 godina zbog jestive mahune i sjemenki. Danas je jedna od najvažnijih sirovina te čak zauzima šestinu svih kultiviranih usjeva ukupne žetve (Eol, 2015.). Osim visokog udjela proteina (37-50%) sadrži i minerale (npr. soli kalcija, kalija, fosfora, željeza), vitamine (npr. tiamin, riboflavin, folnu kiselinu,

pantotensku kiselina, niacin, vitamin B₆, C, E, D i K) vlakna, esencijalne masne kiseline (npr. omega-3 masne kiseline), fitoestrogene poput izoflavona (npr. genistein, daidzein, glicitein) itd. Sojini proteini su visoko kvalitetna hrana jer su odlično izbalansirani po sastavu aminokiselina i kao takvi se lako metaboliziraju.

Hidrolizat soje danas se uvelike koristi kao dodatak mediju bez seruma jer ima ulogu poboljšanja vijabilnosti stanične gustoće, titara rekombinantnih proteina, povećanja dugovječnosti kulture te redukcije apoptioze. (Hartshorn i sur., 2010.). Ove nedefinirane kompleksne sirovine dobivene enzimskom razgradnjom soje ispočetka nisu bile namijenjene kao dodatak mediju bez seruma, stoga je bitno objasniti njihovu točnu ulogu u procesu kultivacije životinjskih stanica radi bolje kontrole procesa, poboljšanja stabilnosti proizvoda te naposljetku i proizvodnje produktivnijeg hidrolizata soje.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

0,25% Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

Dulbecco's Modified Eagle's Medium), DMEM GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland

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

Hidrolizat soje UF Solution 50x, SAFC Biosciences, Andover, UK

Glukoza-PAP kolorimetrijski test, Dijagnostika, Sisak, Hrvatska

3.1.2. Otopine i puferi

PBS pufer (pH=7,4)

| | |
|---------------------------|------------|
| Natrijev klorid | 8,0 g |
| Kalijev klorid | 0,2 g |
| Dinatrijev hidrogenfosfat | 1,44 g |
| Kalijev dihidrogenfosfat | 0,24 g |
| Destilirana voda | do 1000 mL |

0,4 % otopina tripan-plavo

| | |
|-------------------|----------|
| Boja tripan-plavo | 0,08g |
| PBS puffer | 20,00 mL |

3.1.3. Uredaji i oprema

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija

Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka

Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija

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

Ploče s 12jažica, Corning, SAD

T-boceod 25 cm², Corning, SAD

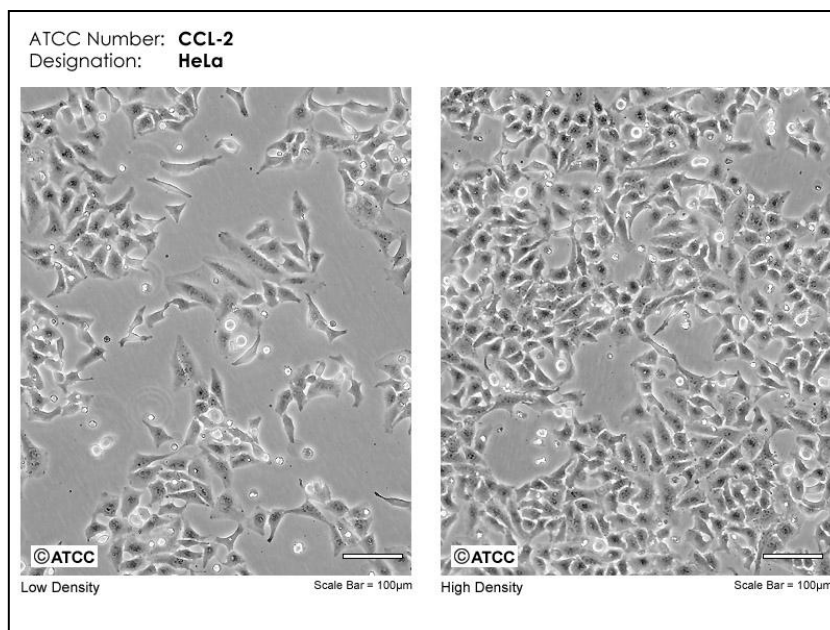
Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright-Line, Njemačka

Spektrofotometar Thermo Scientific Genesys 10 S UV/VIS, SAD

Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, pipete, nastavci za pipete)

3.1.4. Stanična linija HeLa

Humana tumorska stanična linija HeLa korištena u ovom radu, dobivena je iz *American Type Culture Collection* (ATCC) radne banke stanica. Ubraja se u morfološki epitelne te adherentne stanice, a uzgoj se provodi u T-bocama ravnih stijenki. Izolirane su iz malignog tumorskog tkiva vrata maternice te su transformirane pomoću humanog papiloma virusa 18 (HPV 18). Karakterizira ih visok stupanj adherentnosti kao i mogućnost kontaktne inhibicije u *in vitro* ispitivanjima. Iako humanog podrijetla, ova stanična linija sadrži 82 kromosoma umjesto 46, a znanstvena literatura potvrđuje 4 tipična HeLa kromosomska markera (M1, M2, M3 i M4). Generacijsko vrijeme ove stanične linije je 24 sata. Optimalni uvjeti uzgoja su 95% zraka i 5% CO₂ na temperaturi od 37°C, a postižu se u inkubatoru s reguliranom atmosferom. Za uzgoj je korišten *Dulbecco's Modified Eagle's* (DME) hranjivi medij uz dodatak 10% (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS).



Slika 1. Stanična linija HeLa (ATCC[®] - LGC Standards, 2015)

3.2. Metode rada

3.2.1. Uzgoj HeLa stanične linije u T-bocama

Stanice se čuvaju na temperaturi od -70°C , a uzgoj započinje njihovim odmrzavanjem. Ampula sa stanicama (1 mL), koncentracije 5×10^6 stanica/mL odmrzne se te se stanice centrifugiraju kako bi se uklonio medij za smrzavanje. Talog stanica resuspendira se u DMEM mediju koji sadrži 10% FBS i održava u inkubatoru na temperaturi od 37°C uz atmosferu s 95% zraka i 5% CO_2 . Rast stanica potrebno je pratiti inverznim mikroskopom. Kako bi se spriječio ulazak stanica u stacionarnu fazu zbog kontaktne inhibicije, potrebno ih je precijepiti kada je pokrivenost površine oko 80%.

3.2.2. Određivanje učinka dodataka hidrolizata na rast stanica HeLa i određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

HeLa stanice naciepljene su u ploče sa 12 jažica u početnoj koncentraciji od 5×10^4 stanica/mL. U svaku jažicu naciepljen je volume od 1 mL pri različitim koncentracijama seruma (10%, 5%, 2.5% i 0.5%) te se pratila dinamika rasta stanica kroz 24, 48 i 72 sata, metodom tripan-plavo. Osim ispitivanja utjecaja koncentracije seruma na rast HeLa stanica, ispitivali smo i utjecaj dodatka sojinog hidrolizata (0,5-2,5 g/L) u DMEM mediju s 10% FBS.

Broj stanica se također pratio kroz 24, 48 i 72 sata metodom tripan-plavo. Za ispitivanje učinka seruma i hidrolizata soje za svaki uzorak postavljene su tri paralele.

Za određivanje broja stanica koristi se metoda bojanja otopinom tripan-plavo. Obojat će se samo mrtve stanice, čija je membrane propusna, a Fuchs-Rosenthalova komorica se koristi se za brojanje stanica.



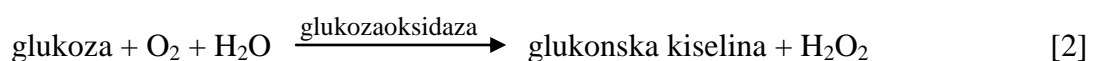
Slika 2. Fuchs-Rosenthalova komorica i shematski prikaz mrežice u kojoj se određuje broj stanica

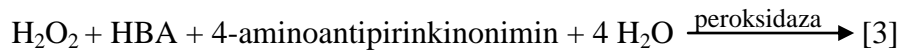
Uzorak za brojenje pripremamo tako da sterilnom pipetom uklonimo hranjivi medij iz jažica te dodamo 1 mL tripsina koji odvaja stanice od podloge. Uspješnost odvajanja pratimo inverznim mikroskopom, stanice se zaokružuju kada se odvoje od podloge. Odvojenim stanicama dodajemo 1 mL medija sa serumom kako bi se spriječilo daljnje djelovanje tripsina. Stanice se resuspendiraju i uzima se 20 μL suspenzije stanicete 20 μL boje tripan-plavo. Od tako pripremljenog uzorka uzima se alikvot od 20 μL i nanosi na Fuchs-Rosenthalovu komoricu. Brojanje se vrši unutar četiri središnja kvadratića a rezultat je aritmetička sredina broja stanica, prema formuli:

$$\text{Broj stanica/mL suspenzije} = \text{aritmetička sredina izbrojenih stanica u 4 kvadratića} \times 2 \times 5 \times 10^3 [1]$$

3.2.3. Određivanje koncentracije glukoze u mediju za uzgoj

Sadržaj glukoze u mediju određivan je kolorimetrijsko-enzimskom metodom glukoza-PAP (fenol i aminoantipirin) koja se koristi i za određivanje koncentracije glukoze u krvi, plazmi, serumu i likvoru. Metoda se bazira na specifičnim reakcijama:





HBA= 4-hidroksibenzojeva kiselina

Sastav reagensa za određivanje glukoze sadrži:

R1 reagens: 4-amoniantipirin 0,40 mmol/L

glukoza oksidaza > 300 $\mu\text{kat/L}$

peroksidaza > 17 $\mu\text{kat/L}$

R2 pufer: fosfatni pufer pH 7,4 \pm 0,05 mmol/L

R3 standard: 5,56 mmol/L

Koncentracija glukoze je proporcionalna koncentraciji kinonimina koji nastaje u drugoj reakciji, a njegova se koncentracija određuje spektrofotometrijski, pri apsorbanciji od 500 nm, na osnovi intenziteta obojenja otopine. Uzorak za mjerenje apsorbancije priredi se tako da se u epruvetu doda 10 μL uzorka medija i 1 mL otopine reagensa. Svaki uzorak pripremljen je u 3 paralelne probe. Uzorci se ostave stajati na sobnoj temperaturi 20 minuta, nakon čega se očitava apsorbancija. Slijepa proba umjesto uzorka sadržava 10 μL destilirane vode. Koncentracija glukoze određuje se pomoću baždarnog dijagrama koji je dobiven određivanjem apsorbancije uzoraka poznate koncentracije.

3.2.4. Izračunavanje parametara rasta HeLa stanične linije

Određivanje specifične brzine rasta (μ)

Specifična brzina rasta je:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad [\text{h}^{-1}] \quad [4]$$

dX - povećanje biomase stanica

dt - vremenski interval

X - broj (koncentracija) stanica

Kada je brzina rasta konstantna, npr. tijekom eksponencijalne faze rasta, tada vrijedi:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad [5]$$

Obzirom da je masa proporcionalna broju stanica, onda je:

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

N - broj stanica na kraju log faze rasta

N_0 - broj stanica na početku log faze rasta

Δt - vremenski interval (h)

Određivanje vremena udvostručenja populacije (eng. Population Doubling Time - PDT)

Vrijeme udvostručenja je:

$$\text{PDT} = \frac{\Delta t \log 2}{\log N - \log N_0} \quad [7]$$

N_0 - broj stanica na početku uzgoja

N - broj stanica na kraju log faze rasta

Δt - vremenski interval (h)

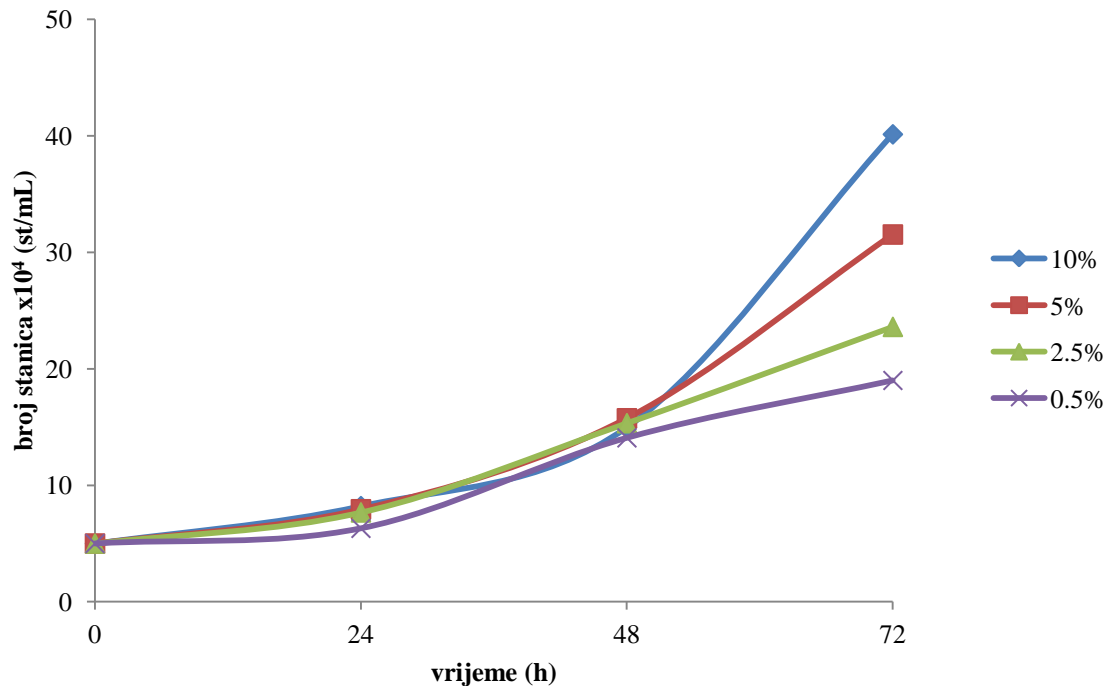
Određivanje prinosa stanica

Prinos stanica = broj stanica u 1 mL na kraju log faze rasta - broj stanica u 1 mL na početku uzgoja [8]

4. REZULTATI

4.1. Učinak dodatka različitih volumnih udjela seruma na rast HeLa stanica

HeLa stanice su nacijspljene u ploče s 12 jažica u 1 mL DME medija s različitim volumnim udjelima FBS (0,5-10%). Broj poraslih stanica određivan je nakon 24, 48 i 72 sata od nacijspljivanja, metodom tripan-plavo (Slika 3).



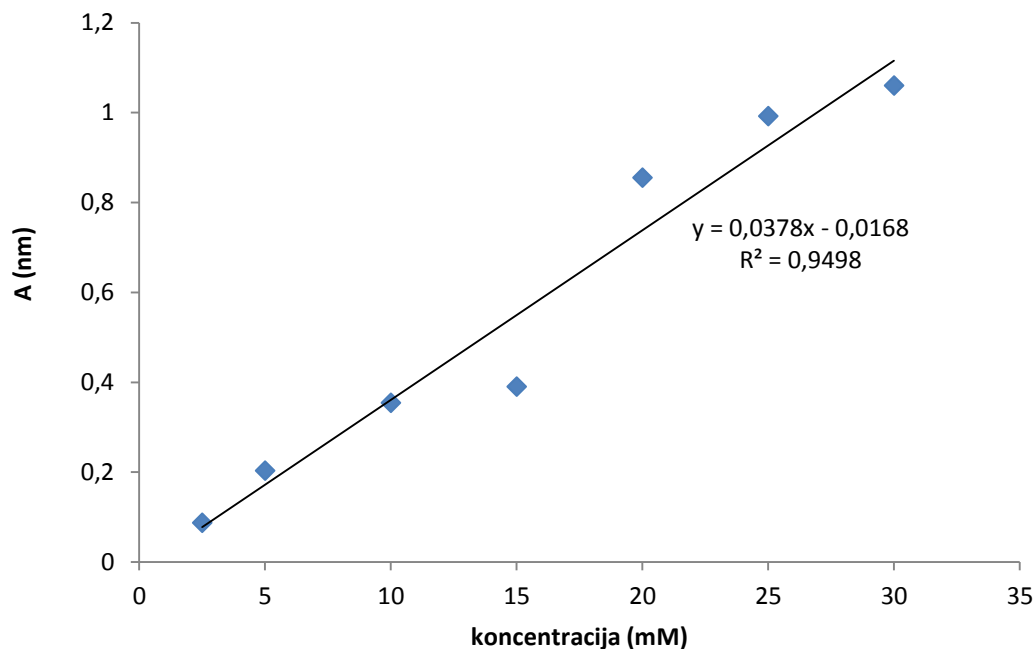
Slika 3. Učinak različitih volumnih udjela FBS (0,5-10% FBS) na rast HeLa stanica

Na temelju dobivenih krivulja rasta HeLa stanica pri različitim volumnim udjelima FBS u DMEM mediju izračunati su prinos stanica, specifična brzina rasta stanica (μ) i vrijeme udvostručenja (t_d) koji su prikazani u Tablici 1.

Tablica 1. Parametri rasta HeLa stanica u DME mediju pri različitim volumnim udjelima FBS (0,5-10%)

| Volumni udio FBS (%) | Prinos stanica ($\times 10^4$ st/mL) | μ (h^{-1}) | t_d (h) |
|----------------------|---------------------------------------|--------------------|-----------|
| 10 | 35,13 | 0,04109 | 16,87 |
| 5 | 26,53 | 0,02892 | 23,96 |
| 2,5 | 18,60 | 0,01799 | 38,55 |
| 0,5 | 14,00 | 0,01252 | 55,37 |

Prije određivanja sadržaja glukoze u uzorcima medija za uzgoj, napravljen je baždarni pravac za određivanje sadržaja glukoze u mediju (Slika 4).



Slika 4. Baždarni pravac za određivanje glukoze

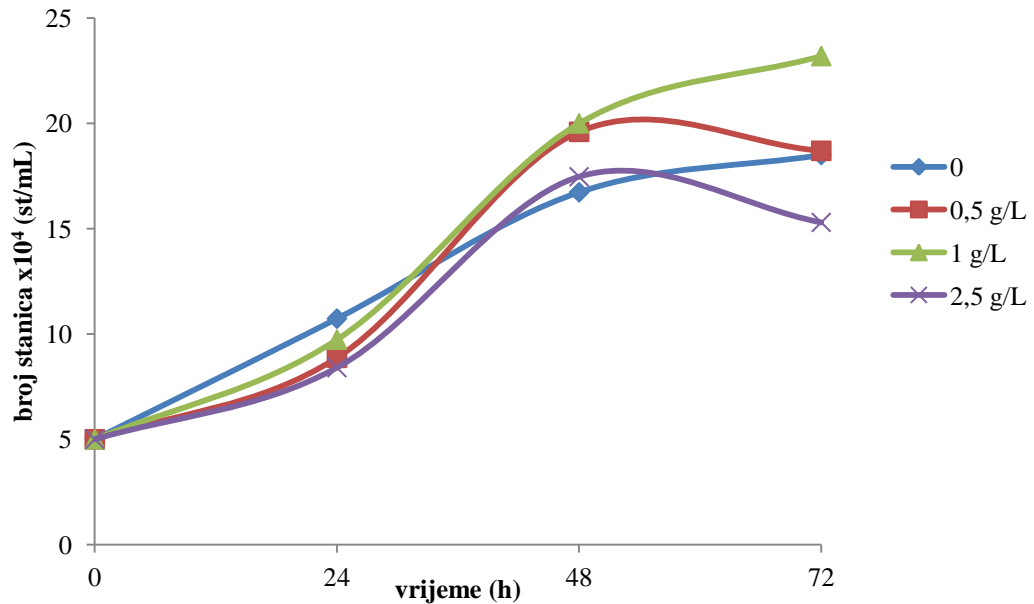
U uzorcima medija određen je utrošak glukoze tijekom 48 i 72 h uzgoja prikazan u Tablici 2.

Tablica 2. Utrošak glukoze u mediju pri različitim volumnim udjelima FBS

| Volumni udio FBS (%) | Koncentracija glukoze (mmol/L) | |
|----------------------|--------------------------------|------|
| | 48 h | 72 h |
| 10 | 4,0 | 6,5 |
| 5 | 3,2 | 5,5 |
| 2,5 | 2,4 | 3,8 |
| 0,5 | 1,5 | 3,0 |

4.2. Učinak dodatka hidrolizata soje na dinamiku rasta HeLa stanica

HeLa stanice su naciyepljene u DME mediju s 10% FBS i različitim koncentracijama hidrolizata soje (0-2,5 g/L) i praćena je dinamika rasta brojanjem stanica metodom tripan-plavo nakon 24, 48 i 72 h (Slika 5).



Slika 5. Učinak razlićitih koncentracija hidrolizata soje (0-2,5 g/L) na rast HeLa stanica

Na temelju dobivenih krivulja rasta HeLa stanica pri različitim koncentracijama hidrolizata soje FBS u DMEM mediju izračunati su prinos stanica, specifićna brzina rasta stanica (μ) i vrijeme udvostrućenja (t_d) koji su prikazani u Tablici 3, a utrošak glukoze je prikazan u Tablici 4.

Tablica 3. Parametri rasta HeLa stanica u DME mediju pri različitim koncentracijama hidrolizata soje (0-2,5 g/L)

| Koncentracija hidrolizata soje (g/L) | Prinos stanica ($\times 10^4$ st/mL) | μ (h^{-1}) | t_d (h) |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------|-----------|
| 0 | 13,5 | 0,01851 | 37,45 |
| 0,5 | 13,7 | 0,03304 | 20,98 |
| 1,0 | 18,2 | 0,03002 | 23,08 |
| 2,5 | 10,3 | 0,03051 | 22,71 |

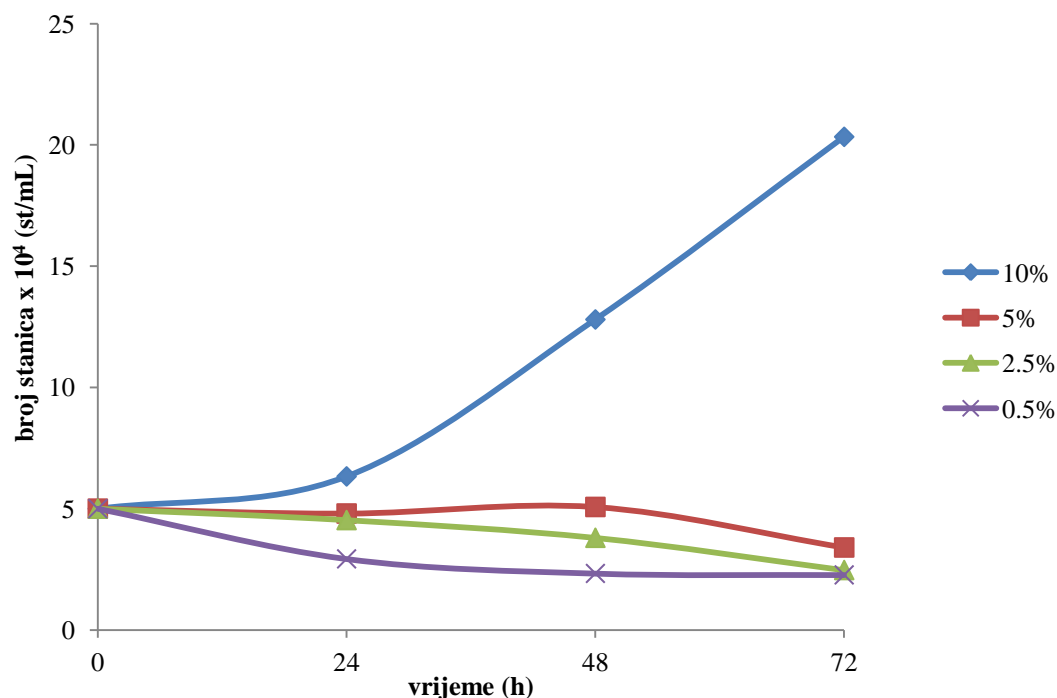
Tablica 4. Utrošak glukoze u DME mediju pri različitim koncentracijama hidrolizata soje (0-2,5 g/L)

| Koncentracija hidrolizata soje (g/L) | Koncentracija glukoze (mmol/L) | |
|--------------------------------------|---------------------------------|------|
| | 48 h | 72 h |
| 0 | 4,0 | 5,1 |
| 0,5 | 3,6 | 3,8 |
| 1,0 | 2,0 | 2,8 |
| 2,5 | 0,2 | 0,4 |

4.3. Učinak dodatka hidrolizata soje kao zamjene za dio seruma na dinamiku rasta

HeLa stanica

HeLa stanice su nacijepljene u DME mediju pri različitim volumnim udjelima FBS (0,5-10%) uz dodatak 5 g/L hidrolizata soje te je praćena dinamika rasta brojanjem stanica metodom tripan-plavo nakon 24, 48 i 72 h (Slika 6).



Slika 6. Učinak 5 g/L hidrolizata soje pri različitim udjelima FBS (0,5-10%) na rast HeLa stanica

Na temelju dobivenih rezultata može se uočiti rast HeLa stanica jedino u uzorku s 10% FBS dok je u svim ostalim uzorcima dodatak hidrolizata soje od 5 g/L imao negativan učinak na rast stanica.

5. RASPRAVA

Tijekom uzgoja kultura stanica u medij za uzgoj se dodaje serum koji stanicama osigurava sve sastojke potrebne za njihov rast, metabolizam i proliferaciju. Kako se serum dobiva iz životinja, postoje određeni zahtjevi za pouzdanije i znanstveno prihvatljivije metode uzgoja stanica i tkiva uključujući i osiguranje kvalitete (Gupta i sur., 2005). Iako je posljednjih godina napravljen veliki pomak u oblikovanju medija bez dodatka seruma i istraživanjima utjecaja dodatka biljnih hidrolizata kao izvora proteina, potrebno je ispitati učinak različitih koncentracija seruma na rast HeLa stanica i utrošak glukoze u mediju za uzgoj. Osim toga, u ovom radu ispitan je i učinak dodatka hidrolizata soje na rast HeLa stanica te mogućnost zamjene dijela seruma hidrolizatom soje.

Najprije je ispitan učinak različitih volumnih udjela seruma od 0,5; 2,5; 5 i 10% na proliferaciju HeLa stanica u DME mediju. Stanice su nacijeppljene u ploče s jažicama u početnoj koncentraciji od 5×10^4 st/mL i tijekom 3 dana (72 h) praćena je dinamika rasta stanica brojanjem stanica uz dodatak boje tripan-plavo (Slika 3). Na temelju dobivenih krivulja rasta izračunati su parametri rasta prikazani u Tablici 1. Najveći prinos stanica dobiven je u mediju za uzgoj s 10 % seruma ($35,13 \times 10^4$ st/mL), a specifićna brzina rasta iznosila je $0,04109 \text{ h}^{-1}$. Pri dodatku 5% seruma ostvaren je prinos stanica od $26,53 \times 10^4$ st/mL i specifićna brzina rasta od $0,02892 \text{ h}^{-1}$. Istovremeno je u uzorku s 2,5 % seruma ostvaren prinos stanica od $18,60 \times 10^4$ st/mL i specifićna brzina rasta od $0,01799 \text{ h}^{-1}$, dok su najniži prinos od 14×10^4 st/mL i specifićna brzina rasta od $0,01252 \text{ h}^{-1}$ ostvareni uz dodatak 0,5% seruma. Na temelju dobivenih rezultata mođe se uočiti da stanice HeLa ostvaruju najbolji rast pri 10% seruma, a dobiveni parametri rasta u korelaciji su s rezultatima rasta stanica (El Enshasy i sur., 2009).

Ućinak dodatka hidrolizata soje u rasponu koncentracija 0-2,5 g/L na proliferaciju HeLa stanica u DME mediju s 10% FBS ispitan je na stanicama HeLa tijekom 72 h uzgoja u ploćama s jažicama (Slika 5). Na temelju dobivenih krivulja rasta izračunati su parametri rasta (Tablica 3) pri ćemu je prinos stanica od $13,7 \times 10^4$ st/mL ostvaren u mediju s dodatkom 0,5 g/L hidrolizata soje uz specifićnu brzinu rasta od $0,03304 \text{ h}^{-1}$. Pri dodatku 1 g/L hidrolizata soje ostvaren je najveći prinos stanica od $18,2 \times 10^4$ st/mL i specifićna brzina rasta od $0,03002 \text{ h}^{-1}$. Istovremeno je u uzorku s 2,5 g/L hidrolizata soje ostvaren prinos stanica od $10,3 \times 10^4$ st/mL i specifićna brzina rasta od $0,03051 \text{ h}^{-1}$. Dobiveni rezultati ukazuju da dodatak 1 g/L hidrolizata soje najbolje utjeće na prinos HeLa stanica.

Na kraju svih uzgoja HeLa stanica u mediju uz dodatak različitih koncentracija seruma i hidrolizata soje, u medijima za uzgoj određene su koncentracije glukoze (Tablice 2. i 4.). Vidljivo je da se glukoza troši u svim uzorcima budući glukoza u mediju za uzgoj predstavlja jedan od glavnih izvora energije (Butler, 2004). Najveći utrošak glukoze od 6,5 mmol/L bio je u mediju s 10% seruma gdje je ujedno postignut najveći prinos stanica i specifična brzina rasta. Relativno slični utrošci glukoze u rasponu 0,2-5,1 mmol/L postignuti su mediju s koncentracijama seruma 0,5-5% što se može objasniti nižim postignutim prinosima odnosno koncentracijama stanica. U mediju s različitim koncentracijama hidrolizata soje najveći utrošak je postignut pri koncentraciji od 0 g/L i iznosi 5,1 mmol/L. Relativno slični utrošci glukoze u rasponu 0,2-4,0 mmol/L postignuti su u mediju s koncentracijom hidrolizata soje 0,5-2,5 g/L.

Učinak dodatka 5 g/L hidrolizata soje na proliferaciju HeLa stanica u DME mediju s različitim volumnim udjelima FBS (0,5-10%) ispitan je tijekom 72 h uzgoja i prikazan na Slici 6. Na temelju dobivenih rezultata rast HeLa stanica ostvaren je samo u mediju s 10% FBS dok je u ostalim uzorcima dodatak hidrolizata soje pokazao inhibicijski učinak na rast HeLa stanica. Poznato je da različiti hidrolizati proteina imaju različit utjecaj na rast, vijabilnost i proliferaciju stanica (Franek i sur., 2000.), a ovisno o korištenoj staničnoj liniji čak i hidrolizati istog podrijetla mogu imati različiti utjecaj na stimulaciju rasta kultura stanica. Također, dobiveni rezultat je u korelaciji s rezultatima učinka dodatka različitih hidrolizata u koncentracijama višim od 5 g/L na staničnoj liniji riba CCO (Andlar, 2013.)

Navedeno istraživanje predstavlja osnovu za razumijevanje nutritivnih zahtjeva HeLa stanica u kulturi uz naznake mogućnosti korištenja hidrolizata soje kao dodatka mediju sa serumom u cilju proizvodnje biomase stanica.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Najbolji rast i prinos HeLa stanica ostvaren je u DME mediju s dodatkom 10% seruma, dok je najsporiji rast i najniži prinos stanica ostvaren u DME mediju s 0,5 % seruma.
2. Najveći utrošak glukoze od 6,5 mmol/L ostvaren je u mediju s dodatkom 10% FBS, a najniži utrošak od 1,5 mmol/L u mediju s 0,5 % seruma. U mediju s različitim koncentracijama hidrolizata soje najveći utrošak glukoze od 5,1 mmol/L ostvaren je bez dodataka hidrolizata soje, a najmanji utrošak glukoze od 0,2 mmol/L ostvaren je pri dodatku hidrolizata od 2,5 g/L.
3. Dodatak 5 g/L hidrolizata soje pri volumnim udjelima FBS od 0,5-5% pokazao je inhibicijski učinak na proliferaciju HeLa stanica te se u ispitanoj koncentraciji ne može koristiti kao zamjena za proteine sadržane u serumu.

7. LITERATURA

- Andlar, M. (2013) Utjecaj dodatka hidrolizata proteina na rast stanične linije *Channel Catfish Ovary* (CCO) u mediju bez seruma. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Butler, M. (2004) *Animal Cell Culture and Technology*, 2. izd., Garland Science/Bios Scientific Publishers, New York.
- Eol (2015) Encyclopedia of life.<<http://eol.org/pages/641527/overview>>. Pristupljeno 31.kolovoza 2015.
- Franek, F., Hohenwarter, O., Katinger, H. (2000) Plant protein hydrolysates: Preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotech. Progress.* **16**, 688-692.
- Freshney, R.I. (2000) *Animal Cell Culture*, 2.izd., Oxford University Press, New York.
- Gupta, K., Rispin, A., Stitzel, K., Coecke, S., Harbell, J. (2005) Ensuring quality of in vitro alternative test methods: issues and answers. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **43**, 219-224.
- Hartshorn, J., McNorton S., Hernandez C., Van der Ent, E., Caple M., (2010), Soy Hydrolysate Optimization for Cell Culture Applications, Proceedings of the 20th ESACT Meeting, Dresden, Springer, Nizozemska, str. 777-783.
- Hendrick, V., Ribeiro de Sousa, D., dosSantosPedregal, A.D.S, Bassens, C., Rigaux, P., Sato, K., Kotarsky, K., Werenne J. (2006) Expression of recombinant protein in CHO and HeLa cells and its follow-up using EGF reporter gene. U: *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (Ijima, S. iNishijima K.I, ured.), Springer, Nizozemska, str. 55-59.
- EL-Enshasy, H. A., Abdeen, A., Abdeen, S., Elsayed, E. A., EL Demellawy, M., EL Shereef, A. A. (2009) Serum concentration effects on the kinetics and metabolism of HeLa-S3 cell growth and cell adaptability for successful proliferation in serum free medium. *World Appl. Sci. J.* **6**, 608-615.
- Jayme DW (1999) An animal origin perspective of common constituents of serum-free medium formulations. *Dev. Biol. Stand.* **99**, 181-187.
- Lobo-Alfonso J., Price P., Jayme D. (2010) Benefits and limitations of protein hydrolysates as components of serum-free media for animal cell culture applications. U: *Protein hydrolysates in biotechnology*, (Pasupuleti, V. K., Demain, A. L., ured.) Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York, str. 55-78.

Mizrahi, A., Lazar, A. (1991) Media for cultivation of animal cells: an overview. U: *Animal cell culture production of biologicals*, (Sasaki, R., Ikura, K., ured.) Kluwer Academic Publishers, Dortrecht, str. 159-180.

Nema, R., Khare, S. (2012) An animal cell culture: Advance technology for modern research. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **3**, 219-226.