

Prilagodba uzgoja stanica CHO-DP12 u hranjivom mediju suplementiranom hidrolizatima proteina industrijske konoplje

Špoljarić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:931477>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-24**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2023.

Lucija Špoljarić

**PRILAGODBA UZGOJA STANICA
CHO-DP12 U HRANJIVOM
MEDIJU SUPLEMENTIRANOM
HIDROLIZATIMA PROTEINA
INDUSTRIJSKE KONOPLJE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Igora Slivca, te uz pomoć dr. sc. Marijana Logarušića.

Diplomski rad je izrađen u sklopu projekta „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogače lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica“ (šifra projekta: IP-2016-06-3848) kojeg vodi prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček, a financiran je od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ).

ZAHVALA

Zahvaljujem se svom mentoru, prof. dr. sc. Igoru Slivcu na prenesenom znanju i strpljenju prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada. Veliko hvala i dr. sc. Marijanu Logarušiću, na prijateljskom pristupu prilikom izrade eksperimenta, kao i na uloženom vremenu za sva moja pitanja. Hvala mojoj sestri Matei, prijateljima i kolegama za svaki savjet, podršku i prijateljstvo. Hvala Nini na ljubavi i strpljenju. Naposljetku, ovaj uspjeh najviše dugujem svojim roditeljima, Adele i Gordanu, koji su mi svojim radom i trudom omogućili sretno i bezbrižno studiranje. Beskrajno sam im zahvalna na tome.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

PRILAGODBA UZGOJA STANICA CHO-DP12 U HRANJIVOM MEDIJU SUPLEMENTIRANOM
HIDROLIZATIMA PROTEINA INDUSTRIJSKE KONOPLJE

Lucija Špoljarić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058210156

Sažetak:

U današnje vrijeme CHO stanična linija je najatraktivniji i najpopularniji ekspresijski sustav u biotehnološkoj proizvodnji terapeutika. Jedan od najbitnijih koraka optimizacije biotehnološke proizvodnje istih je priprema hranjivog medija za uzgoj. Budući da obogaćivanje medija serumom životinjskog podrijetla nije u skladu sa zahtjevima dobre proizvođačke prakse, kao alternativni dodaci mediju intenzivno se istražuju biljni proteinski hidrolizati. Cilj ovog rada bio je ispitivanje djelovanja proteina izoliranih iz industrijske konoplje na rast i produktivnost IgG producirajuće stanične linije CHO-DP12. Stoga su hranjivom mediju za uzgoj dodavani enzimski hidrolizati navedenih proteina kao i frakcije hidrolizata (<10 kDa) dobivene pomoću mikrobne proteaze, *Neutralse*. Ranija istraživanja pokazala su uglavnom nepovoljan utjecaj ovih suplemenata na rast stanica, ali i poboljšanu staničnu produktivnost u odnosu na hidrolizatima netretiranu kulturu CHO-DP12. Zato je također ispitano može li početna prilagodba stanica na navedene suplemente u mediju utjecati na kasniji rast i produktivnost stanične kulture, u smislu boljeg rasta i većeg prinosa IgG.

Ključne riječi: CHO DP-12 stanična linija, proteinski hidrolizati, konoplja, protutijelo IgG

Rad sadrži: 42 stranice, 13 slika, 3 tablice, 32 literaturna navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Igor Slivac

Pomoć pri izradi: dr. sc. Marijan Logarušić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Igor Slivac (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (član)*
4. doc. dr. sc. Teuta Murati (zamjenski član)

Datum obrane: 2. 11. 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Culture Technology and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

ADAPTATION OF CHO-DP12 CELLS IN A NUTRIENT MEDIUM SUPPLEMENTED WITH INDUSTRIAL HEMP PROTEIN HYDROLYSATES

Lucija Špoljarić, bacc. ing. biotechn. 0058210156

Abstract: In today's time, the CHO cell line is the most attractive and popular expression system in biotechnological production of therapeutics. One of the most crucial steps in optimizing biotechnological production is the preparation of a nutrient medium for cultivation. Since enriching the medium with animal serum is not in line with the requirements of good manufacturing practice, plant protein hydrolysates are actively being researched as alternative additives to the medium. The aim of this study was to investigate the effect of proteins isolated from industrial hemp on the growth and productivity of the IgG-producing cell line CHO-DP12. Therefore, enzymatic hydrolysates of the mentioned proteins as well as hydrolyzate fractions (<10 kDa) obtained using the microbial protease, *Neutrase*, were added to the nutrient culture medium. Earlier studies showed a mostly unfavorable influence of these supplements on cell growth, but also improved cell productivity compared to the CHO-DP12 culture not treated with hydrolysates. Therefore, it was also examined whether the initial adaptation of the cells to the mentioned supplements in the medium can affect the subsequent growth and productivity of the cell culture, in terms of better growth and higher IgG yield.

Keywords: CHO-DP12 cell line, protein hydrolysates, hemp, IgG antibody

Thesis contains: 42 pages, 13 figures, 3 tables, 32 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Igor Slivac, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Marijan Logarušić, PhD

Reviewers:

1. Višnja Gaurina Srček, PhD, Full professor (president)
2. Igor Slivac, PhD, Full professor (mentor)
3. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor (member)
4. Teuta Murati PhD, (substitute)

Thesis defended: 02. 11. 2023

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA	3
2.1.1. Povijest razvoja tehnologije kulture životinjskih stanica	3
2.1.2. Razvoj tehnologije kulture životinjskih stanica	4
2.1.3. Proizvodne stanične linije	5
2.1.4. CHO stanična linija	5
2.1.5. CHO stanični metabolizam	8
2.1.6. Faze rasta CHO stanične linije	9
2.2. HRANJIVI MEDIJ.....	10
2.2.1. Vrste hranjivih medija	12
2.2.2. Serum	12
2.2.3. Hranjivi medij bez seruma	13
2.2.4. Hidrolizati proteina kao dodatak mediju bez seruma	14
2.3. KONOPLJA.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Hidrolizati uljne pogače konoplje	16
3.1.2. Kemikalije	16
3.1.3. Otopine i puferi	17
3.1.4. Uređaji i oprema	18
3.1.5. CHO DP-12 stanična linija	18
3.2. METODE.....	19
3.2.1. Uzgoj stanične linije CHO DP-12 u suspenziji	19
3.2.2. Određivanje broja stanica i vijabilnosti kulture	22
3.2.3. Određivanje koncentracije glukoze u uzorcima	24
3.2.4. Određivanje koncentracije monoklonskog protutijela IgG	25
3.2.5. Određivanje procesnih parametara rasta CHO DP-12 stanične linije	26
3.2.6. Obrada podataka	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. UTJECAJ PROTEINSKIH HIDROLIZATA KONOPLJE NA RAST CHO DP-12 STANIČNE LINIJE	30

4.2. UTJECAJ PROTEINSKIH HIDROLIZATA KONOPLJE NA	33
VIJABLINOST CHO DP-12 STANIČNE LINIJE	33
4.3. UTJECAJ PROTEINSKIH HIDROLIZATA KONOPLJE NA	34
PRODUKTIVNOST CHO DP-12 STANIČNE LINIJE	34
5. ZAKLJUČCI	39
6. LITERATURA	40

1. UVOD

U današnje vrijeme se za biotehnošku proizvodnju terapeutika sve više koriste životinjske stanice kao ekspresijski sustav. Točnije, za proizvodnju humanih terapeutskih proteina najčešće se koristi CHO (engl. *Chinese Hamster Ovary*) stanična linija zbog mnogih prednosti koji ju čine povoljnim domaćinom. Osim što dobro raste u kemijski definiranom mediju bez seruma kao suspenzijska kultura, CHO stanična linija ima sposobnost sekretorne ekspresije rekombinantnih proteina sa posttranslacijskim modifikacijama što uvelike olakšava izolaciju i pročišćavanje željenog produkta (Kim i sur., 2011).

Rastuća potreba za proizvodnjom terapeutskih proteina rezultirala je značajnim napretkom u optimizaciji eksperimenata i razvoju tehnologija koje potiču visoku kvalitetu i produktivnost CHO ekspresijskih sustava. Poseban naglasak je stavljen na optimizaciju hranjivog medija za uzgoj, koji je ključni faktor u kultivaciji životinjskih stanica. Hranjivi medij stanicama osigurava povoljan mikrokoliš kako bi se što bolje ispunili zahtjevi slični onima koje pogoduju *in vivo* staničnom rastu. Upravo iz tog razloga je bitno da hranjivi medij sadrži komponente poput aminokiselina, anorganskih soli, ugljikohidrata, lipida, vitamina, hormona i ostalih elemenata potrebnih stanicama. Mediju se često dodaje serum životinjskog podrijetla jer sadrži specifične nutrijente, poput hormona i faktora rasta, koji potiču proliferaciju i druge brojne stanične funkcije. Unatoč brojnim prednostima, danas se izbjegava korištenje seruma pri formulaciji hranjivog medija zbog par razloga. Naime, velika koncentracija proteina u serumu otežava izolaciju i pročišćavanje proizvoda, a to najčešće znači neisplativost procesa zbog iznimno skupih nizvodnih biotehnoških postupaka. Serum je također iznimno kompleksna smjesa neujednačenog sastava, što omogućava laku kontaminaciju mikroba poput virusa, priona i mikoplazma (Butler, 2013). Kako bi se izbjegli navedeni problemi, počelo se raditi na oblikovanju kemijskih definiranih medija koji bi isključivali upotrebu seruma (engl. *serum-free media*, SFM). Međutim, stanice uzgajane na kemijski definiranom mediju bez seruma pokazuju niži stupanj produktivnosti i rasta u odnosu na stanice koje rastu u mediju s dodatkom istog. Zbog toga su znanstvenici počeli tragati za alternativnim izvorima proteinskih hidrolizata kako bi se nadomjestio nedostatak nutrijenata koji su inače dobiveni dodatkom seruma u hranjivi medij. Hidrolizati su peptidni fragmenti koji nastaju putem kemijske, mikrobne ili enzimske hidrolize proteina dobivenih iz biljaka, kvasaca ili životinjskog tkiva. Proteinski hidrolizati biljnog podrijetla pokazali su se kao obećavajuća alternativa serumu, budući da njihov nutritivni

sastav potiče rast i produktivnost životinjskih stanica u kulturi. Nusproizvodi prehrambene industrije, posebno uljne pogače, predstavljaju jeftinu i lako dostupnu opciju bogatu proteinima. Korištenje takvih sirovina za optimizaciju medija s dodatkom biljnih proteinskih hidrolizata ne samo da bi smanjilo ukupne troškove, već bi i poboljšalo kvalitetu proizvodnog procesa eliminiranjem komponenti životinjskog podrijetla tijekom uzgoja.

Cilj ovog diplomskog rada bio je proučiti djelovanje proteinskih hidrolizata uljne pogače sjemenki konoplje i njene peptidne frakcije (<10 kDa) na rast, vijabilnost i produktivnost suspenzijske stanične linije CHO DP-12, koja proizvodi rekombinantno humano protutijelo imunoglobulin G (IgG) anti IL-8. Djelovanje hidrolizata proteina konoplje na stanice ispitano je u koncentraciji od 2 g L⁻¹. Ova vrsta hidrolizata, kao i njihova koncentracija, pokazala je određene nepovoljne učinke na rast CHO-DP-12 stanica, međutim rezultirala je znatno boljom staničnom produktivnošću (Logarušić, 2023). Iz tog razloga svrha ovog rada bila je ispitati ima li početna prilagodba stanica na hidrolizate proteina konoplje utjecaj na kasniji rast i produktivnost istih.

2. TEORIJSKI DIO

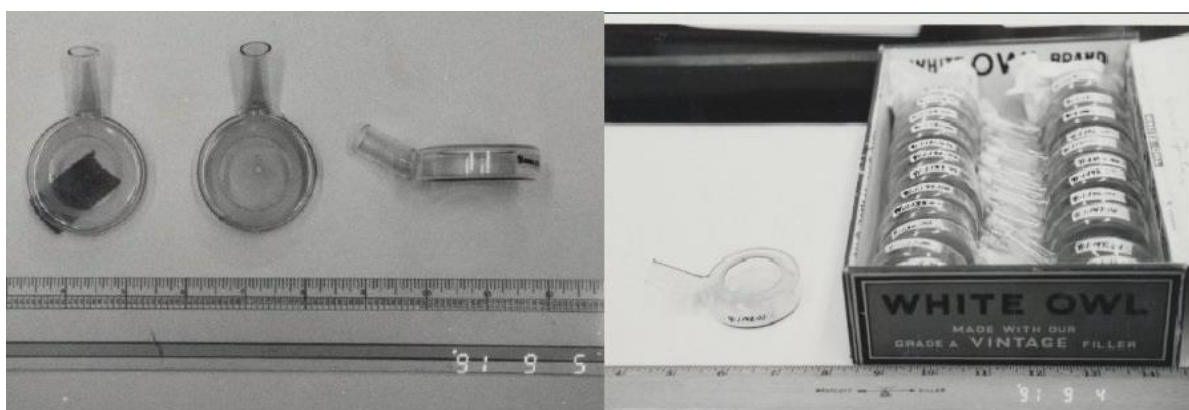
2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA

2.1.1. Povijest razvoja tehnologije kulture životinjskih stanica

Od samih početaka znanstvenog istraživanja kao profesionalnog djelovanja, znanstvenici su se trudili održavati stanice i tkiva izvan organizama u različite svrhe. Britanski fiziolog i farmakolog Sydney Ringer razvio je 1882. godine istoimenu otopinu, u kojoj je uspješno održavao otkucaje srca žabe nakon disekcije i izolacije iz tijela (Yao i Asayama, 2017). Ova uravnotežena slana otopina smatra se znanstvenim prvijencem *in vitro* uzgoja životinjskog tkiva. Nakon toga razvijeno je mnogo slanah otopina, a zajednička karakteristika bila im je jednostavan sastav (sadrže anorganske soli, ponekad s dodatkom glukoze kao hranjive tvari) te precizno prilagođena pH vrijednost, osmotski tlak i koncentracija soli kako bi se uspješno oponašali fiziološki uvjeti.

Nakon uspjeha Ringerove otopine, istraživači su godinama pokušavali uzgojiti stanice u kulturi, no stanice obično ne bi preživjele i rijetko su bile vidljive promjene koje se događaju kada se stanica priprema za mitozu. No, 1907. godine američki biolog Ross G. Harrison uspješno je uzgojio stanice živaca žabe u slanoj otopini te na taj način postavio temelje uzgoja stanica u kulturi (Yao i Asayama, 2017).

Veliki doprinos u tehnologiji kulture stanica pripisuje se i Alexisu Carrelu koji je stvorio prototip posude za kulturu stanica koja je osiguravala aseptične uvjete (slika 1).



Slika 1. Carrelov prototip posude za uzgoj stanica u kulturi, (History.NIH.gov.)

Carrelov učenik Montrose T. Burrows je 1909. otkrio da je limfa neprikladna za uzgoj stanica sisavaca te je umjesto nje koristio plazmu koja mu je omogućila uspješan uzgoj pilećeg embrija, a kasnije i stanica sisavaca. Carrel je 1912. godine dokazao da je moguće dugotrajno uzgajati stanice dobivene iz vezivnih tkiva pilećeg fetusa uz periodičnu izmjenu medija. Godine 1913. otkrio je da dodatak ekstrakta embrija krvnoj plazmi dramatično povećava staničnu proliferaciju i produljuje razdoblje uzgoja fibroblasta iz srca pilećeg embrija (Yao i Asayama, 2017.).

Sva navedena otkrića dovela su do razvoja tehnologije kulture životinjskih stanica koja u biotehnologiji obuhvaća kontrolirani uzgoj prethodno selekcioniranih stanica koje su izolirane iz životinjskog tkiva, te su genetički modificirane i prilagođene za proizvodnju visokovrijednih proizvoda kao što su cjepiva, rekombinantni proteini, monoklonska protutijela, hormoni i imunomodulatori (Damjanović, 2021).

2.1.2. Razvoj tehnologije kulture životinjskih stanica

Stanice u kulturi su *in vitro* uzgojene stanice koje su izolirane iz biljnog/životinjskog tkiva te uspješno rastu neovisno jedna o drugoj uz pomoć potrebnih hranjivih tvari i osiguravanjem uvjeta rasta.

Izolacijom pojedinačnih tkiva/organa različitih organizama te tretiranjem s raznim proteolitičkim enzimima (tripsin, kolagenaza) ili mehaničkim usitnjavanjem (mljevenje tkiva) moguće je pripremiti uzorak s pojedinačnim stanicama. Nacjepeljivanje takvih stanica na hranjivu podlogu dobiva se primarna stanična kultura. Primarne stanične kulture često se koriste u biomedicinskim i translacijskim istraživanjima zbog sličnosti s izvornim tkivom iz kojeg su izolirane. No, primarne stanične kulture su često fenotipski heterogene i smatraju se „ograničenima“ (sposobnost diobe je ograničena), te je stoga potrebno održavati kontinuiranu opskrbu zaliha stanica zbog prestanka njihove proliferacije nakon određenog broja dioba. (Segeritz i Vallier, 2017).

Nadalje, iz primarne stanične kulture moguće je uspostaviti staničnu liniju višestrukim precjepeljivanjem stanica gdje se postupno javlja prevladavanje jednog tipa stanica. Tijekom uspostave stanične linije dolazi do gubitka određenih funkcija i karakteristika koje su bile prisutne u tkivu iz kojeg su navedene stanice prvotno izolirane. Oštećeni su mehanizmi staničnog rasta jer pojedinačne stanice više nisu dio trodimenzionalne mreže interakcija sa susjednim stanicama i izvanstaničnim matriksom tkiva (Damjanović, 2021).

2.1.3. Proizvodne stanične linije

Za proizvodnju raznih proizvoda koji se koriste u terapijske, preparativne i dijagnostičke svrhe preporuča se korištenje životinjskih stanica zbog mogućnosti post-translacijskih modifikacija poput karboksilacije, glikozilacije i sl. Navedene modifikacije omogućuju proteinima zauzimanje odgovarajućih struktura te samim time pospješuju njihovu aktivnost i funkcionalnost.

Životinjske stanice koje se najčešće koriste u proizvodnji su stanice bubrega mladog hrčka (BHK-21), stanice ovarija kineskog hrčka (CHO) i modificirane mišje mijeloma stanice (NS0 I Sp2/0). Humane stanične linije imaju sposobnost proizvodnje proteina najsličnijih onima koji se prirodno sintetiziraju u ljudima, što može biti prednost u usporedbi s drugim ekspresijskim sustavima sisavaca (Dumont i sur., 2016).

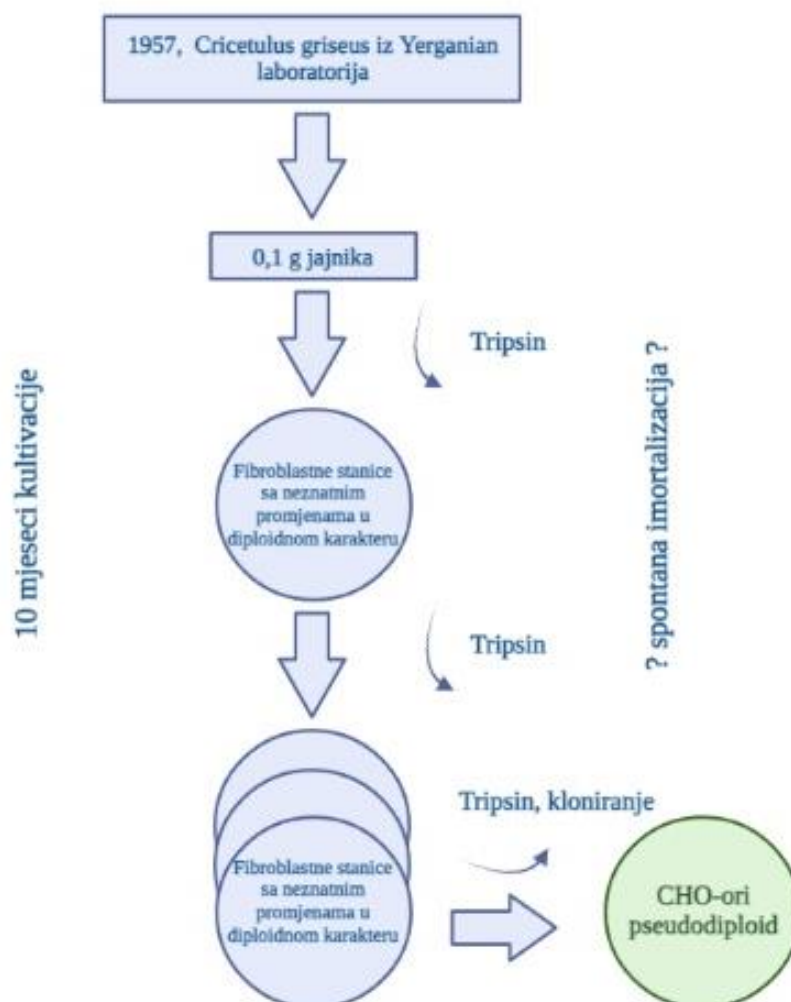
Uspostavljanje prve ljudske stanične linije, HeLa, dogodilo se 1951. godine iz uzorka cervikalnog carcinoma pacijentice Henriette Lacks. Ljudske diploidne stanice su 60-tih godina prošlog stoljeća razvijene za proizvodnju virusnih cjepiva te se i danas koriste u tu svrhu. Postoji određena zabrinutost zbog potencijalne prisutnosti latentnog onkogenog čimbenika u tim staničnim linijama te iz toga razloga nisu u široj upotrebi. S druge strane, zbog prednosti brzog rasta, visokog prinosa proteina i ulaganja u optimizaciju sustava, životinjske stanice ostale su preferirani supstrat za proizvodnju rekombinantnih proteina i monoklonskih antitijela (mAbs) (Dumont i sur., 2016).

Osim HeLa stanica, humane stanice koje se danas koriste u proizvodnji biofarmaceutika su stanice bubrega ljudskog embrija (Hek293) i stanice fibrosarkoma (HT-1080).

2.1.4. CHO stanična linija

CHO stanična linija uspostavljena je 1957. godine iz ovarija kineskog hrčka (*Criteculus griseus*), te danas predstavlja zlatni standard za proizvodnju terapijskih proteina (Wurm, 2013). Doktor Theodore T. Puck prvi je uspostavio navedene stanice iz 0,1 grama tkiva jajnika hrčka koji je dobavljen od strane Dr. Georgea Yerganiana iz Boston Children's Cancer Research Foundation (slika 2). Nakon tretiranja tripsinom, stanice su bile predominantno fibroblastne i

pokazivale su neznatne promjene u diploidnom karakteru (Wurm, 2013). Nakon 10 mjeseci tijekom kojih su se provodile uzastopne subkultivacije došlo je do morfoloških promjena u epitelni tip stanica i nastupila je spontana imortalizacija.



Slika 2. Schema provedenih postupaka koji su bili potrebni za uspostavljanje originalne CHO stanične linije (vlastita ilustracija izrađena pomoću programa BioRender.com)

Navedene CHO-ori stanice karakterizirane su kao otporne, vrlo dobro i brzo su rasle u adherentnoj kulturi te su imale visoku efikasnost kloniranja. Stanice su pokazivale zadovoljavajuće razine rasta čak i pri vrlo niskim koncentracijama FBS-a (engl. *fetal bovine serum*) koji je u to vrijeme predstavljao standard u komercijalnim medijima kod uzgoja stanične kulture. Rast CHO stanica nije u korelaciji s dodatkom seruma u medij, međutim stanicama je potreban prolin koji je neophodan za sve CHO stanične linije koje se danas koriste. Naime,

pretpostavlja se da je gubitak ili inaktivacija sinteze prolina rezultat mutacija koje su se dogodile u postupku spontane imortalizacije (Wurm, 2013).

Prednosti CHO stanične linije koje ju čine povoljnim domaćinom za proizvodnju terapijskih proteina uključuju:

- dobar rast u kemijski definiranom mediju bez seruma i suspenzijskoj kulturi
- većina patogenih virusa nema mogućnost replikacije u CHO stanicama (Lai i sur., 2013)
- sposobnost ekspresije rekombinantnih proteina s posttranslacijskim modifikacijama sličnim onima u ljudi (Kim i sur., 2011)
- sekretorna ekspresija željenih proteina koja omogućava jednostavnu izolaciju i pročišćavanje
- jednostavnost s kojom se metaboličke i druge mutacije mogu identificirati i zatim proučavati putem elegantnih eksperimentalnih pristupa (Wurm, 2013)
- jednostavno manipuliranje genomom (jednostavna transfekcija) metodama genetičkog inženjerstva što pridonosi genetičkoj raznolikosti (Fischer i sur., 2015)

Jedan od nedostataka kod korištenja životinjskih stanica u proizvodnji rekombinantnih proteina je niska specifična produktivnost. Zbog toga se industrijski procesi proizvodnje biofarmaceutika razvijaju u smjeru povećanja prinosa proizvoda te smanjenja troškova ukupne proizvodnje, a to se postiže poboljšanjem karakteristika rasta (poboljšanjem proliferacije stanica) i/ili postizanjem veće maksimalne gustoće vijabilnih stanica (Đurđević, 2021).

U slučaju CHO stanica, razvijeni su mnogi sustavi amplifikaciju gena koji rezultiraju većom produktivnosti te samim time i višim prinosima proizvodnog procesa. Najčešće amplifikacije koje se uspješno provode su amplifikacija posredovana glutamin sintetazom (GS), te amplifikacija posredovana dihidrofolat – reduktazom (DHFR) (Kim i sur., 2012).

2.1.5. CHO stanični metabolizam

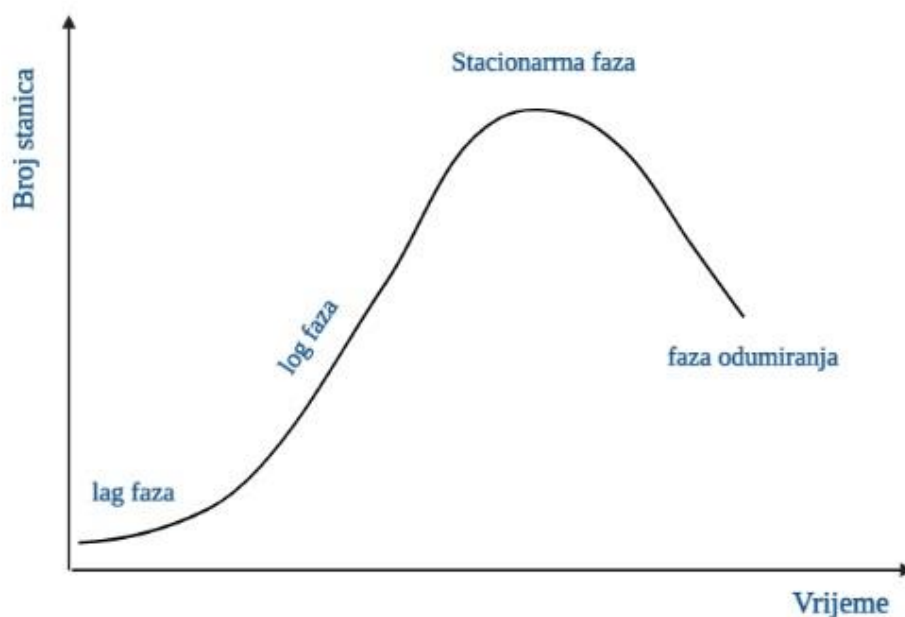
Metabolizam predstavlja zbroj kemijskih reakcija koje se odvijaju unutar svake stanice živog organizma i koje osiguravaju energiju za vitalne procese i sintezu novog organskog materijala (Kornberg, 2023). Katabolički putevi su putevi u kojima stanica na račun razgradnje makronutrijenata (ugljikohidrata, proteina, nukleinskih kiselina i lipida) dobiva energiju dok je s druge strane anabolizam proces u kojem se iz jednostavnih molekula (aminokiselina, masnih kiselina, monosaharida i dušikovih baza), uz utrošak energije sintetiziraju kompleksnije stanične makromolekule.

Životinjske stanice koriste glukozu i glutamin kao dva primarna izvora ugljika (Butler i sur., 1991). Glukoza se većinom metabolizira do piruvata koji se prevodi u laktat ili acetoacetat te navedeni ulazi u ciklus limunske kiseline gdje se oksidira do finalnih produkta H_2O i CO_2 .

Životinjske stanice pri niskim koncentracijama kisika provode anaerobnu razgradnju glukoze do laktata. U slučaju CHO stanica, provedena je analiza metaboličkih puteva i otkriveno je da stanice u eksponencijalnoj fazi rasta energiju generiraju putem aerobne glikolize te proizvode laktat neovisno o koncentraciji kisika, što je također karakteristika tumorskih stanica. Uslijed navedenog dolazi do akumulacije laktoze koja inhibira rast i produktivnost stanica (Mulukutla i sur., 2010), te također može smanjiti kvalitetu glikozilacije proteina (Ahn i Antoniewicz, 2011). Na isti način djeluje i amonijak koji nastaje metabolizmom glutamina. Dokazano je da stanice češće pribavljaju ugljik za citratni ciklus iz glutamina nego iz glukoze te iz toga razloga pokazuju povećanu potrebu za istim (Freshney, 2010). Zbog navedenih inhibicijskih učinaka laktoze i amonijaka od iznimne važnosti praćenje koncentracije istih tijekom uzgoja CHO stanične kulture.

2.1.6. Faze rasta CHO stanične linije

CHO stanice (kao i ostale stanice uzgajane u kulturi) pokazuju karakterističan sigmoidalni profil krivulje rasta (slika 3).



Slika 3. Krivulja rasta stanica (vlastita ilustracija izrađena uz pomoć programa BioRender.com)

Nakon naciepljivanja stanica na hranjivu podlogu, započinje lag faza rasta koja se još naziva i faza prilagodbe. U ovoj fazi stanice se ne dijele, prilagođavaju se uvjetima okoline te samom hranjivom mediju u kojem se nalaze. Trajanje lag faze ovisi o početnoj koncentraciji naciepljenih stanica (što je koncentracija veća, navedena faza će kraće trajati) (Berljavac, 2019). Sljedeća faza je log faza, koja se opisuje kao fazu u kojoj dolazi do eksponencijalnog povećanja broja stanica, pa se još naziva i eksponencijalnom fazom. U eksponencijalnoj fazi stanice su najvijabilnije. Faktori koji utječu na djelovanje log faze su uvjeti uzgoja te gustoća i karakteristike same stanične linije. Kada u hranjivom mediju ponestane hranjivih tvari ili dolazi do nakupljanja određenih toksičnih produkata metabolizma, stanice prelaze u stacionarnu fazu rasta. U stacionarnoj fazi nema značajnih promjena u broju stanica zbog izjednačavanja brzine

rasta i odumiranja stanica (Đurđević, 2021). Iako u stacionarnoj fazi dolazi do nakupljanja inhibitornih produkata metabolizma, nerijetko dolazi i do sinteze korisnih sekundarnih metabolita (npr. terapijskih proteina) (Berljavac, 2019). Iz tog razloga se u stacionarnoj fazi prikupljaju produkti proizvodnog procesa. U posljednjoj fazi stanice ulaze u apoptozu (mehanizam programirane stanične smrti) ili umiru zbog nedostatka nutrijenata, akumuliranja toksičnih spojeva ili nekog mehaničkog oštećenja. U fazi odumiranja vijabilnost naglo opada i zaustavlja se uzgoj stanica.

Iznimno je bitno poznavati profil rasta stanica zbog mogućnosti praćenja staničnog odgovora na promjene u mikrookolišu koje mogu nastupiti uslijed dodavanja određenih komponenti u hranjivi medij, kao i promjene nekih od uvjeta uzgoja (Damjanović, 2021).

2.2. HRANJIVI MEDIJ

Hranjivi medij predstavlja skup nutrijenata i kemijskih spojeva kojima je uloga zadovoljiti stanične potrebe u *in vitro* uvjetima. U istraživanjima sa staničnim kulturama vrlo je važno izabrati prikladan medij jer njegov sastav uvelike utječe na vijabilnost i produktivnost stanica (Yao i Asayama, 2017). Osnovne komponente svakog hranjivog medija su: voda, molekule ugljikohidrata, aminokiseline, anorganske soli, lipidi, proteini, vitamini, hormoni i minerali. Komercijalno dostupni mediji najčešće su dostupni u tekućem ili praškastom obliku.

Voda koja se koristi prilikom pripreme medija mora biti izrazito visoke kvalitete i čistoće kako bi se izbjegli kontaminanti kao što su elementi u tragovima i endotoksini koji bi kontaminirali staničnu kulturu i inhibirali njen rast.

Sljedeći bitan sastojak je izvor ugljika koji je također izvor energije. U tu svrhu se najčešće koristi glukoza, a dodaje se u koncentracijama od 0,9 do 10 g L⁻¹. Osim glukoze, kao izvor energije u CHO staničnim kulturama koristi se i glutamin. Glutamin je esencijalan u mediju za uzgoj CHO stanične kulture jer poboljšava vijabilnost stanica, reducira proizvodnju laktata, povećava produktivnost te u njegovoj odsutnosti dolazi do odgode eksponencijalne faze rasta (Đurđević, 2021). Također, stanice glutamin koriste za sintezu nukleotida, proteina i lipida (Butler i sur., 1991).

No, nedostatak korištenja glutamina je što njegovom metaboličkom razgradnjom nastaje amonijak, koji u visokoj koncentraciji može usporiti rast stanica te utjecati na stanično

iskorištavanje drugih aminokiselina prisutnih u mediju. Zbog navedenih nedostataka, trenutno se istražuju određene alternative glutamina (npr. alanil-glutamino ili glicin-glutamin), kako bi se usporio metabolizam istog (Ritacco i sur., 2018).

Aminokiseline su također ključan sastojak hranjivog medija za uzgoj CHO stanica jer predstavljaju građevne jedinice proteina. Male promjene u koncentraciji aminokiselina u mediju mogu uvelike promijeniti krivulju staničnog rasta i produktivnost stanične linije (Arora, 2013). Za razliku od neesencijalnih, esencijalne aminokiseline potrebno je dodati u medij jer ih stanice ne mogu same sintetizirati. Fenilalanin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, treonin, triptofan i valin su esencijalne aminokiseline i dodaju se u većim koncentracijama u medij jer ih stanice troše u relativno velikim količinama. Neesencijalne aminokiseline alanin, arginin, asparagin, aspartat, cistein, glutamin, glutamat, glicin, prolin, serin i tirozin se također dodaju hranjivom mediju kako bi se nadoknadile aminokiseline potrošene tijekom rasta. Kao što je ranije navedeno, glutamin je najvažnija aminokiselina koja se dodaje u hranjivi medij pa je koncentracija u kojoj se dodaje veća od koncentracije ostalih aminokiselina i obično iznosi 2-4 mM.

Lipidi, iako nisu nužan dodatak mediju (njihovo odsustvo ne narušava proliferaciju i produktivnost stanica) (Ritacco i sur., 2018), dodaju se radi pozitivnog učinka na održavanje vijabilnosti stanica i glikozilaciju (Jenkins i sur., 1994).

Vitamini su također sastavni dio hranjivih medija, jer su mnogi od njih esencijalni za rast i proliferaciju stanica, a u stanici se ne mogu sintetizirati u potrebnim količinama. Dijele se na vitamine topljive u vodi (vitamini B skupine i vitamin C) i vitamine topljive u mastima (vitamini A, D, E i K). Većina komercijalno dostupnih medija sadrži vitamine B skupine jer je dokazano da utječu na povećanje prinosa protutijela i do tri puta (Takagi i sur., 2001).

Osim vitamina, dodatak male koncentracije elemenata u tragovima (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo i Se) bitan je za provođenje bioloških procesa zbog sudjelovanja istih u reakcijama prijenosa elektrona u aktivnim mjestima mnogih enzima.

Nadalje, anorganske soli dodaju se u medij radi održavanja osmotske ravnoteže i regulacije membranskog potencijala, ali i kao kofaktori. U hranjivi medij se dodaju u obliku iona natrija, kalija i kalcija (Arora, 2013).

Ponekad se mediju dodaju određeni antibiotici kako bi se stanična linija zaštitila od rasta mikrobnih i fungalnih kontaminanata, no iznimno je bitna kontrolirana i pravilna upotreba kako ne bi došlo do pojave rezistentnih sojeva.

Faktori rasta su peptidi(mali proteini) koji često imaju ulogu hormona, a dodaju se u hranjivi medij jer utječu na rast, proliferaciju, oporavak stanica i diferencijaciju, te je bez njih često rast stanica inhibiran ili potpuno obustavljen.

2.2.1. Vrste hranjivih medija

Hranjivi mediji za uzgoj životinjskih stanica mogu se podijeliti u dvije grupe:

1. Prirodni mediji- mediji koji sadrže isključivo biološke tekućine prirodno prisutne u tijelu (plazma, limfa, serum, ekstrakti raznih tkiva, ekstrakt embrija te razni koagulansi). Uzgoj stanica u prirodnim medijima daje dobre rezultate, no glavni nedostatak je upravo reproducibilnost istih radi nejednakog sastava prirodnog hranjivog medija (Arora, 2013). Nadalje, zbog nepoznavanja točnog sastava, nemoguće je odrediti minimalne količine specifičnih hranjivih sastojaka potrebnih za rast stanica u takvom mediju (Ritacco i sur., 2018).
2. Sintetski hranjivi mediji- mediji pripremljeni dodatkom raznih organskih i anorganskih tvari, proteina, vitamina, soli, ugljikohidrata, faktora rasta, hormona i dr. u osnovni (bazalni) medij. Postoje razne vrste sintetskih medija koji se dizajniraju ovisno o vrsti stanica koje se planiraju uzgajati te svrsi uzgoja istih u *in vitro* uvjetima (Arora, 2013). Razlikuje se nekoliko vrsta sintetskih hranjivih medija:
 - a) Hranjivi medij bez seruma
 - b) Hranjivi medij s dodatkom seruma
 - c) Hranjivi medij bez proteina
 - d) Kemijski definirani hranjivi medij

2.2.2. Serum

Serum je tekućina koja predstavlja osnovni sastojak krvi, a dobije se kada se iz krvi odstrane krvne stanice i faktor zgrušavanja, fibrin. Obično se dodaje u hranjive medije jer služi kao izvor aminokiselina, lipida, vitamina, ugljikohidrata, faktora rasta, minerala, hormona itd. Zbog navedenih sastojaka dodatak seruma stimulira rast stanica, proliferaciju i diferencijaciju.

Različiti proteini iz seruma sudjeluju u prijenosu hormona, omogućavaju vezanje stanica za supstrat, sudjeluju u transportu raznih tvari u i iz stanice te štite stanicu od proteaza (Yao i Asayama, 2017). Najčešće korišteni serumi danas su FBS, CS (engl. *calf serum*) i HS (engl. *horse serum*) koji se u hranjivi medij dodaju u koncentraciji 2-10 %. Unatoč brojnim prednostima, danas se izbjegava korištenje seruma pri formulaciji hranjivog medija zbog par razloga. Naime, unatoč ranije navedenim pozitivnim učincima proteina u serumu, isti uzrokuju iznimno visoku cijenu nizvodnih biotehnoloških postupaka. Velika koncentracija proteina u serumu otežava izolaciju i pročišćavanje proizvoda a to najčešće znači neisplativost procesa. Serum je također iznimno kompleksna smjesa neujednačenog sastava, što omogućava laku kontaminaciju mikroba poput virusa, priona i mikoplazma (Butler, 2013). Nadalje, serum ima i ograničenu dostupnost te visoku cijenu, zbog čega se serum danas sve više smatra nepoželjnim za uporabu u industrijskoj primjeni staničnih kultura, i s procesnog i s regulatornog stajališta (Đurđević, 2021).

2.2.3. Hranjivi medij bez seruma

Za razliku od medija s dodatkom seruma, hranjivi medij kojem se ne dodaje serum ima definirani sastav, pa se posljedično mogu izbjeći varijacije u sastavu od šarže do šarže, što omogućava visoku reproducibilnost rezultata u znanstvenim istraživanjima. No, upotreba ovakvog medija može rezultirati smanjenom produktivnošću proizvodnih staničnih linija i lošijom kvalitetom proizvoda (Heidemann i sur., 2000). Postoje pažljivo formulirani kemijski definirani medij koji osiguravaju dobre rezultate, međutim zbog svoje visoke cijene često predstavljaju ograničavajući faktor, pogotovo ako se uzme u obzir količina medija potrebna prilikom proizvodnje u industrijskom mjerilu (Damjanović, 2021).

Upravo zbog tog razloga znanstvenici su istraživali mnoge alternative za serum koje bi osigurale zadovoljavajući rast i vijabilnost stanica kao i kvalitetan finalni proizvod. Potreba za serum ekvivalentne faktore značajno varira između staničnih linija, stoga je nemoguće dizajnirati univerzalnu formulaciju medija bez seruma koja bi bila prikladna za sve stanične linije (Butler, 2013). Proteinski hidrolizati dobiveni iz životinjskog tkiva pokazali su se kao dobra alternativa fetalnom goveđem serumu, no njihova mana je visok rizik od kontaminacije (Yao i Asayama, 2017). Također razni faktori rasta u malim količinama induciraju proliferaciju i diferencijaciju, ali također predstavljaju rizik od kontaminacije virusima. Hormon rasta i inzulin bitni su za pojačavanje proliferacije stanica, ali su nestabilni pri temperaturi od 37 °C pa se moraju dodati

u većim koncentracijama (Yao i Asayama, 2017). Kao dobar izbor pokazali su se i proteinski nosači albumin, laktoferin i transferin. Albumin ima antioksidativno djelovanje i mogućnost neutralizacije toksina. Osim toga, nosač je za mnoge tvari kao što su lipidi, aminokiseline, vitamini, te elementi bakar i nikal. No, ukoliko je albumin izoliran iz seruma, moguća je kontaminacija virusima, te količina lipida i elemenata vezana na albumin može varirati (Yao i Asayama, 2017). Obećavajuće rezultate dali su hidrolizati biljnih proteina jer predstavljaju manji rizik od kontaminacije patogenom, a pojačavaju stopu staničnog rasta, smanjuju vjerojatnost apoptoze i poboljšavaju kvalitetu produkta.

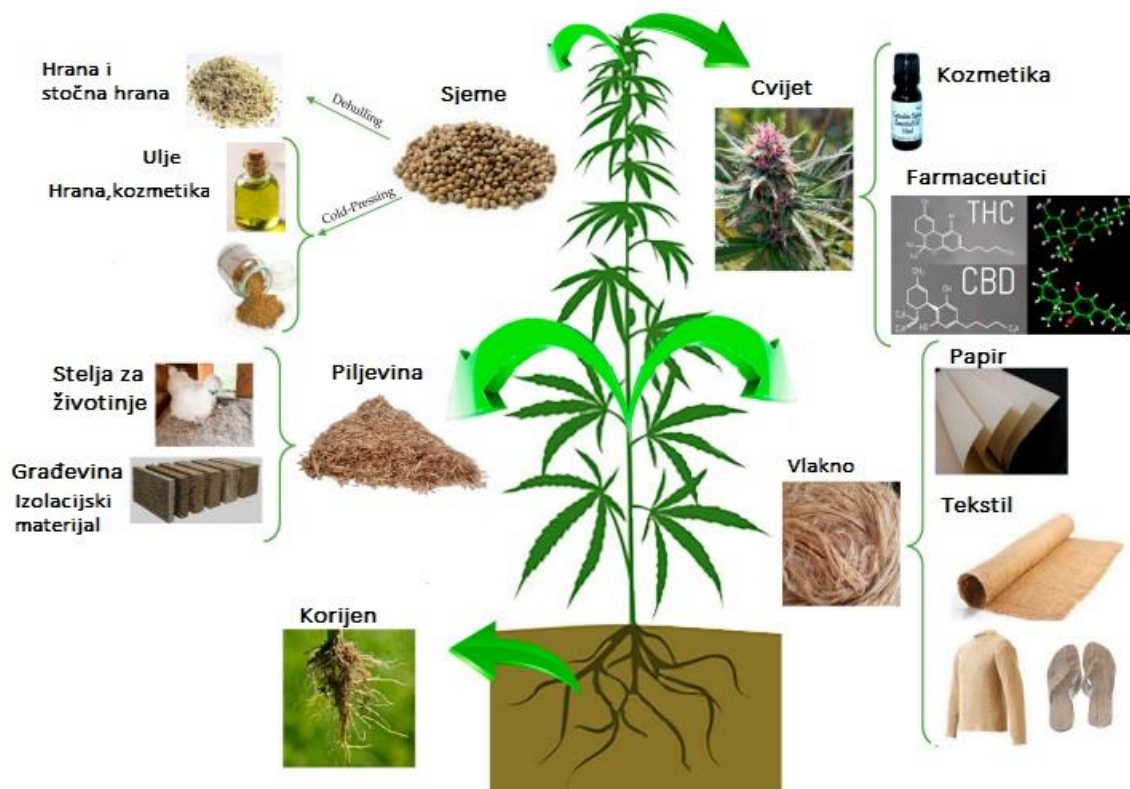
2.2.4. Hidrolizati proteina kao dodatak mediju bez seruma

Općenito, hidrolizati proteina pripremaju se enzimskom, kiselinskom ili mikrobnom fermentacijom biološkog materijala kojom se dobije kompleksna smjesa peptida, aminokiselina, lipida i elemenata u tragovima koji potiču proliferaciju i utječu na povećanje aktivnosti stanica. Hidrolizati proteina biljnog porijekla istraživani su od sedamdesetih godina prošlog stoljeća kao alternativa FBS-u u bazalnim hranjivim medijima. Učinak hidrolizata proteina na cjelokupni proizvodni proces ovisi o mnogo parametara. Osim o koncentraciji hidrolizata i početnoj sirovini u koju se isti dodaje, učinak također varira ovisno o kojoj se staničnoj liniji radi (Babcock i sur., 2010). Također, produkti hidrolize su mnogobrojni te je iz tog razloga važno eksperimentalno odrediti dozu koja će biti prikladna za određeni bazalni medij (Logarušić i sur., 2021).

2.3. KONOPLJA

Cannabis sativa L., poznatija kao konoplja je jednogodišnja dvodomna biljka koja pripada obitelji *Cannabaceae* a globalno je poznata po svom kemijskom sastavu radi kojeg ima psihoaktivna svojstva. Smatra se jednom od najstarije uzgajanih biljaka i zbog svoje duge povijesti uzgoja teško je identificirati točno središte njezinog porijekla. Kako bi dobili odgovor na to pitanje, znanstvenici su proveli filogenetska istraživanja temeljena na molekularnoj analizi i istraživanjima sličnosti sekvenci DNA izoliranih iz arheobotaničkih i modernih uzoraka navedene biljke. Rezultati su sugerirali da ova biljna vrsta potječe iz središnje Azije i da je uvedena u Europu kao uzgajana i pripitomljena poljoprivredna biljka tijekom brončanog doba (Farinon i sur., 2020). Također ovo istraživanje potvrđuju pronalasci sjemenke konoplje u ostacima kineske hrane koja potječe iz razdoblja 8 500 godina prije Krista (Paić, 2012). Na slici 4 prikazane su razne mogućnosti primjene konoplje. Sjeme konoplje koristi se u prehranbenoj

industriji bilo u obliku sjemenki, brašna ili ulja kao stočna hrana, te nutritivni dodatak u prehrambenim proizvodima. Ulje sjemenki se također koristi u kozmetičkoj industriji. Korijenje biljke je pokazalo dobre rezultate u fitoremedijaciji tla zbog razgranatosti. Stabljika se može koristiti u obliku piljevine i vlakana te se zbog toga koristi u građevini kao izolacijski materijal, stelja za stoku, ali i u proizvodnji papira i tekstila. Cvijet konoplje je bogat raznim biološki aktivnim spojevima pa se koristi u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Farinon i sur., 2020).



Slika 4. Primjena raznih djelova biljke Konoplje (*Cannabis sativa* L.), (Farinon B., 2020)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Hidrolizati uljne pogače konoplje

Hidrolizati uljne pogače konoplje tj. peptidne frakcije korištene u ovom radu pripremljene su u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, te su do trenutka upotrebe čuvane na temperaturi od -80 °C. Početna sirovina za pripremu hidrolizata proteina konoplje je brašno uljne pogače konoplje (Bio Soul Food, Shakti Co d.o.o., Samobor, Hrvatska), Postupak pripreme hidrolizata konoplje iz proteinskog izolata uljne pogače konoplje opisan je u diplomskom radu kolegice Anje Damjanović (2021), a postupak pripreme frakcija proteina molarne mase <10 i <1 kDa opisan je u diplomskom radu kolegice Marije Cavrić (2021).

3.1.2. Kemikalije

- Destilirana voda, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska
- Tripan-plavo boja, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- PowerCHO®-2 CD, Chemically Defined Selective Medium, Lonza, Verviers, Belgija
- Ala-Gln (200 mM Otopina Alanin-Glutamin), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Anti-Clumping Agent, GIBCO by Life Technologies, Paisley, UK
- Rh-inzulin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Otopina Antibiotik/Antimikotik (100x), Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka
- Metotreksat (MTX), Cerilliant, Round Rock, Texas, SAD
- Glucose GOD-PAP, BIOLABO S.A.S., Maizy, Francuska
- L-Lactic Acid (L-Lactate) Assay Kit, Megazyme, Bray, Irska
- L-Glutamine/Ammonia Assay Kit (Rapid), Megazyme, Bray, Irska
- Etanol, 96 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska

- Natrij-citrat dihidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) (SIGMA 7-9[®]), ≥ 99 % (titracija), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Limunska kiselina monohidrat, T.T.T. d.o.o., Sveta Nedelja, Hrvatska
- Natrij-dihidrogenfosfat monohidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Dinatrij-hidrogenfosfat heptahidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska

3.1.3. Otopine i puferi

- Natrij-fosfatni pufer (0,1 M; pH 7,4; V = 0,5 L; kalibriranje kolone)

Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	10,107 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	1,697 g
Destilirana voda	500 mL

- Natrij-fosfatni pufer (50 mM; pH 7,55; V = 0,7 L; pufer za vezanje/ispiranje)

Natrij-fosfatni pufer 0,1 M	350 mL
Destilirana voda	350 mL

- Limunska kiselina (0,1 M; pH 2,73; V = 1,0 L; pufer za eluciju)

Natrij-citrat dihidrat	2,759 g
Limunska kiselina monohidrat	17,408 g
Destilirana voda	1,0 L

- TRIS pufer (20 mM; pH 7,4; V = 0,1 L)

Tris	242,28 mg
HCl 2 M	900 μL
Destilirana voda	99 mL

• Pufer za dugotrajno čuvanje (pH 7,4; V = 0,1 L)

Etanol (96 %) 20 mL

TRIS pufer (20 mM; pH 7,4) 80 mL

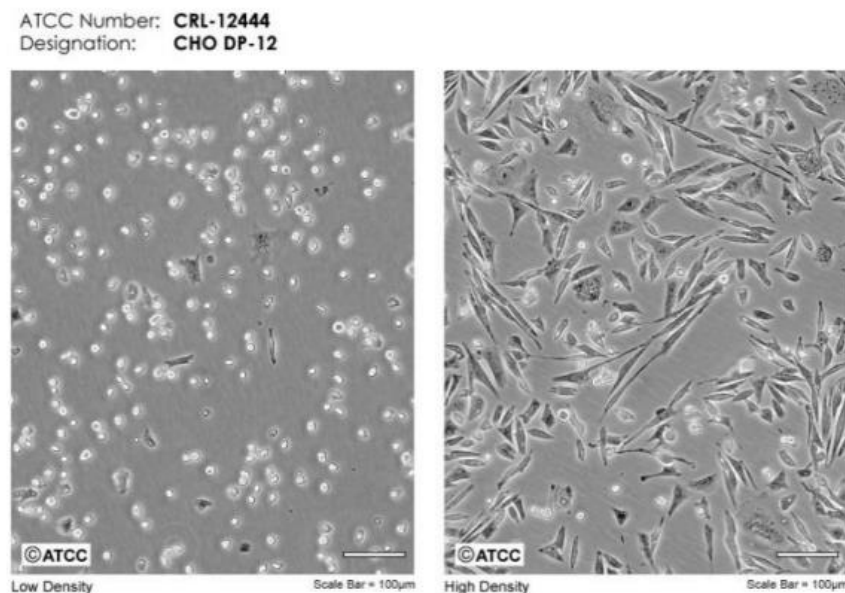
3.1.4. Uređaji i oprema

- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Memmert, Njemačka
- Komora za sterilni rad (laminar flow cabinet), Kambič, Slovenija
- Svjetlosni mikroskop Axiostar 1122-100, Carl Zeiss, Njemačka
- Neubauer komorica za brojanje stanica, Reichart Bright-line, Buffalo, NY, SAD
- Kružna tresilica PSU-10i, Biosan, Riga, Latvija
- Hladnjak (4 °C, -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Hladnjak (-80 °C), TT 80 FRYKA, Njemačka
- Centrifuga, ECEN-205, MRC Lab, Izrael
- Vrtložna miješalica, IKA, Njemačka
- Plastične, sterilne Falcon tube za uzgoj staničnih kultura, Corning, Arizona, SAD
- Spektrofotometar, Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD
- Automatske pipete (0,5–10 µL, 10–100 µL, 100–1000 µL) i nastavci za njih, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- Laboratorijski pribor (epruvete, menzure, laboratorijske čaše, kivete, odmjerne tikvice, boce štrcaljke, i dr.)
- HPLC uređaj (Agilent Technologies 1260 Infinity II), Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD
- HPLC kolona za određivanje IgG-a (Agilent Bio-Monolith Column Protein A), Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD
- Sterilni filter CHROMAFIL Xtra RC (13 mm, 0,22 µm), Macherey-Nagel, Njemačka

3.1.5. CHO DP-12 stanična linija

U ovom diplomskom radu korištena je CHO DP-12 adherentna stanična linija (slika 5), koja je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Zavoda za

biokemijsko inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu adaptirana na suspenzijski rast. Ista je pohranjena u banci stanica American Type Culture Collection (ATCC) kao adherentna stanična linija, te je iz iste i nabavljena. Navedena stanična linija proizvodi rekombinantno humano monoklonsko protutijelo anti-IL-8, izotip IgG1.



Slika 5. Stanična linija CHO DP-12 (ATCC, 2021)

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj stanične linije CHO DP-12 u suspenziji

Uzgoj stanica započinje odmrzavanjem stanica koje su zamrznute na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u ampulama volumena 1 mL (koncentracija stanica 1×10^7 stanica mL^{-1}). Ampula sa stanicama je odmrznuta u vodenoj kupelji pri temperaturi od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, a zatim je suspenzija prenesena u sterilnu epruvetu s 5-10 mL kompletnog PowerCHO medija. Sadržaj epruvete je podvrgnut centrifugiranju tijekom 5 minuta pri $1000\text{ okretaja min}^{-1}$, nakon čega je supernatant uklonjen, a talog stanica je resuspendiran u PowerCHO 25 mediju. Stanice su potom nacijepljene u koncentraciji od $2,5 \cdot 10^5$ st mL^{-1} u 35 mL medija u sterilnoj Falcon tubi te uzgajane do koncentracije od $2 \cdot 10^6$ st mL^{-1} , nakon čega su precijjepljene. Stanice su uzgajane u PowerCHO[®] - 2 CD hranjivom mediju, u čiji su volumen od 94,75 mL dodane sljedeće komponente: 4 mL otopine Ala-Gln, 1 mL Antibiotik/Antimikotik otopine, 250 µL Anti-Clumping otopine, 20 µL Rh-inzulina i 9 µL MTX-

a. Time je PowerCHO® - 2 CD hranjivi medij postao kompletan za uzgoj suspenzijskih CHO DP-12 stanica.

Nakon tri precjepeljivanja stanica, stanice su nacijepljene u 6 plastičnih epruveta za centrifugu (3 uzorka, po dvije paralele) u početnoj koncentraciji od $2,5 \cdot 10^5$ stanica mL^{-1} . Uzorci su opisani u tablici 1.

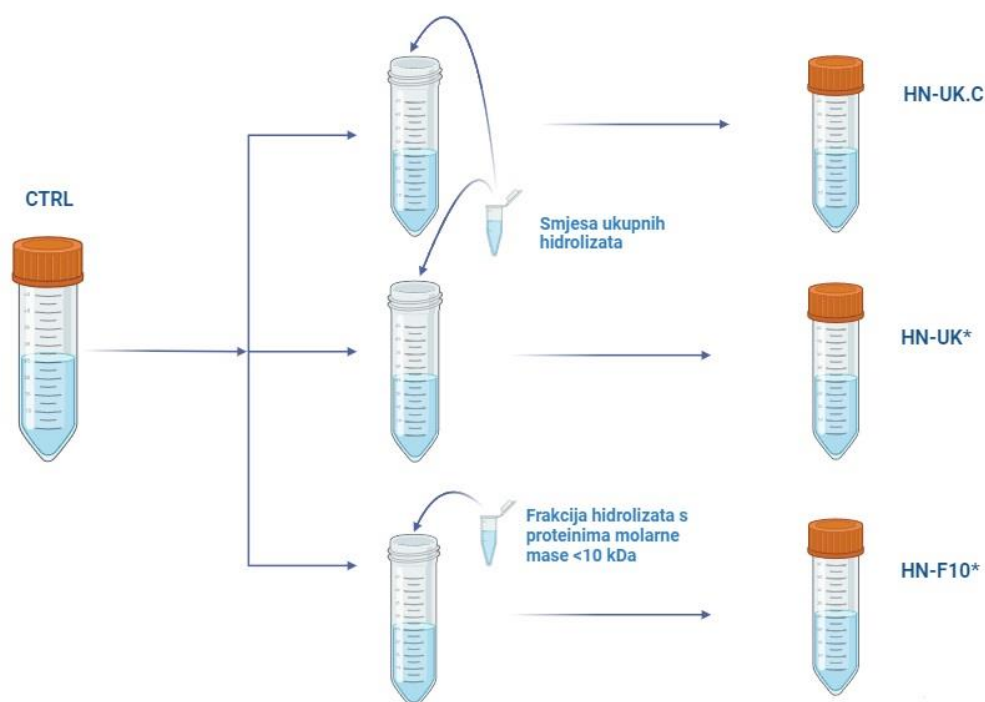
Tablica 1. Opis pripremljenih uzoraka

Uzorak	Opis uzorka	Skraćenica
Uzorak 1	Kontrola, uzorak bez dodanih hidrolizata proteina konoplje	CTRL
Uzorak 2	Smjesa ukupnih hidrolizata proteina brašna konoplje dobivenih djelovanjem enzima <i>Neutrase</i> u koncentraciji 2 gL^{-1}	HN-UK
Uzorak 3	Frakcija hidrolizata konoplje sa proteinima molarne mase $< 10 \text{ kDa}$ dobivenog djelovanjem enzima <i>Neutrase</i> , u koncentraciji od 2 g L^{-1}	HN-F10
Uzorak 4	Kontrolni uzorak u koji je trećeg dana uzgoja dodana smjesa ukupnih hidrolizata proteina brašna konoplje dobivenih djelovanjem <i>Neutrase</i> u koncentraciji 2 gL^{-1}	HN-UK.C
Uzorak 5	Kontrolni uzorak u koji je trećeg dana uzgoja dodana smjesa ukupnih hidrolizata proteina brašna konoplje	HN-UK*

	dobivenih djelovanjem <i>Neutrased</i> u koncentraciji 2 gL ⁻¹	
Uzorak 6	Kontrolni uzorak u koji je trećeg dana uzgoja dodana frakcija hidrolizata proteina konoplje sa proteinima molarne mase <10 kDa dobivenih djelovanjem <i>Neutrased</i> u koncentraciji 2 gL ⁻¹	HN-F10*

(*) predstavlja oznaku za medij s naknadno dodanim hidrolizatom

Stanice su uzgajane u kompletnom PowerCHO®-2 CD mediju ukupnog volumena 22 mL. Stanice su uzgajane dok nisu dosegle između $2-3 \cdot 10^6$ st mL⁻¹ te su nakon precijepljivanja u svježi medij u određene uzorke dodani ranije navedeni hidrolizati proteina. Uzorak 1 (CTRL) dosegao je $> 2 \cdot 10^6$ st mL⁻¹ stanica trećeg dana uzgoja te je dio uzorka korišten za pripremu tri nova uzorka (slika 6). U dvije nove Falcon tube dodana je smjesa ukupnih hidrolizata proteina te predstavljaju uzorak 4 (HN-UK.C) i uzorak 5 (HN-UK*). U jednu Falcon tubu dodana je frakcija hidrolizata s proteinima molarne mase <10 kDa i predstavlja uzorak 6 (HN-F10*). Uzorak 1 i uzorak 4 uzgajani su dok vijabilnost stanica nije pala ispod 80 %, dok su svi ostali uzorci uzgajani dok nisu postigli željeni broj.



Slika 6. Prikaz pripreme uzorka 4, 5 i 6 (vlastita ilustracija izrađena uz pomoć programa BioRender.com)

Stanice su uzgajane na kružnoj tresilici (160 rpm) u inkubatoru, uz uvjete temperature 36,6 °C, atmosferskog tlaka i atmosferskog zraka (95 % zraka i 5 % CO₂). Tokom uzgoja svakodnevno je provjeravano je li došlo do kontaminacije kulture, brojane su žive i mrtve stanice, iz čega se računala njihova koncentracija i postotak vijabilnosti, te je na dane kada su uzorci precijepljivani na svježju hranjivu podlogu izuziman alikvot medija za analizu sadržaja glukoze. Jedanaestog dana uzgoja izuzeti su alikvoti medija iz svih uzoraka, radi mjerenja koncentracije glukoze kao i koncentracije imunoglobulina G.

3.2.2. Određivanje broja stanica i vijabilnosti kulture

Rast i vijabilnost svih uzoraka praćen je svakodnevno uz pomoć svjetlosnog mikroskopa, Neubaureove komorice i boje tripan-plavo. Metoda tripan plavo temelji se na razlici u integritetu membrana između mrtvih i živih stanica. Naime, zbog narušenog integriteta membrane mrtvih stanica, boja će difundirati u citosol i vezati se na intracelularne proteine pa će takve stanice pod mikroskopom biti plavo obojene, dok će žive stanice ostati neobojene. Iz svake epruvete za uzgoj je svakodnevno u sterilnoj komori izuziman alikvot uzorka, te je prenesen u Eppendorf epruvetu.

Ovisno o procjeni, uzorak je potom razrijeđen ili je izravno služio za miješanje s tripan-plavom bojom i određivanje broja stanica. 10 μ L suspenzije stanica je pomiješano s 10 μ L boje nakon čega je 10 μ L tako pripremljenog uzorka uz pomoć automatske pipete nanoseno na Neubaurovu komoricu. Žive i mrtva stanice se pod svjetlosnim mikroskopom broje u 4 velika kvadrata smještena u kutovima komorice i podijeljena na 26 manjih kvadrata.



Slika 7. Neubaurova komorica (Anonymous 1)

Stanice su prebrojane u 4 velika kvadrata unutar mreže komorice te je koncentracija živih stanica u uzorku izračunata prema sljedećoj formuli [1]:

$$\frac{\text{broj stanica}}{\text{mL uzorka}} = \text{uk. zbroj stanica u 4 kvadrata} \times 5 \times 10^3 \times \text{broj razrjeđenja} \quad [1]$$

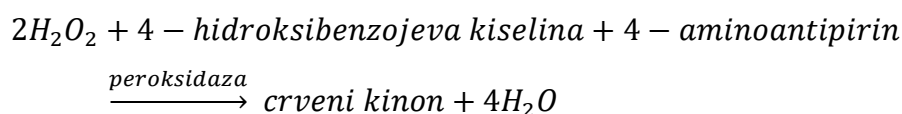
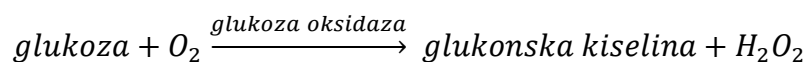
Vijabilnost stanica računa se prema sljedećoj formuli:

$$\text{vijabilnost}[\%] = \frac{\text{broj živih stanica mL}^{-1}}{\text{ukupan broj stanica mL}^{-1}} \times 100 \quad [2]$$

3.2.3. Određivanje koncentracije glukoze u uzorcima

Nakon izuzimanja po 20 μL uzorka za brojanje stanica u dvije paralele, preostali dio svakog uzorka centrifugiran je 5 minuta pri 3000 rpm, kako bi se uklonile stanice. Nakon toga supernatant uzorka je pažljivo premješten u drugu Eppendorf epruvetu, te je kao takav služio za daljnje određivanje glukoze. Do trenutka određivanja supernatanti su čuvani u zamrzivaču pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$, a prije samog određivanja, ostavljeni su na sobnoj temperaturi da se otope.

Za određivanje *in vitro* koncentracije glukoze u mediju korišten je komercijalni test GOPOD proizvođača MEGAZYME koji se bazira na kolorimetrijsko-enzimskoj PAP metodi. Prema ovoj metodi, oksidacijom D-glukoze iz uzorka pomoću enzima glukoza-oksidadaze (GOD) nastaje D-glukonat i vodikov peroksid. Potom se vodikov peroksid uz pomoć enzima peroksidaze (POD), u reakciji s kloro-4-fenolom i 4-aminoantipirinom (PAP) prevodi u crveno obojeni produkt. Apsorbancija navedenog produkta mjeri se pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 510 nm, a proporcionalna je koncentraciji glukoze u ispitivanim uzorcima.



Uzorci su pripremljeni na način da je otpipetirano 3mL GOPOD reagensa te zatim 0,1 mL uzorka, odnosno Glucose-GOD-PAP standardne otopine poznate koncentracije ($c = 5,55\text{ mmol L}^{-1}$), nakon čega je dobivena otopina resuspendirana. Za slijepu probu je umjesto uzorka dodano 0,1 mL destilirane vode. Svaki uzorak, kao i standard i slijepa proba, određivan je u dvije paralele. Nakon resuspendiranja, otopina je inkubirana pri $37\text{ }^\circ\text{C}$ kroz 10 minuta te je potom na spektrofotometru mjerena apsorbancija i prema sljedećoj formuli [3] je izračunata koncentracija glukoze u uzorku (MEGAZYME):

$$D - \text{glukoza} \left(\frac{\mu\text{g}}{0,1\text{mL}} \right) = \frac{\Delta A_{\text{uzorak}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times 100$$

[3]

3.2.4. Određivanje koncentracije monoklonskog protutijela IgG

Koncentracija monoklonskog protutijela IgG određivana je pomoću uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC; engl. *High Performance Liquid Chromatography*). Molekule protutijela su razdvojene od hranjivog medija prema principu afinitetne kromatografije. Naime, na koloni je imobiliziran ligand Protein A koji može reverzibilno vezati proteine. Imunoglobulin se preko Fc regije veže na jednu od pet imunoglobulin-vezujućih domena liganda. Upravo to povezivanje omogućuje razdvajanje monoklonskog protutijela. Uzorci supernatanta su prije stavljanja na kolonu filtrirani uz pomoć filtera pora 0,2 μm kako bi se uklonili stanični ostaci. Nakon filtracije izuzeto je 50 μL uzorka te je isti injektiran na kolonu pri protoku od 2,5 mL min^{-1} i temperaturi 25 $^{\circ}\text{C}$. Za analizu jednog uzorka potrebno je 4,2 minute kao što je prikazano u tablici 2. Razdvajanje je započelo vezanjem molekula protutijela iz uzorka na kolonu - stacionarna faza. Stacionarnu fazu predstavlja Protein A kolona. Kao mobilne faze korišteni su 50 mM natrij-fosfatni pufer pH 7,4 za vezanje i glicinski pufer pH 2,5 za eluciju. Do elucije dolazi dodatkom limunske kiseline koje uzrokuje promjenu pH vrijednosti mobilne faze. Uslijed promjene pH dolazi do prekida interakcija između liganda i protutijela. Eluirano protutijelo detektirano je pomoću UV/VIS detektora HPLC uređaja pri valnoj duljini od 280 nm. Pikovi kromatograma su analizirani te je kvantifikacija provedena pomoću jednadžbe pravca baždarnog dijagrama.

Tablica 2. Parametri razdvajanja protutijela IgG pomoću Protein A kolone djelovanjem mobilnih faza A (pufer za vezanje) i B (pufer za eluciju)

Vrijeme (min)	A(%)	B(%)	Protok (mLmin^{-1})
0,0	100	0	1,0
0,5	100	0	1,0
0,6	0	100	1,0
2,0	0	100	1,0
2,1	100	0	1,0
4,2	100	0	1,0

3.2.5. Određivanje procesnih parametara rasta CHO DP-12 stanične linije

Najveća specifična brzina rasta stanica (μ_{max}):

Najveća specifična brzina rasta u eksponencijalnoj fazi rasta šaržnog uzgoja računa se prema jednadžbi:

$$\mu_{max} = \frac{1}{N} \frac{dN}{dT} \quad [4]$$

gdje je:

dN = povećanje broja stanica

dt = vremenski interval

N = broj stanica

Integracijom gornje jednadžbe dobiva se izraz za jednadžbu pravca, koji se dobije tako da se tijekom uzgoja određuje broj stanica u kulturi u ovisnosti o vremenu:

$$\ln(N) = \ln N_0 + \mu(t - t_0) \quad [5]$$

Nagib pravca, tj. koeficijent smjera predstavlja najveću specifičnu brzinu rasta stanica:

$$\mu_{max} = \frac{\ln(N) - \ln(N_0)}{\Delta t} \quad [6]$$

gdje je:

N = broj stanica u volumenu 1 mL na kraju eksponencijalne faze rasta

N_0 = broj stanica u volumenu 1 mL na početku eksponencijalne faze rasta

Δt = trajanje eksponencijalne faze rasta (dan)

Volumetrijska produktivnost (V_p) :

$$V_p = \frac{c}{t}$$

[7]

gdje je:

c = koncentracija protutijela IgG (mg L^{-1})

t = vrijeme trajanja uzgoja (dan)

Specifična produktivnost (Q_p):

$$Q_p = \frac{c}{\Delta t \times \Delta N}$$

[8]

gdje je:

c = koncentracija protutijela IgG (mg L^{-1})

Δt = vremenski interval trajanja eksponencijalne faze (dan)

ΔN = broj stanica na kraju i na početku eksponencijalne faze (stanica mL^{-1})

Relativna volumetrijska/specifična produktivnost :

$$IgG(\%) = \frac{V_p \text{ odnosno } Q_p(\text{uzorak})}{V_p \text{ odnosno } Q_p(\text{Kontrola})}$$

[9]

3.2.6. Obrada podataka

Rezultati mjerenja prikazani su kao srednje vrijednosti (\tilde{x}) uzoraka u skupini:

$$\tilde{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

[10]

s pripadajućim standardnim devijacijama (s):

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \tilde{x})^2}$$

[11]

gdje n predstavlja ukupan broj uzoraka u skupini, a x_i pojedinačnu vrijednost uzorka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Monoklonska protutijela su uz cjepiva jedan od najčešćih proizvoda biotehnoške industrije koji se proizvode procesom kulture životinjskih stanica. Kod proizvodnje ovih proizvoda, kao ekspresijski sustav se najčešće koristi CHO stanična linija (Zhu i sur., 2017). Iznimno je bitno osigurati optimalne uvjete stanica kako bi vijabilnost i produktivnost bili na najvišoj razini. Najvažniju ulogu u tome ima formulacija hranjivog medija koji se koristi za uzgoj. Životinjski serum je do nedavno bio jedan od ključnih dodataka mediju za uzgoj stanica. Iako korištenje seruma ima mnogih prednosti, nedostaci su presudili u korist potrage za alternativama. Naime, osim što je skup, pri korištenju istog postoji rizik od kontaminacije. Također, serum ima nedefinirani sastav, visoki udio proteina što otežava *downstream* operacije, te često postoje nezanemarive razlike u kvaliteti od šarže do šarže. Zbog toga su se kao alternative počele koristiti prerađevine biljnog podrijetla, posebice nusproizvodi kod ekstrakcije ulja iz sjemenki biljka uljarica. Primjer nusproizvoda su uljne pogače i brašno koje sadrže visoke koncentracije proteina. Korištenje proteinskih biljnih hidrolizata osim što je znatno jeftinije, pridonosi trendu održive proizvodnje jer se korištenjem „otpadnih nusproizvoda“ iz industrije smanjuju troškovi oba procesa. Upravo zbog tih razloga, kroz godine su provedena mnoga istraživanja o učincima dodatka biljnih proteinskih hidrolizata u hranjivi medij, uključujući hidrolizate iz uljane repice, pamuka, pšenice, suncokreta, soje i drugih uljarica. Korištenje hidrolizata navedenih biljaka pokazalo je pozitivan utjecaj na produktivnost i rast CHO stanične linije (Logarušić i sur., 2021; Chabanon i sur., 2008; Farges-Haddani i sur., 2006), pa je posljedično odabrana konoplja tj. ukupni hidrolizati proteina konoplje i frakcije hidrolizata proteina molarne mase < 10 kDa.

U ovom radu cilj je bio ispitati učinak proteinskih hidrolizata konoplje na rast, vijabilnost i produktivnost CHO DP-12 stanica uzgajanih u suspenziji u hranjivom mediju bez seruma. Također je cilj bio ispitati ima li početna prilagodba stanica na navedene hidrolizate utjecaj na rast i produktivnost u sljedećoj pasaži. Rast stanica svakodnevno je praćen brojanjem stanica pod svjetlosnim mikroskopom u Neubauerovoj komorici, a vijabilnost stanica određivana je metodom tripan-plavo. Osim rasta i vijabilnosti stanica, tokom uzgoja stanica praćene su i promjene koncentracije glukoze u mediju u kojem su stanice rasle uporabom komercijalnog enzimskog kit-a. U konačnici je pomoću Protein A kolone HPLC metodom određivana koncentracija proizvedenog imunoglobulina G u uzorcima hranjivog medija, kako bi se stekao uvid u to kako korišteni biljni hidrolizati utječu na produktivnost CHO stanica. Svi dobiveni

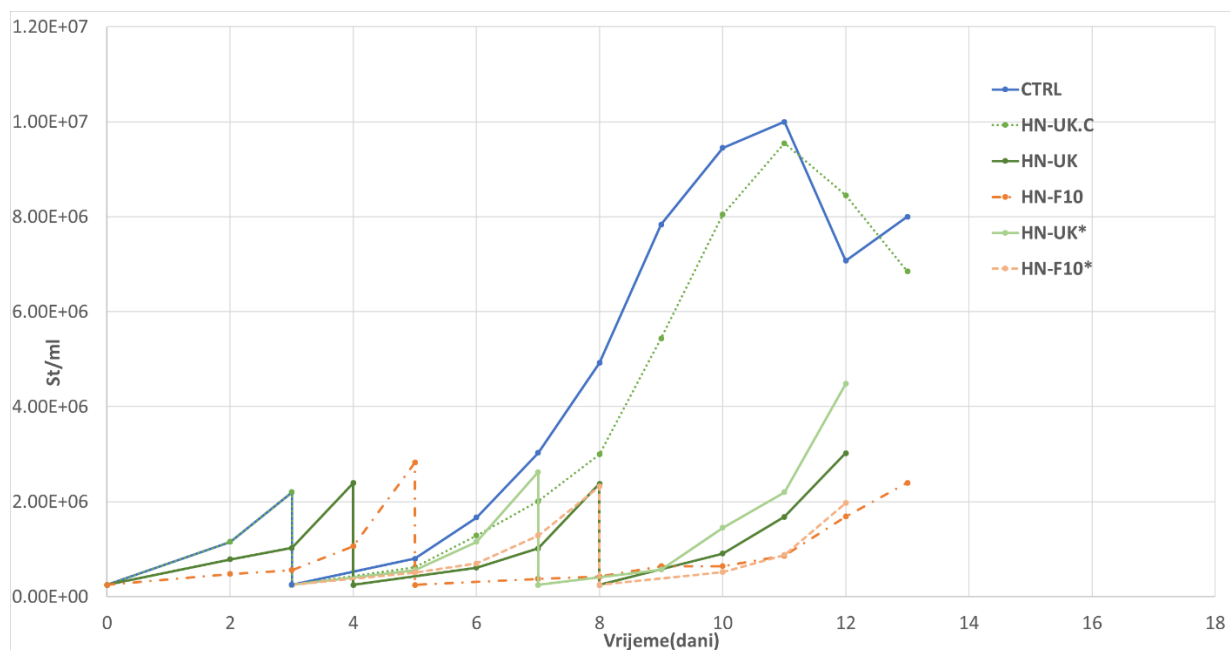
rezultati praćenih parametara i njihove međusobne usporedbe, kao i usporedbe s kontrolnim uzorkom, u sljedećim su potpoglavljima grafički prikazani te raspravljani.

4.1. UTJECAJ PROTEINSKIH HIDROLIZATA KONOPLJE NA RAST CHO DP-12 STANIČNE LINIJE

Hidrolizati proteina konoplje i odgovarajuća peptidna frakcija, pripremljeni su u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stranica i biotransformacije Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu iz brašna uljne pogače. Pripremljeni su uporabom komercijalnog mikrobnog proteolitičkog enzima NeutrasedTM, pri čemu su uvjeti hidrolize prethodno optimirani. Ovaj diplomski rad dio je projekta Hrvatske zaklade za znanost „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj“.

Učinak korištenih hidrolizata na rast i vijabilnost ispitan je na način da je proveden suspenzijski uzgoj CHO DP-12 stanica u hranjivom mediju bez dodanog seruma. Stanice su uzgajane tijekom 12 dana (odnosno 13 za CTRL, HN-UK.C i HN-F10) u 6 različitih Falcon tuba. Trećeg dana uzgoja, iz uzorka CTRL izuzeti su alikvoti te su pripremljena nova tri uzorka (HN-UK*, HN-F10* i HN-UK.C). Jedina razlika između HN-UK* i HN-UK.C je što je uzorak HN-UK* pasażiran kada je dosegao određen broj stanica, dok je uzorak HN-UK.C zajedno s kontrolom uzgajan dok vijabilnost nije pala ispod 80%. Dinamika rasta prikazana je pomoću krivulje rasta (slika 8), koja prikazuje ovisnost koncentracije živih CHO DP-12 stanica o vremenu trajanja uzgoja, odnosno djelovanje frakcija hidrolizata proteina konoplje na rast CHO DP-12 stanica.

Iz grafa je vidljivo kako su uzorci sa stanicama u koje su na početku uzgoja dodani hidrolizati (HN-UK i HN-F10) „kasnili“ za uzorkom kontrole (CTRL). Naime, uzorku HN-UK bilo je potrebno 4 dana da dostigne željenu koncentraciju stanica dok je uzorku HN-F10 bilo potrebno 5 dana da dostigne isto. Za razliku od uzoraka s dodanim hidrolizatima, stanicama u uzorku kontrole (CTRL) bilo je dovoljno 3 dana da dostignu željenu koncentraciju. Navedeni rezultati upućuju na to da smjesa ukupnih hidrolizata proteina kao i frakcija hidrolizata konoplje s proteinima molarne mase < 10 kDa djeluju inhibitorno na rast CHO DP -12 stanica.



Slika 8. Ovisnost koncentracije živih CHO DP-12 stanica o vremenu trajanja uzgoja

Nakon precijepljivanja uzoraka u svježu hranjivu podlogu ponovno je praćeno vrijeme potrebno da stanice dosegnu zadanu koncentraciju i vidljivo je iz grafa da je uzorku HN-UK trebalo 4, dok HN-F10 čak 8 dana da dostignu željeni rezultat. Navedeno upućuje da „pomoć“ u vidu početnog uzgoja stanica s hidrolizatima nije utjecala na stanice u uzorku s ukupnim hidrolizatima, dok je u slučaju uzorka s frakcijom hidrolizata <10 kDa imala suprotni (negativni) učinak s obzirom da je odužila vrijeme potrebno da stanice dosegnu željenu koncentraciju. Dakle, početni uzgoj s ciljem prilagodbe stanica na hidrolizate nije dao pozitivan rezultat. Stanice u uzorku HN-F10* rasle su 5 dana da dostignu željenu koncentraciju (jednako kao i stanice u koje je u početku uzgoja dodan isti hidrolizat), no nakon drugog precijepljivanja stanicama je trebalo samo 4 dana da dostignu isto (za razliku od HN-F10). Također jedanaestog dana uzgoja, koncentracija stanica u oba uzorka bila je približno jednaka iako je uzorak HN-F10* precijepljen tri dana nakon uzorka HN-F10. Stanice u uzorku HN-UK* su za željenu koncentraciju uzgajane 4 dana, pa im je nakon 2 precijepljivanja uzgoj trajao 5 dana. Krivulja rasta uzorka HN-UK.C može se direktno usporediti s krivuljom rasta kontrole CTRL te se jasno na grafu vidi kako stanice u koje je dodan hidrolizat zaostaju za stanicama u kontrolnom uzorku. Ovakvo zapažanje samo potvrđuje prethodno postavljeni zaključak, a to je da dodatak hidrolizata bilo (u ovom slučaju) ukupnih ili u vidu frakcije hidrolizata proteina molarne mase <10 kDa djeluje inhibitorno na rast CHO-DP12 stanične linije. Nagli pad u koncentraciji stanica

u uzorku kontrole dvanaestog dana je najvjerojatnije rezultat pogreške u izuzimanju uzoraka ili brojanju samih stanica.

Tablica 3. Vrijednosti najvećih specifičnih brzina rasta (μ_{\max}) CHO DP-12 stanica u uzorcima

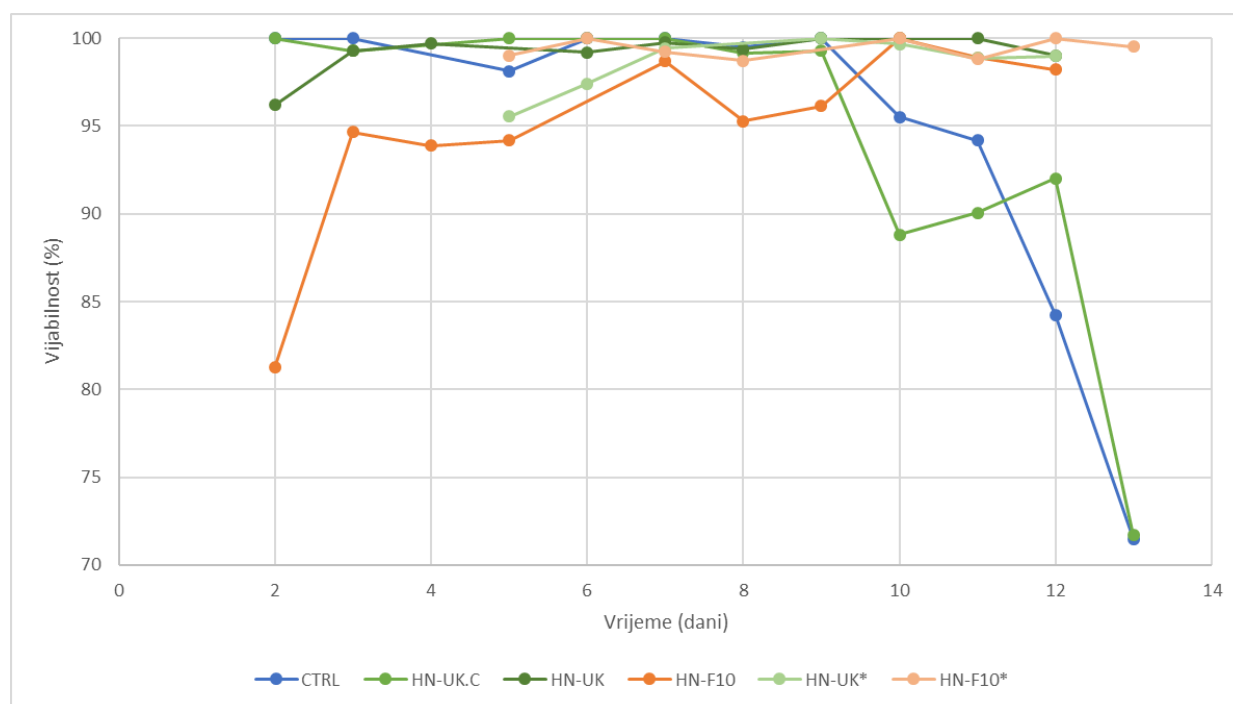
Uzorak	$\mu_{\max}(\text{dan}^{-1})$
CTRL	0,574
HN-UK.C	0,513
HN-UK	0,623
HN-F10	0,273
HN-UK*	0,578
HN-F10*	0,518

Promatrajući eksponencijalnu fazu rasta za svaki uzorak, iz tablice 3 vidljivo je da uzorak HN-UK* ima maksimalnu specifičnu brzinu rasta najbližnju kontroli. Uzorci HN-UK.C i HN-F10 pokazuju nešto nižu vrijednost, dok uzorak HN-UK pokazuje najveću specifičnu brzinu rasta ($0,623 \text{ dan}^{-1}$). Stanice u mediju s dodatkom ukupnog hidrolizata (HN-UK) su nakon precijepljivanja najkraće vremena provele u eksponencijalnoj fazi (3 dana), te je zbog toga vrijednost maksimalne specifične brzine rasta najveća u usporedbi s ostalim uzorcima. Treba napomenuti da ovaj rezultat nije posve realan jer stanice nisu dostigle stacionarnu fazu u trenutku izuzimanja uzorka.

Uzorak HN-F10 znatno negativno odskaje po maksimalnoj specifičnoj brzini rasta od kontrole i ostalih uzoraka, budući da je u ovom uzorku izmjerena maksimalna specifična brzina rasta od $0,273 \text{ dan}^{-1}$. Upravo je stanicama u ovom uzorku trebalo najviše vremena da dostignu željenu koncentraciju, što znači da navedena frakcija hidrolizata konoplje usporava rast stanica te odgađa početak eksponencijalne faze. Najrealnija usporedba maksimalnih specifičnih brzina rasta je upravo između uzoraka CTRL i HN-UK.C budući da su oba uzorka uzgajana na isti način. Iz rezultata je vidljivo kako je maksimalna specifična brzina rasta stanica u uzorku s dodanim hidrolizatima manja od maksimalne specifične brzine rasta stanica u uzorku kontrole što potvrđuje tezu da dodatak hidrolizata u hranjivi medij usporava rast stanica.

4.2. UTJECAJ PROTEINSKIH HIDROLIZATA KONOPLJE NA VIJABILNOST CHO DP-12 STANIČNE LINIJE

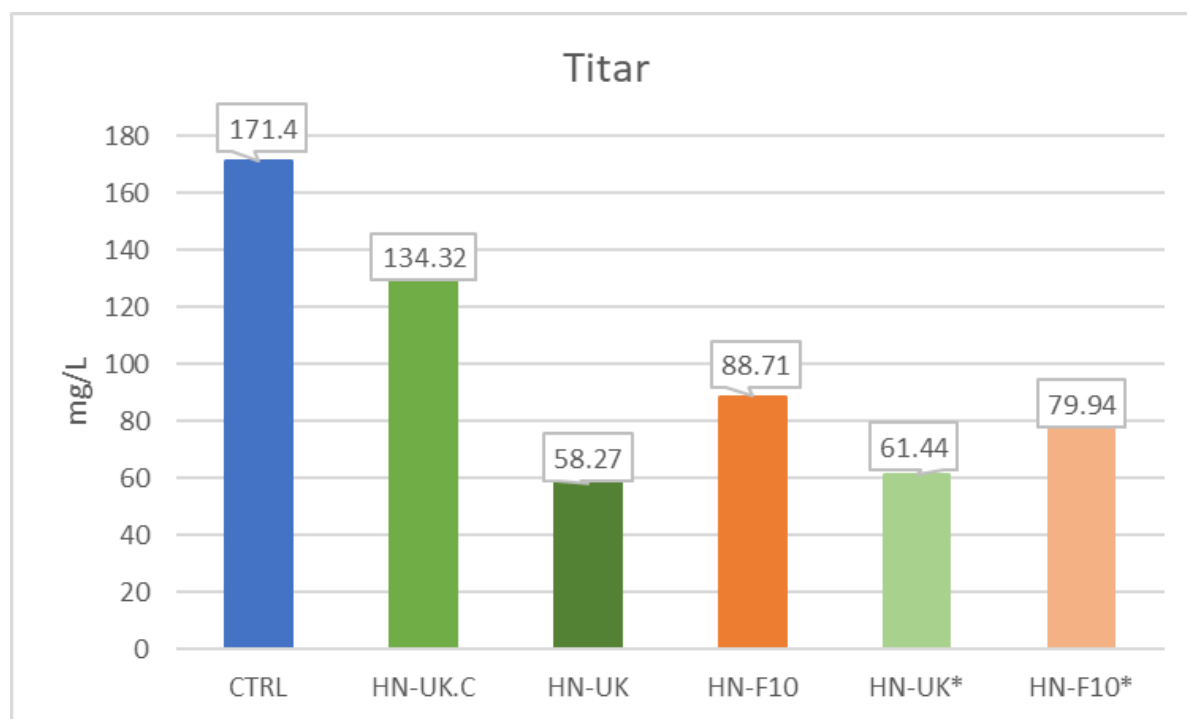
Prema krivulji koja prikazuje vijabilnost stanica tokom uzgoja (slika 9) može se primijetiti da jedino uzorak HN-F10 odstupa od ostalih uzoraka. Stanice u koje je u startu dodana frakcija hidrolizata konoplje s proteinima molarne mase < 10 kDa u početku su pokazivale nešto nižu vijabilnost (oko 80 %), što znači da je dodatak hidrolizata ipak uzrokovao smrt nešto značajnijeg broja stanica. Nakon početne prilagodbe stanica vrijednosti vijabilnosti su bile u višem rasponu (93-98 %). Kontrolnom uzorku (CTRL) i uzorku s ukupnim hidrolizatima proteina konoplje (HNK-UK.C) vijabilnost kreće opadati devetog dana uzgoja, te nastavlja u istom trendu do trinaestog dana uzgoja kada je vijabilnost pala ispod 75 % pa je i uzgoj stanica završen. Bitno je napomenuti kako su navedeni uzorci precijepljivani samo jednom, te su nakon precijepljivanja uzgajani dok im vijabilnost nije pala ispod 80 %. S druge strane, ostali uzorci uzgajani su do željene koncentracije stanica pa su zbog toga na grafu vrijednosti vijabilnosti između 95 i 100 %.



Slika 9. Vijabilnost stanica CHO DP-12 tijekom uzgoja

4.3. UTJECAJ PROTEINSKIH HIDROLIZATA KONOPLJE NA PRODUKTIVNOST CHO DP-12 STANIČNE LINIJE

U ovom diplomskom radu korištena je CHO DP-12 stanična linija, koja proizvodi rekombinantno humano monoklonsko protutijelo anti-IL-8, izotip IgG1. Produktivnost korištene stanične linije u kontroli te uzorcima u koje su dodani hidrolizati proteina konoplje određena je mjerenjem koncentracije navedenog protutijela 11. dana uzgoja. Dobiveni rezultati prikazani su grafičkim prikazima ukupnog titra IgG-a (slika 10) te relativne volumetrijske (slika 11) i relativne specifične produktivnosti (slika 12), pri čemu relativne vrijednosti pokazuju produktivnosti u uzorcima koji sadrže hidrolizate u odnosu na kontrolni uzorak, koji ne sadrži.

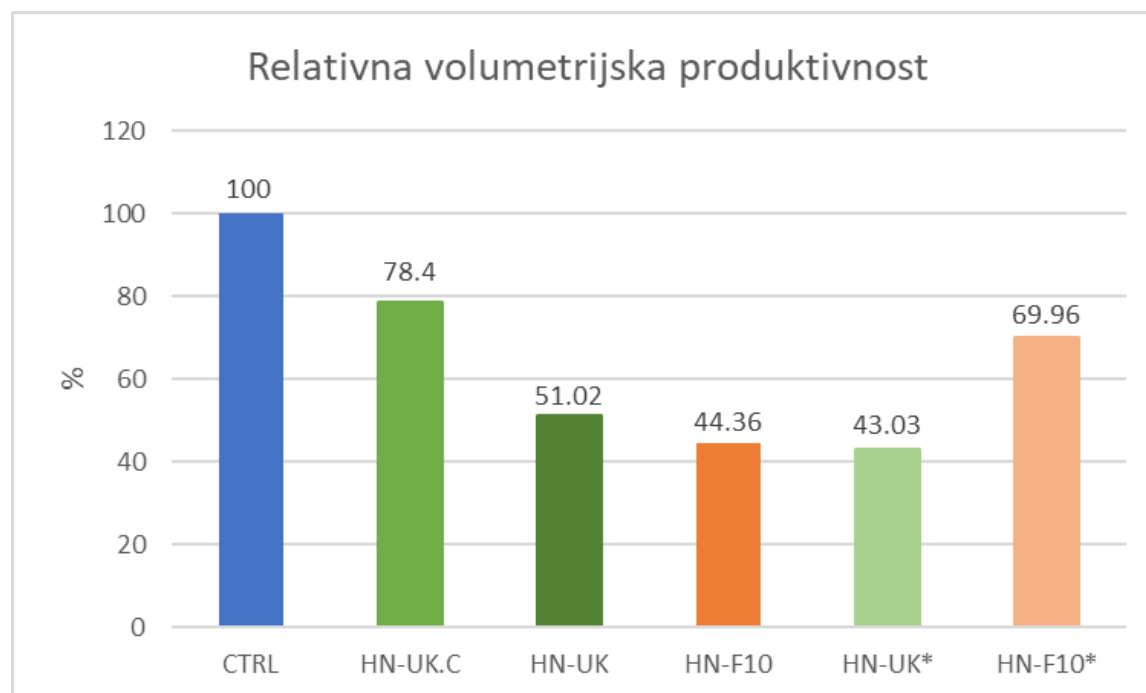


Slika 10. Grafički prikaz koncentracije protutijela IgG (ukupni titar)

Prema slici 10 vidljivo je da je najveća koncentracija ($171,4 \text{ mg L}^{-1}$) protutijela IgG jedanaestog dana uzgoja izmjerena u kontrolnom uzorku (CTRL). S druge strane, najmanja koncentracija ($58,27 \text{ mg L}^{-1}$) izmjerena je u uzorku u koji su na početku uzgoja dodani ukupni hidrolizati proteina konoplje (HN-UK). Stanice u uzorku HN-UK precijepljene su najkasnije (8. dana) u svježju hranjivu podlogu, pa je njihova eksponencijalna faza najkraće trajala, što objašnjava navedeno odstupanje. Unatoč tome, vrijednost relativne specifične produktivnosti

veća je nego u kontroli jer su stanice u kraćem periodu uspjele proizvesti dovoljno protutijela. Nadalje, ako se promotri krivulja rasta (slika 8), primjećuje se razlog velikog odstupanja vrijednosti koncentracije protutijela u ostalim uzorcima. Naime, uzorci CTRL i HN-UK.C su precijepljeni trećeg dana uzgoja i zatim su stanice rasle, te su na kraju eksponencijalne faze (11. dan) izuzeti uzorci koji su se koristili za mjerenje koncentracije protutijela IgG1. S druge strane, stanice u ostalim uzorcima pasažirane su u svježi hranjivi medij kada bi dostigle željenu koncentraciju pa je zbog toga eksponencijalna faza kraće trajala, a posljedično su i koncentracije IgG-a manje. Stanice u uzorku HN-UK.C su nešto sporije rasle od stanica koje su se nalazile u kontrolnom uzorku pa je samim time i koncentracija protutijela manja. Oba uzorka u koje je dodana frakcija hidrolizata konoplje s proteinima molarne mase < 10 kDa (HN-F10, HN-F10*) pokazuju veći titar od uzoraka u koje su dodani ukupni hidrolizati proteina, iako su navedeni slabije rasli od ostalih uzoraka. Zaključuje se da dodatak frakcije hidrolizata konoplje s proteinima molarne mase <10 kDa pozitivnije utječe na produktivnost stanične linije od ukupnih hidrolizata, iako su stanice u tim uzorcima rasle sporije od kontrole i ostalih uzoraka.

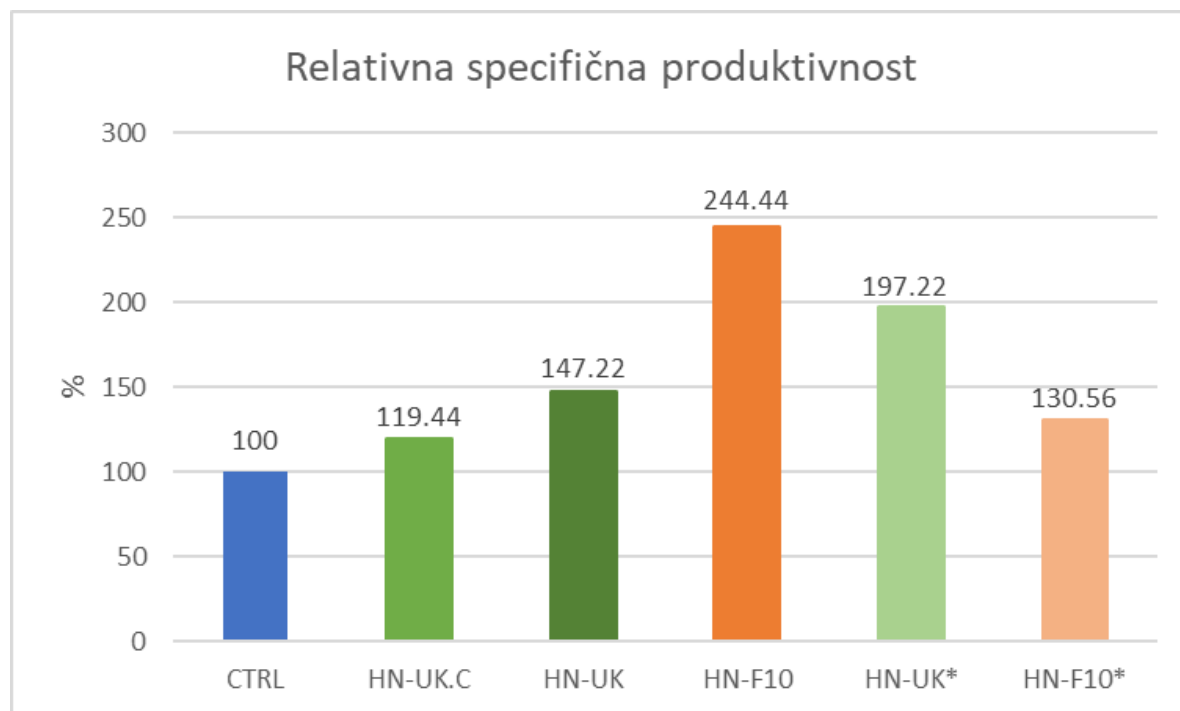
Volumetrijska produktivnost prikaz je produktivnosti uzgajanih CHO DP-12 stanica po danu uzgoja, a relativna volumetrijska produktivnost pokazuje postotak volumetrijske produktivnosti svakog pojedinog uzorka u odnosu na volumetrijsku produktivnost kontrole.



Slika 11. Grafički prikaz relativne volumetrijske produktivnosti

Iz grafičkog prikaza može se primijetiti da svi uzorci imaju manje vrijednosti relativne volumetrijske produktivnosti od kontrole. Izuzme li se kontrola, najveću relativnu volumetrijsku produktivnost ima uzorak HN-UK.C (78,4 %), te zatim HN-F10*(69,96 %). Suprotno, uzorci HN-F10 i HN-UK* pokazuju najniže vrijednosti volumetrijske produktivnosti. Promotri li se slika 8, vidi se da su upravo ova dva uzorka uzgajana 6 odnosno 4 dana prije izuzimanja uzorka za mjerenje. Zbog toga, iako je u tim uzorcima izmjeren veći titar od svojih „konkurenata“ (HN-UK i HN-F10*), stanice su po danu proizvodile manju količinu protutijela. Stanice u uzorcima kontrole (CTRL) i HN-UK.C proizvele su značajnije veću količinu protutijela pa je u ovom slučaju iako je vrijeme uzgoja do trenutka mjerenja bilo čak 8 dana, volumetrijska produktivnost najveća.

Količina proizvoda u ovisnosti o broju stanica i trajanju proizvodne faze naziva se specifična produktivnost. Relativne vrijednosti specifične produktivnosti stanica u kulturama s dodanim hidrolizatima, u odnosu na kontrolu, prikazane su na slici 12.

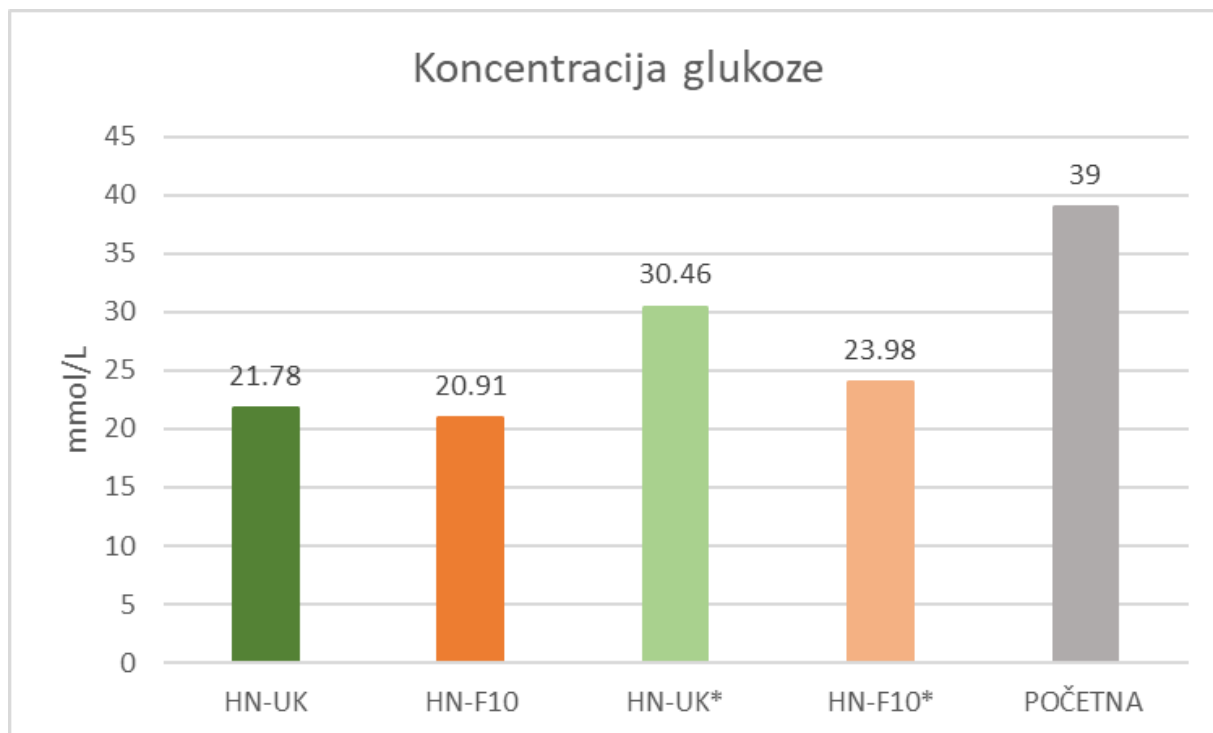


Slika 12. Grafički prikaz relativne specifične produktivnosti

U ovom eksperimentu podaci o specifičnoj produktivnosti potencijalno su i najvažniji upravo zbog toga što daju informaciju o prosječnoj proizvodnji IgG-a po stanici u nekom uzorku po danu, te u usporedbi s krivuljom rasta mogu se dobiti podaci o tome koji su hidrolizati proteina najbolje utjecali na produktivnost uzgajanih stanica.

Kod uzoraka u kojima su stanicama dodani ukupni i frakcionirani hidrolizati, vrijednosti relativne specifične produktivnosti (slika 12) su bile veće u odnosu na stanice u kontroli. Zanimljivo je kako je uzorak sa najvišom specifičnom produktivnošću (244,44 %), upravo HN-F10. Naime, navedeni uzorak je tijekom cijelog uzgoja slabije rastao od kontrole i svih ostalih uzoraka, te je tijekom cijelog uzgoja vijabilnost stanica bila niža od ostalih. Moguće je da se velika količina stanične energije trošila na proizvodnju protutijela, pa su stanice manje energije trošile na rast i udvostručavanje. Također je zanimljivo da su relativna volumetrijska produktivnost, kao i titar navedenog uzorka manji od kontrole. Zaključuje se da navedena frakcija hidrolizata konoplje negativno utječe na rast stanica, no pozitivno utječe na produktivnost istih. Naime navedeni podaci pokazuju da pojedina stanica po danu proizvede više protutijela, nego što je to slučaj s kontrolnim uzorkom. Također usporede li se uzorci u koje su dodani ukupni hidrolizati (HN-UK i HN-UK*) primjećuje se kako su stanice u uzorku u koji na početku uzgoja nije dodan hidrolizat proizvele više protutijela po danu od stanica koje su od početka uzgajane s dodatkom hidrolizata. Suprotno navedenom, kod stanica u uzorcima s frakcijama hidrolizata proteina <10 kDa, bolje rezultate su pokazale stanice koje su u prvoj pasaži rasle sa dodatkom hidrolizata. Navedeno upućuje na to da početna prilagodba stanica na hidrolizate u slučaju uzorka sa frakcijama hidrolizata proteina <10 kDa, iako nema pozitivan utjecaj na rast stanica, pozitivno utječe na produktivnost stanične linije.

Usporede li se količina glukoze u mediju 11. dana uzgoja može se primijetiti da je najmanja količina glukoze u uzorku HN-F10 ($20,91 \text{ mmol L}^{-1}$). Stanice u navedenom uzorku su najsporije rasle no istovremeno su proizvodile najveću količinu IgG-a po stanici po danu. Nadalje, praktično je usporediti uzorke HN-UK i HN-F10* koji su pasažirani istog (osmog) dana (slika 8). Iz krivulje rasta se može primijetiti da su stanice u uzorku HN-UK brže rasle od stanica u uzorku HN-F10*. Osim toga, vrijednosti relativne specifične produktivnosti (slika 12) navedenog uzorka veće su od relativne specifične produktivnosti uzorka u koji su dodane frakcije hidrolizata proteina molarne mase <10 kDa, pa je logično da su stanice u uzorku HN-UK potrošile veću količinu glukoze od stanica u uzorku HN-F10*. Najveću vrijednost pokazuje uzorak HN-UK* ($30,46 \text{ mmol L}^{-1}$).



Slika 13. Koncentracija glukoze u uzorcima 11. dana uzgoja

5. ZAKLJUČCI

1. Ukupni hidrolizati proteina konoplje kao i frakcija (<10 kDa) istih, dodani kao suplement u hranjivi medij u koncentraciji od 2 g L^{-1} djeluju inhibitorno na rast CHO DP-12 stanica.
2. Opisani postupak prilagodbe nije rezultirao bržim/boljim rastom stanica u mediju s dodanim hidrolizatima kao ni s njihovim frakcijama.
3. Stanična kultura CHO DP-12 suplementirana hidrolizatima proteina konoplje i frakcijama potvrdila je bolju specifičnu produktivnost u proizvodnji humanog protutijela imunoglobulina G (IgG), iako je konačni titar bio manji od kontrolnih, nesuplementiranih uzoraka.
4. Za uspješnu prilagodbu stanica potrebna su dodatna istraživanja, koja bi uključivala dugotrajnije i sustavnije suplementiranje stanica hidrolizatima proteina konoplje.

6. LITERATURA

Ahn WS, Antoniewicz MR (2012) Towards dynamic metabolic flux analysis in CHO cell cultures. *Biotechnol. J.* **7**, 61-74.

Anonymous 1 (2023) Neubauerova komorica, <https://inter-chem.pl/produkcenci/mariefeld-superior/produkt/komory-do-liczenia-komorek-jasne-linie> Pristupljeno 4. kolovoza 2023.

Arora M (2013) Cell Culture Media: A Review. *Mater Methods.* **3**, 175-204.

ATCC (2021) <https://www.atcc.org/products/crl-12445> Pristupljeno 17. srpnja 2023.

Babcock J, Wilcox C, Huttinga H (2010) Partial replacement of chemically defined media with plant-derived protein hydrolysates. *BioPharm.* **23**, 36-42.

Berljavac S (2019) Djelovanje proteinskog hidrolizata uljne pogače sjemenki lana na rast i produktivnost CHO DP-12 stanica (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Butler M (2013) Serum-free media: standardizing cell culture system. *Pharm Bioprocess* **1(4)**, 315-318. <http://dx.doi.org/10.4155/pbp.13.45>

Butler M, Hassell T, Doyle C, Gleave S, Jennings P (1991) The Effect of Metabolic Byproducts on Animal Cells in Culture. U: Spier RE, Griffiths JB, Meignier B, (ured.) Production of Biologicals from Animal Cells in Culture, Butterworth-Heinemann, Oxford, str. 226-228.

Cavrić M (2021) Učinak hidrolizata proteina uljne pogače sjemenki lana na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Chabanon G, Alves da Costa L, Farges B, Harscoat C, Chenu S, Georgen JL, Marc A, Marc I, Chevalot I (2008) Influence of the rapeseed protein hydrolysis process on CHO cell growth. *Bioresour. Technol.* **99**, 7143-7151.

Damjanović A (2021) Utjecaj hidrolizata proteina industrijske konoplje na rast, produktivnost i metabolizam CHO DP-12 stanične linije (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Dumont J, Ewart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R (2016) Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 1110-1122.

Đurđević P (2021) Učinak proteinskih hidrolizata konoplje i lana na rast, metabolizam i produktivnost CHO DP-12 stanične linije (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Farges-Haddani B, Tessier B, Chenu S, Chevalot I, Harscoat C, Marc I (2006) Peptide fractions of rapeseed hydolysates as an alternative to animal proteins in CHO cell culture media. *Process Biochem* **41(11)**, 2297-2304. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.06.002>

Farinon B, Molinari R, Costantini L, Merendino N (2020) The Seed of Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional Quality and Potential Functionality for Human Health and Nutrition. *Nutrients.* **12**, 1935

Fischer S, Handrick R, Otte K (2015) The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnol Adv* **33(8)**, 1878-1896. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.015>

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

Heidemann R, Zhang C, Qi H, Rule JL, Rozales C, Park S, Chuppa S, Ray M, Michaels J, Konstantinov K, Naveh D (2000) The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnology.* **32**, 157-167.

Jenkins N, Castro P, Menon S, Ison A, Bull A (1994) Effect of lipid supplements on the production and glycosylation of recombinant interferon-gamma expressed in CHO cells. *Cytotechnology.* **15**, 209-215

Kim JY, Kim Y, Lee GM (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 917- 930

Kornberg H (2023, June 29). Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/metabolism>. Pristupljeno 25. srpnja 2023.

Lai T, Yang Y, Ng S K (2013) Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production. *Pharmaceuticals*. **6**, 579-603.

Logarušić M (2023) Učinci obogaćivanja hranjivoga medija proteinskim hidrolizatima sjemenki lana i konoplje na rast i produktivnost biotehnoški značajnih životinjskih staničnih linija (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Logarušić M, Srček VG, Berljavac S, Pavunc AL, Radošević K, Slivac I (2021) Protein Hydrolysates from Flaxseed Oil Cake as a Media Supplement in CHO Cell Culture. *Resources*. **10**, 59.

Mulukutla BC, Khan S, Lange A, Hu WS (2010) Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways. *Trends Biotechnol*. **28**, 476-484.

Paić Tomašić A (2012) Svojstva kanabinoidnih receptora ljekovite biljke *Cannabis sativa*. *Med Vjesn*. **44(1-4)**, 147-162

Ritacco FV, Wu Y, Khetan A (2018) Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies. *Biotechnol Progr* **34(6)**, 1407-1426. <https://doi.org/10.1002/btpr.2706>

Segeritz CP, Vallier L. (2017) Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. **2017**, 151–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>.

Takagi M, Hia HC, Jang JH, Yoshida T (2001) Effects of high concentrations of energy sources and metabolites on suspension culture of Chinese hamster ovary cells producing tissue plasminogen activator. *J. Biosci. Bioeng*. **91**, 515-521.

Wurm FM (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. *Reprod. Med. Biol*. **16**, 99-117.

Zhu MM, Mollet M, Hubert RS, Kyung YS, Zhang GG (2017) Industrial Production of Therapeutic Proteins: Cell Lines, Cell Culture, and Purification. *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*. **1639-1669**. https://doi/10.1007/978-3-319-52287-6_29

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja LUCIJA ŠPOLJARIĆ izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis