

Učinak prihrane CHO DP-12 stanica peptidnim frakcijama hidrolizata industrijske konoplje na stanični rast i produktivnost

Ivković, Romana

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:968888>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023.

Romana Ivković

**UČINAK PRIHRANE CHO DP-12
STANICA PEPTIDNIM
FRAKCIJAMA HIDROLIZATA
INDUSTRIJSKE KONOPLJE NA
STANIČNI RAST I
PRODUKTIVNOST**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Zavoda za biokemijsko inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom 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 je vodila prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček, a financiran je od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ).



Zahvaljujem se svom mentoru prof. dr. sc. Igoru Slivcu na uloženom trudu i vremenu, prenesenom znanju i savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala dr. sc. Marijanu Logarušiću na prijateljskom pristupu i svojoj pomoći prilikom provedbe eksperimenta.

Hvala i svim ostalim zaposlenicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na pristupačnosti, savjetima i ugodnom radnom okruženju.

Hvala mojim kolegama i prijateljima na kontinuiranoj podršci, vrijednim savjetima i prijateljstvu.

Od srca hvala mojoj obitelji, a posebno roditeljima, što su me čitavo vrijeme bezuvjetno podržavali, bodrili i omogućili mi bezbrižno studiranje.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

UČINAK PRIHRANE CHO DP-12 STANICA PEPTIDNIM FRAKCIJAMA HIDROLIZATA INDUSTRIJSKE KONOPLJE NA STANIČNI RAST I PRODUKTIVNOST

Romana Ivković, univ. bacc. ing. biotechn. 0058209265

Sažetak: Životinjski serum standardna je dopuna medija za uzgoj životinjskih stanica, no zbog brojnih ograničenja posljednjih se nekoliko desetljeća biljni proteinski hidrolizati istražuju kao njemu odgovarajuća zamjena. Ovim je radom istražen učinak prihrane peptidnim frakcijama proteinskih hidrolizata konoplje na rast i produktivnost CHO-DP 12 stanica, proizvođača monoklonskog protutijela IgG. U ovom radu stanice su prihranjivane u kasnijoj fazi šaržnog uzgoja peptidnim frakcijama hidrolizata veličine <10 kDa u koncentraciji od 2 g L⁻¹ dobivenih pomoću enzima Neutraza i Protamex. Ustanovljeno je da peptidna frakcija dobivena enzimom Neutraza inhibira rast stanica bilo da se dodaje kulturi za šaržni uzgoj ili kao prihrana, dok peptidna frakcija dobivena enzimom Protamex inhibira stanični rast u uvjetima šaržnog uzgoja, a kao prihrana nema nikakav ili ima pozitivan učinak na rast. Stanice uzgajane uz dodatak proteinskih hidrolizata pokazale su manju produktivnost od onih u kontrolnim uvjetima. Vrijeme prihrane utječe na jačinu opaženih učinaka na rast i produktivnost.

Ključne riječi: CHO DP-12 stanična linija, proteinski hidrolizati, konoplja, šaržni uzgoj s prihranom, protutijelo IgG

Rad sadrži: 48 stranica, 8 slika, 4 tablice, 52 literaturna navoda

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 (članica)
4. doc. dr. sc. Teuta Murati (zamjenska članica)

Datum obrane: 14. srpnja 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 Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

THE IMPACT OF HEMPSEED PROTEIN HYDROLISATE FEED ON GROWTH AND PRODUCTIVITY OF CHO DP-12 CELL LINE

Romana Ivković, univ. bacc. ing. biotechn. 0058209265

Abstract: Animal serum is a common supplement in cell culture media, but due to various limitations, scientists are focused on finding suitable alternatives. Plant protein hydrolysates have recently been studied for this purpose. This study investigated the impact of hempseed protein hydrolysate feed on growth and productivity of CHO DP-12 cells. During batch cultivation, cells were fed with peptide fractions of <10 kDa at a concentration of 2 g L⁻¹, obtained using the enzymes Neutrase and Protamex. It was found that peptide fraction obtained using Neutrase inhibited cell growth, in both batch and fed-batch mode, while peptide fraction obtained using Protamex inhibited cell growth in batch culture conditions but had either no effect or a positive effect as a feed. Cells cultured with the addition of protein hydrolysates showed lower productivity compared to the control conditions. The timing of supplementation influenced the magnitude of the observed effects on growth and productivity.

Keywords: CHO DP-12 cell line, protein hydrolysates, hempseed, fed-batch, antibody IgG

Thesis contains: 48 pages, 8 figures, 4 tables, 52 references

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, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: July 14th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA	3
2.1.1. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica	4
2.1.2. Faze rasta životinjskih stanica.....	5
2.1.3. Metabolizam životinjskih stanica.....	6
2.1.4. CHO stanična linija	7
2.2. HRANJIVI MEDIJ ZA UZGOJ STANICA	8
2.2.1. Serum.....	9
2.2.2. Biljni hidrolizati proteina kao dodatak mediju bez seruma	11
2.2.3. Konoplja (<i>Cannabis sativa</i> L.).....	12
2.2.4. Valproična kiselina u kulturi životinjskih stanica.....	12
2.3. VRSTE UZGOJA ŽIVOTINJSKIH STANICA	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.1.1. Hidrolizat uljne pogače konoplje	17
3.1.2. Kemikalije.....	18
3.1.3. Otopine i puferi	18
3.1.4. Uređaji i oprema.....	20
3.1.5. Stanična linija CHO DP-12.....	21
3.2. METODE RADA	21
3.2.1. Uzgoj CHO DP-12 stanica u suspenzijskoj kulturi s dodatkom proteina konoplje i prihranom supstrata.....	21
3.2.2. Određivanje broja stanica i vijabilnosti kulture metodom tripan-plavo.....	22
3.2.3. Određivanje koncentracije glukoze u uzorcima hranjivog medija.....	23
3.2.5. Određivanje koncentracije amonijaka u uzorcima hranjivog medija.....	24
3.2.6. Određivanje koncentracije monoklonskog protutijela IgG.....	25
3.2.7. Izračun procesnih parametara rasta CHO DP-12 stanične linije.....	26
3.2.8. Statistička obrada podataka	28
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	29
4.1. UTJECAJ PROTEINSKIH HIDROLIZATA KONOPLJE NA RAST I VIJABILNOST CHO DP-12 STANIČNE LINIJE.....	30
4.2. UTJECAJ PROTEINSKIH HIDROLIZATA KONOPLJE NA METABOLIZAM CHO DP-12 STANIČNE LINIJE	36

4.3. UTJECAJ PROTEINSKIH HIDROLIZATA KONOPLJE NA PRODUKTIVNOST CHO DP-12 STANIČNE LINIJE	39
5. ZAKLJUČCI.....	42
6. LITERATURA	43

1. UVOD

Kulture životinjskih stanica imaju ključnu ulogu u biotehnologiji i farmaceutskoj industriji. Uzgoj životinjskih stanica omogućuje proizvodnju raznih bioloških spojeva koji su od vitalnog značaja za medicinska istraživanja, proizvodnju terapeutika i visoko specifičnih proizvoda poput hormona, monoklonskih protutijela, cjepiva i drugih biotehnoloških proizvoda. Sve veći zahtjevi za ovim važnim spojevima, traže razvoj naprednih tehnika uzgoja životinjskih stanica kako bi se osigurala visoka produktivnost i kvaliteta proizvoda. U tom kontekstu, posebno se istaknula primjena stanica jajnika kineskog hrčka (engl. *Chinese Hamster Ovary, CHO*) u proizvodnji terapeutskih proteina. CHO stanice imaju sposobnost adaptacije na suspenzijski uzgoj, što omogućuje skalabilnost proizvodnje, te pokazuju visoku stabilnost genetskih svojstava i mogućnost postizanja visokih prinosa proteina.

Jedan od ključnih čimbenika u uzgoju životinjskih stanica je hranjivi medij koji pruža potrebne nutrijente za rast i preživljavanje stanica. Tradicionalno, životinjski serum je bio važna komponenta hranjivog medija, jer je bogat proteinima, aminokiselinama, lipidima, vitaminima, hormonima i faktorima rasta koji potiču proliferaciju i rast stanica. Međutim, korištenje životinjskog seruma ima nedostatke kao što su varijabilnost sastava, potencijalne kontaminacije i otežano pročišćavanje proizvoda. Stoga se sve više istražuje upotreba alternativa za životinjski serum.

Jedna od potencijalnih zamjena za životinjski serum su biljni proteinski hidrolizati dobiveni razgradnjom biljnih proteina enzimima. U dosadašnjim istraživanjima, koja su se fokusirala na hidrolizate soje, pšenice, uljane repice i pamuka, pokazan je potencijal biljnih hidrolizata za poboljšanje rasta i produktivnosti životinjskih stanica. Optimizacija hranjivog medija pomoću biljnih proteinskih hidrolizata može rezultirati povećanjem prinosa proizvoda visoke vrijednosti, smanjenjem troškova proizvodnje, posebno u *downstream* procesima, te olakšati pročišćavanje i poboljšati kvalitetu proizvoda.

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa*) je biljka koja se, zbog svoje raznolike primjene, sve više istražuje u različitim industrijama. Naime, industrijska konoplja ima visok udio proteina u svojim sjemenkama koji služe kao izvor različitih aminokiselina, minerala, vitamina i drugih hranjivih tvari potrebnih za rast i razvoj stanica. Hidrolizati proteina industrijske konoplje mogu se dobiti djelovanjem raznih proteolitičkih enzima na izolat proteina iz sjemenki biljke. Korištenje hidrolizata proteina industrijske konoplje može pridonijeti

održivijem pristupu u biotehnologiji, osiguravajući visoke prinose i kvalitetu proizvoda, dok istovremeno smanjuje ovisnost o životinjskim proizvodima i doprinosi ekološkoj održivosti industrije.

U prijašnjim istraživanjima u sklopu projekta „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj (HRZZ IP-2016-06-3848)“ ispitan je utjecaj proteinskih hidrolizata konoplje na rast i produktivnost stanica CHO DP-12. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati učinak prihrane proteinskim hidrolizatima konoplje na rast, vijabilnost, metabolizam i produktivnost stanica CHO DP-12 stanica tijekom šaržnog uzgoja u *serum-free* mediju. Ranija istraživanja su pokazala da dodatak frakcija proteinskog hidrolizata konoplje (<10 kDa), dobivenih enzimima Neutraza i Protamex, na početku uzgoja značajno usporava rast stanica, no unatoč tome stanice su ostvarivale visoke prinose proizvoda. Na temelju tih saznanja, istraženo je djelovanje frakcija konoplje kao naknadnog dodatka mediju tijekom faze logaritamskog rasta stanica s pretpostavkom da će nakon ostvarenja značajne količine biomase, stanični rast biti inhibiran djelovanjem frakcija, dok bi stanice i dalje proizvodile monoklonsko protutijelo. Tijekom provedbe eksperimenta, praćeni su profil rasta stanica i vijabilnost kulture, analiziran je utjecaj hidrolizata na metabolizam stanica praćenjem potrošnje glukoze i nastanka amonijaka, a produktivnost stanica, odnosno uspješnost proizvodnje imunoglobulina G, određena je mjerenjem koncentracije nastalog produkta na kraju uzgoja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA

Kultura životinjskih stanica je proces uzgoja humanih, životinjskih ili stanica insekata u kontroliranim odnosno umjetno kreiranim idealnim uvjetima rasta u svrhu istraživanja biologije stanica, staničnog ciklusa, međustaničnih interakcija, toksikoloških ispitivanja novih lijekova, karakterizacije tumorskih stanica, genske terapije te proizvodnje cjepiva, monoklonskih protutijela i raznih farmaceutika. Tehnika uzgoja stanica izvan prirodnog okruženja otkrivena je početkom 20. stoljeća kada su uspostavljene i prve kulture stanica sisavaca, a sredinom 20. stoljeća kultura životinjskih stanica postala je već uobičajena tehnika u laboratorijima (Verma i sur., 2020). Većina terapeutika poput hormona, protutijela, interferona, faktora zgrušavanja i cjepiva zahtijevaju određenu sličnost s humanim proteinima koju je nemoguće zadovoljiti proizvodnjom u stanicama bakterija ili kvasaca jer u njima proteini ne mogu proći potrebne posttranslacijske modifikacije zbog čega je primjena kultura životinjskih stanica u biotehnologiji danas neizostavna (Popović i Pörtner, 2012).

Kulture stanica dobivaju se izdvajanjem pojedinačnih stanica iz tkiva ili organa različitih životinjskih organizama te njihovom razgradnjom mehaničkim, enzimskim ili kemijskim putem. Moguće ih je podijeliti na:

- primarne kulture
- stanične linije i
- stanične sojeve.

Primarne kulture rezultat su uzgoja stanica izdvojenih direktno iz tkiva i organa, a karakterizira ih heterogenost fenotipa, usporen stanični rast, ograničen kapacitet rasta i kratak životni vijek. Zbog svoje heterogenosti zadržavaju svojstva tkiva iz kojeg potječu te se radi toga koriste kao najvjerniji modeli za opisivanje *in vivo* uvjeta, međutim nisu pogodne za širu upotrebu u industrijske svrhe. Mogu se podijeliti na adherentne, kojima je potrebna stabilna, netoksična i inertna podloga za rast, i suspenzijske kulture, koje se mogu kontinuirano uzgajati u tekućem mediju bez potrebe za prijanjanjem za čvrstu površinu (Verma i sur., 2020).

Stanične linije predstavljaju homogene populacije stanica dobivene subkultivacijom primarne kulture stanica, a mogu biti konačne (smrtne) ili kontinuirane (besmrtne). Konačne stanične linije dobivene iz normalnog tkiva imaju ograničen broj generacija nakon čega

umiru, dok se kontinuirane stanične linije mogu dijeliti neograničen broj puta. Besmrtnost stanične linije može biti rezultat tumorskog porijekla stanica donora ili spontane mutacije stanica netumorskog tkiva, međutim najčešće se postiže procesom transformacije koji uzrokuje trajnu promjenu fenotipa. Transformacija može biti potaknuta kancerogenim kemijskim agensima, virusnom infekcijom ili overekspresijom gena regulatora staničnog ciklusa. Kontinuirane stanične linije imaju sposobnost brzog rasta i dostizanja visokih gustoća stanica, manje su ovisne o faktorima rasta što im omogućava rast u definiranim medijima, no genetički su nestabilne te se morfološki razlikuju u odnosu na tkivo donora (Alves i sur., 2008). Selekcijom ili kloniranjem primarne kulture ili stanične linije može se razviti stanični soj.

Zahvaljujući tehnologiji rekombinantne DNA, razvoju trajnih staničnih linija s mogućnošću suspenzijskog uzgoja, optimizacije stanične produktivnosti te razvoju kemijski definiranih medija za uzgoj koji su utjecali na optimizaciju cjelokupnog procesa proizvodnje i povećanja učinkovitosti bioprocesa, danas se u biotehnološkoj industriji primjenom kulture životinjskih stanica proizvodi niz biofarmaceutika među kojima je najbrže rastući segment upravo proizvodnja monoklonskih protutijela (Kuystermans i Al-Rubeai, 2015).

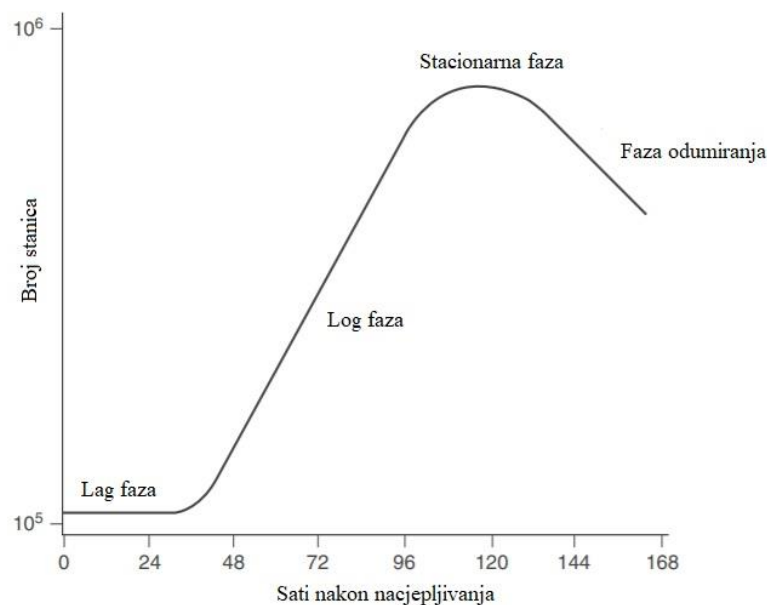
2.1.1. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica

Uspješan uzgoj i proliferacija životinjskih stanica izvan izvornog tkiva ili organa ovisi o uvjetima i pravilnom održavanju procesnih parametara uzgoja gdje je cilj postići što sličnije uvjete onima kojima su stanice bile izložene *in vivo*. Optimalni uvjeti uzgoja tako uključuju sterilnu okolinu, odgovarajući hranjivi medij kao izvor nutrijenata i faktora rasta, optimalnu temperaturu, pH, vlažnost, postotak CO₂ i O₂ te osmolalnost. Osim toga, prilikom uzgoja vrlo je bitna primjena aseptične tehnike rada kako bi se izbjegla opasnost od kontaminacije mikroorganizmima, posebice bakterijama čije je vrijeme udvostručenja znatno kraće i mogu vrlo lako prerasti hranjivu podlogu. Hranjivi medij za uzgoj mora sadržavati izvor ugljikohidrata, aminokiselina, vitamina, anorganskih soli te dodatak seruma koji služi kao izvor hormona i faktora rasta. Izbor medija se vrši ovisno o vrsti stanica koja se uzgaja, ali i svrsi uzgoja (Verma i sur., 2020). Kako bi se održao optimalan pH koji se za većinu životinjskih stanica mora održavati u rasponu od 7,0 do 7,4, hranjivi medij je potrebno pufferirati. U tu svrhu se najčešće koristi natrijev bikarbonat koji je jeftin i ne šteti staničnom rastu. Optimalan sastav atmosfere koji čini 95 % zraka i 5 % CO₂ kontrolira se uzgojem stanica u inkubatoru koji također osigurava i održavanje optimalne vlažnosti i temperature

uzgoja koja za životinjske i humane stanice iznosi 36 –37 °C. Pad temperature ispod optimalne predstavlja puno manji problem od porasta temperature, a uzrokuje usporavanje staničnog metabolizma, dok nagli porast temperature može kod stanica izazvati adaptivni šok. Vlažnost utječe na razinu osmolalnosti koja je bitan faktor jer regulira pravilnu izmjenu tvari u i izvan stanice. Optimalna vrijednost osmolalnosti kreće se u rasponu od 280 – 320 mOsm kg⁻¹ (Ryan, 2008).

2.1.2. Faze rasta životinjskih stanica

Stanice uzgajane u kulturi, ako su zadovoljeni svi uvjeti, pokazuju karakterističan sigmoidalni profil krivulje rasta (slika 1). Krivulja rasta pokazatelj je uspješnosti adaptacije stanične kulture novim uvjetima, dostupnosti nutrijenata, te u ukoliko je riječ o adherentnim stanicama, dostupnosti slobodne površine za rast (Leo i sur., 2008). Poznavanje profila staničnog rasta i njegovim pravilnim praćenjem moguće je zamijetiti reakciju stanica na promjene u okolišu uslijed dodatka različitih komponenata u hranjivi medij, ali i optimizirati proizvodni proces u svrhu ostvarenja većeg prinosa proizvodnje (Verma i sur., 2020). Krivulja rasta stanične kulture započinje lag fazom, nakon čega slijedi eksponencijalna (log faza), potom stacionarna faza i naposljetku faza odumiranja stanica.



Slika 1. Prikaz krivulje rasta stanica (prema Davis, 2011)

Nakon inokulacije hranjivog medija, stanice se nalaze u lag fazi, tijekom koje ne dolazi do porasta broja stanica ili one rastu izrazito sporo, već se stanice adaptiraju na novi okoliš. Lag faza traje u prosjeku od 2 do 24 sata, a na duljinu trajanja utječe faza rasta u kojoj

su stanice bile izuzete za inokulaciju nove podloge te koncentracija u kojoj su nacijačpljene. U pravilu stanice nacijačpljene u manjoj početnoj koncentraciji imati će dužu fazu prilagodbe. Suprotno tome, stanice izuzete iz faze eksponencijalnog rasta imati će kraću lag fazu od onih izuzetih iz stacionarne faze (Davis, 2011). Nakon adaptacije i sinteze svih potrebnih faktora, stanice ulaze u log fazu rasta koju obilježava aktivna dioba stanica tijekom koje broj stanica raste eksponencijalno. U toj fazi stanice se nalaze u najboljem fiziološkom stanju pa se upravo iz te faze najčešće koriste za proučavanje staničnih funkcija. Log faza traje sve dok stanice ne potroše sve nutrijente iz hranjive podloge ili dok njihov rast ne krene inhibirati djelovanje nusproizvoda staničnog metabolizma. Stacionarna faza rasta nastupa kada se brzina rasta stanica izjednači s brzinom njihova odumiranja te nema značajne promjene u broju stanica. U toj fazi dolazi do nakupljanja specifičnih produkata tzv. sekundarnih metabolita. Zanimljivo je da se ova faza može prolongirati naknadnim dodatkom svježeg hranjivog medija i time povećati prinos proizvodnog procesa (Freshney, 2005). Posljednju fazu staničnog ciklusa čini faza odumiranja prilikom koje je brzina nastajanja novih stanica nedovoljna da bi se kompenziralo odumiranje stanica u kulturi. Stanična smrt nastupa zbog iscrpljenosti samih stanica i/ili nedostatka nutrijenata u hranjivom mediju za uzgoj. Kao rezultat toga vijabilnost kulture krene naglo opadati i sam uzgoj se zaustavlja (Jelić, 2020).

2.1.3. Metabolizam životinjskih stanica

Metabolizam definiramo kao skup svih metaboličkih puteva u stanici, odnosno niz povezanih kemijskih reakcija kataliziranih enzimima kojima se molekule prevode jedna u drugu. Uloga metabolizma je održavanje ravnoteže između proizvodnje i potrošnje energije u stanici ovisno o trenutnim potrebama. Čine ga strogo regulirani putevi razgradnje molekula, katabolički putevi, i putevi izgradnje molekula, anabolički putevi. Cijepanjem složenih molekula (ugljikohidrata, lipida, proteina i nukleinskih kiselina) stanica priskrbljuje energiju za odvijanje staničnih procesa. Na račun te energije putevima biosinteze iz jednostavnijih molekula (aminokiselina, monosaharida, masnih kiselina i dušikovih baza), tzv. prekursora, stanica sintetizira potrebne makromolekule (Teparić, 2017). Poznavanje metaboličkih potreba CHO stanične linije tijekom njihove kultivacije od iznimne je važnosti s obzirom da se potrošnja supstrata i nastanak nusprodukata stanica u kulturi u određenoj mjeri razlikuju od onih *in vivo*. Postoje različiti intrinzični (genetski) i vanjski (okolišni) čimbenici koji promiču i potiču rast stanica, produljuju održivost kulture i povećavaju specifičnu produktivnost podržavanjem učinkovitog staničnog metabolizma. U to spada i opskrba ključnim metabolitima kao što su aminokiseline, ugljikohidrati i hidrolizati, koji podržavaju

akumulaciju biomase i zadovoljavaju unutarnje stanične energetske potrebe (Kelly i sur., 2018). Glukoza i glutamin glavni su izvori ugljika i energije za uzgoj životinjskih stanica, međutim pružanje ovih supstrata u izobilju potiče nastajanje metaboličkih nusproizvoda kao što su laktat i amonijak, čija akumulacija često dovodi do inhibicije staničnog rasta i proizvodnje proteina te smanjene kvalitete glikozilacije proteina (Ahn i Antoniewicz, 2011).

2.1.4. CHO stanična linija

Stanice jajnika kineskog hrčka najpouzdaniji su i najkorišteniji domaćini za industrijsku proizvodnju komercijalnih terapijskih proteina (Omasa i sur., 2010). Tome u prilog ide i podatak da 70 % svih rekombinantnih proteina te gotovo sva monoklonska protutijela proizvedena danas, dolaze od CHO stanica (Li i sur., 2010). CHO stanice uspostavljene su kao kontinuirana stanična linija 1957. godine od strane Dr. Theodora T. Puck-a i aktivno se koriste već preko 60 godina. Od tada pa do danas razvijen je niz različitih CHO staničnih sojeva s poboljšanim proizvodnim karakteristikama poput suspenzijskog rasta i produktivnosti koja doseže i do 10 g L⁻¹ proteina od interesa (Tihanyi i Nyitray, 2021). Nekoliko ključnih prednosti koje CHO stanice imaju u odnosu na druge industrijski važne ekspresijske sustave su prilagodljivost uvjetima uzgoja, mogućnost provedbe posttranslacijskih modifikacija koje su kompatibilne za ljudsku primjenu, lako uvođenje gena od interesa metodama genetičkog inženjerstva i njihova ekspresija u dovoljnim količinama te dobar rast u *serum-free* i kemijski definiranim medijima koji osiguravaju reproducibilnost rezultata (Fischer i sur., 2015). Nadalje, opasnost od kontaminacije ljudskim virusima je daleko manja prilikom rada s CHO stanicama jer se većina patogena u njima ne može razmnožavati (Lai i sur., 2013).

Jedan od ključnih izazova za ispunjavanje sve većih zahtjeva za terapijskim proteinima je ekonomska isplativost. Kako bi se smanjili troškovi proizvodnje i maksimizirali proizvodni prinosi nužan je razvoj tehnologija koje osiguravaju visoku kvalitetu i produktivnost CHO ekspresijskih sustava. Postoje razni načini poboljšanja karakteristika rasta, odnosno ubrzanja proliferacije stanica i/ili postizanja maksimalne gustoće stanica, među kojima su optimizacija hranjivog medija i bioprocenih parametara te korištenje metoda genetičkog inženjerstva (Fischer i sur., 2015).

2.2. HRANJIVI MEDIJ ZA UZGOJ STANICA

Hranjivi medij najvažnija je komponenta u umjetnom okolišu stanica, a njegov sastav utječe na preživljavanje, metabolizam i proliferaciju stanica. Njegova uloga je da osigura odgovarajuće uvjete pH i osmolalnosti, kao i sve potrebne nutrijente, faktore rasta i hormone vitalne za rast i održavanje stanica u *in vitro* uvjetima. Postoje 3 osnovne vrste medija, a to su bazalni medij, medij sa smanjenim udjelom seruma i *serum-free* medij. Najčešće upotrebljavani standardni mediji za uzgoj životinjskih stanica su BME (engl. *Basal Medium Eagle's*), MEM (engl. *Minimum essential Medium*) i DMEM (engl. *Dulbecco's modified MEM*), koji su suplementirani s humanim, konjskim ili goveđim serumom, proteinskim hidrolizatima i ekstraktima embrija. Svaki hranjivi medij za uzgoj staničnih kultura mora sadržavati osnovne komponente koje čine voda, ugljikohidrati, aminokiseline, anorganske soli, vitamini, minerali te elementi u tragovima (Ritacco i sur., 2018).

Voda koja se koristi za pripremu hranjivog medija mora biti iznimne čistoće kako elementi u tragovima, bakterije i druge nečistoće ne bi uzrokovale kontaminaciju i posljedično inhibiciju staničnog rasta.

Kao izvor ugljika i energije najvažniju ulogu igraju ugljikohidrati, među kojima je najčešća upotreba glukoze. Glukoza se u hranjivi medij dodaje u koncentracijama od 5 do 25 mM. Razgradnja glukoze najčešće se odvija procesom glikolize prilikom čega se glukoza metabolizira do piruvata čiji metabolički put se potom nastavlja do laktata i acetil-CoA. Nastali acetil-CoA se u ciklusu limunske kiseline oksidira do CO₂ i vode što opskrbljuje stanicu potrebnom energijom. Međutim, u većini slučajeva glukoza se metabolizira do laktata čije nakupljanje u stanici uzrokuje negativne promjene pH vrijednosti i osmotskog tlaka, te u konačnici djeluje inhibitorno na stanični rast (Moraes i sur., 2008).

Kao strukturni elementi proteina, nukleotida i lipida, aminokiseline su jedan od ključnih dodataka mediju za uzgoj stanica. Dodaju se u obliku seruma, nedefinirani izvor i kao definirane komponente. Vrlo je bitan dodatak esencijalnih aminokiselina, u koje spadaju arginin, cistein, glutamin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan, tirozin i valin, s obzirom da njih stanica ne može sama proizvesti. Neesencijalne aminokiseline koje se dodaju u medij čine alanin, asparagin, asparaginska kiselina, prolin, glutaminska kiselina, glicin i serin. Za razliku od ostalih aminokiselina koje se dodaju u koncentracijama od 0,1 do 1 mM, glutamin se dodaje u nešto većim količinama (1 – 5 mM)

jer osim što služi kao izvor ugljika, dušika i energije, poboljšava staničnu vijabilnost, reducira proizvodnju laktata i povećava produktivnost stanične linije (Xu i sur., 2014).

Soli koje se pretežno dodaju u medij Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} i HCO_3^- . Njihova funkcija je održavanje osmotskog pritiska, membranskog potencijala i pH, te kao enzimski kofaktori. Koncentracija magnezija i kalcija mora biti niska u suspenzijskim kulturama jer uzrokuju agregaciju i adheziju stanica.

Vitamini služe kao enzimski kofaktori esencijalni za opći stanični metabolizam. Stanica ih nije u mogućnosti proizvesti u dovoljnim količinama pa ih je zbog toga potrebno dodati u hranjivi medij u vrlo malim količinama (μmol). Za stanice je osobito važan dodatak vitamina B skupine, dok ostali vitamini i minerali u medij dopijaju dodatkom seruma. Kad govorimo o *serum-free* mediju, osim vitamina česta je praksa dodavanja elemenata u tragovima kao što su željezo, magnezij, selen, cink, bakar, vanadij i molibden, u koncentracijama ne većim od $5 \mu\text{M}$ (Moraes i sur., 2008).

U svrhu zaštite od potencijalne kontaminacije stanične kulture, u medij se često dodaju antibiotici koji kontroliraju rast bakterijskih i fungalnih kontaminanata. Međutim njihova primjena treba biti kontrolirana i ograničena na male koncentracije zbog njihovog citotoksičnog utjecaja na stanice, potencijalnog prikrivanja kontaminacije mikoplazmom i razvoja rezistentnih organizama.

Uz sve navedeno, medij se često obogaćuje raznim suplementima koji pospešuju rast i povećavaju prinos proizvodnje. Među njima veliku ulogu igraju faktori rasta koji utječu na stanični rast, proliferaciju, oporavak stanica i diferencijaciju, i bez kojih je u mnogim slučajevima rast inhibiran ili zaustavljen. Staničnu kulturu je moguće opskrbiti faktorima rasta dodatkom životinjskog seruma, međutim problem predstavlja promjenjiva i nepoznata kompozicija seruma radi koje je vrlo teško reproducirati rezultate prilikom istraživanja. Nasuprot tome, *serum-free* mediji imaju točno definirani sastav prilagođen rastu i potrebama pojedine stanične linije čime se znatno smanjuje kompleksnost njihove formulacije (Ritacco i sur., 2018).

2.2.1. Serum

Životinjski serum kompleksna je biološka smjesa koja se dobiva uklanjanjem krvnih stanica i faktora zgrušavanja iz krvi, a kao dodatak hranjivom mediju utječe na rast i proliferaciju stanica, vezanje stanica za supstrat i njihovo širenje po podlozi, propusnost

stanične membrane i transport molekula u stanicu te pruža zaštitu od proteolize. Premda njegov sastav nije u potpunosti poznat, sadrži brojne nutrijente poput hormona (inzulin, hidrokortizon i hormon rasta), faktora rasta, proteina (albumin, globulin, fibronektin i tranferin), masnih kiselina i lipida, citokina, vitamina, minerala i elemenata u tragovima, faktora prihvatanja i širenja, ugljikohidrata te neproteinskih izvora dušika (Brunner i sur., 2010). Serum se u hranjive medije obično dodaje u koncentraciji od 2 – 10 % (v/v), a osim već navedenih predispozicija poznato je i da povećava viskoznost medija, što štiti stanice u suspenzijskom uzgoju od mehaničkih oštećenja koja mogu nastati prilikom miješanja ili pipetiranja, te poboljšava puferirajući kapacitet hranjivog medija (Arora, 2013). Najčešće korišteni serum jest fetalni goveđi serum (FBS) zbog visokog udjela faktora rasta i niskog udjela γ -globulina, a osim njega koriste se i teleći serum (CS) te konjski serum (HS) (Yao i Asayama, 2017). Međutim, danas je sve poželjnije izbjegavati korištenje seruma zbog njegovih brojnih nedostataka, od kojih su najproblematičniji izrazito visoka cijena proizvodnje i pročišćavanja proizvoda, kompleksnost i nedefiniranost sastava, rizik od mikrobne kontaminacije te citotoksičnost i inhibitorno djelovanje kod određenih staničnih kultura. Osim toga, u novije vrijeme etički problemi vezani uz patnju životinja također zahtijevaju pronalazak novih rješenja. Naime, 2002. godine proizvedeno je oko 600 000 L FBS-a, od čega je samo 1/3 zadovoljila potrebne uvjete za upotrebu u staničnoj terapiji, što uz činjenicu da potrebe za serumom rastu 10 – 15 % na godinu postavlja pitanje o mogućnosti zadovoljenja tih potreba u budućnosti (Karnieli i sur., 2016).

Upravo iz tih razloga znanstvenici se sve češće okreću korištenju *serum-free* hranjivih medija kod kojih se pogodnosti seruma kompenziraju dodatkom odgovarajućih nutritivnih i hormonalnih formulacija. Među njih spadaju faktori pričvršćivanja, specifični hormoni i faktori rasta, epidermalni faktor rasta, glukokortikoidi, lipidi, antioksidansi i vitamini (Van der Valk i sur., 2010). S obzirom da potreba za serumu ekvivalentnim faktorima za promicanje rasta uvelike ovisi i varira obzirom na tip stanične linije, nemoguće je proizvesti univerzalnu formulaciju koja bi bila prikladna za sve stanične linije, već se za svaki određeni tip stanica proizvodi idealan medij s odgovarajućim faktorima rasta (Butler, 2013). *Serum-free* hranjivi mediji uključuju *protein-free* hranjive medije i kemijski definirane hranjive medije. Upravo je definiranost sastava *serum-free* medija njegova najveća prednost u odnosu na hranjive medije s dodatkom seruma, te osigurava visoku reproducibilnost rezultata, točnost praćenja procesa uzgoja te olakšava identifikaciju staničnih produkata. Nedostatak *serum-free* medija predstavljaju izniman trud, vrijeme i trošak koje je potrebno uložiti u

odabir i kombiniranje različitih suplemenata koji su danas dostupni, uzimajući pritom u obzir njihove međusobne interakcije (Yao i Asayama, 2017). Uz to, njihova je primjena limitirana zbog produženog vremena prihvaćanja stanica za podlogu, prisutnosti određenih komponenata koje mogu imati nepoželjan utjecaj na stanice, nedostatka inhibitora proteolitičkih enzima te smanjenja specifične brzine rasta i produktivnosti stanica (Sung i sur., 2004).

2.2.2. Biljni hidrolizati proteina kao dodatak mediju bez seruma

Hidrolizati proteina dobiveni iz kazeina, životinjskog i biljnog tkiva, mikrobne ili kvašćeve biomase, bogati različitim hranjivim tvarima poput aminokiselina, vitamina i minerala, lipida, oligopeptida i elemenata u tragovima, pokazali su se kao prikladna zamjena za FBS. Dobivaju se postupkom kiselinske, enzimske ili mikrobne hidrolize, a sadrže di-, tri-, oligopeptide i aminokiseline koje imaju sposobnost utjecaja na fiziološku funkciju stanica te samim time poboljšavaju produktivnost procesa i fermentacijske sposobnosti stanica. Primjenjuju se u mnogim područjima znanosti i industrije, poput medicine, agrikulture, proizvodnje rekombinantnih proteina, dijagnostike hranjivih medija, bioremedijacije, industrijske fermentacije, a s razvojem i jačanjem biotehnologije postali su veoma korisni kod proizvodnje monoklonskih protutijela, peptida i terapijskih proteina (Pasupuleti i Demain, 2010). No, zbog smanjenja opasnosti od kontaminacije koju podrazumijeva prisustvo komponenata životinjskog podrijetla, sve se više pažnje pridodaje biljnim hidrolizatima proteina kao dodacima mediju bez seruma.

Biljni proteinski hidrolizati posljednjih se pedesetak godina istražuju u svrhu smanjenja ili potpunog ukidanja uporabe FBS-a jer osim što su izvor nutrijenata, poput kratkolančanih peptida, mogu imati pozitivno djelovanje na rast životinjskih stanica u kulturi, osiguravaju stanicama faktore rasta, antiapoptotičke faktore i stimulirajuće faktore za proizvodnju proteina (Moraes i sur., 2008). Proizvode se iz biljnih supstrata bogatih proteinima, kao što su sjemenke soje, sezama, pšenice, riže, pamuka i uljane repice. Istraživanje Farges-Haddani i suradnika (2006.) pokazalo je da dodatak peptidnih frakcija hidrolizata uljane repice ima pozitivan učinak na rast i produktivnost CHO stanica, kao i na održavanje vijabilnosti, smanjenje stope stanične smrti i bržu prilagodbu stanica na medij bez seruma. Frakcioniranje proteinskih hidrolizata u svrhu dobivanja mješavina manjih peptida različite veličine, naboja i hidrofobnosti može poboljšati njihov učinak na rast stanica (Park i sur., 2010; Franek i sur., 2000). Premda je potvrđeno da dodatak hidrolizata proteina soje

serum-free mediju pozitivno utječe na rast i vijabilnost CHO stanica, pokazalo se nužno prije njihove primjene eksperimentalno odrediti optimalnu koncentraciju korištenog proteinskog hidrolizata budući visoke koncentracije aminokiselina i oligopeptida u kombinaciji s komponentama koje se već nalaze u mediju mogu inhibitorno djelovati na rast stanica (Chun i sur., 2007).

2.2.3. Konoplja (*Cannabis sativa* L.)

Konoplja (*Cannabis sativa* L.) jednogodišnja je dvodomna biljka porijeklom iz središnje Azije, poznata po stoljetnoj medicinskoj primjeni. Sadrži biološki aktivne spojeve kanabinoide među kojima su glavni predstavnici tetrahidrokanabinol (THC), psihoaktivni sastojak i kanabidiol (CBD) koji je zaslužan za njezina ljekovita svojstva. Sojevi biljke mogu se podijeliti na tri fenotipa koji se međusobno razlikuju prema udjelu THC-a i CBD-a prisutnih u biljci (Chandra i sur., 2017). Gotovo svaki dio biljke konoplje ima svoju upotrebu, uključujući sjeme, stabljiku, korijen i cvijet. Konoplju se često naziva biljkom budućnosti zbog njezine svestranosti i široke primjene kako u terapijske i farmakološke svrhe, tako i u tekstilnoj industriji, prehrambenoj industriji, industriji papira, kozmetičkoj industriji i fitoremedijaciji (Farinon i sur., 2020). Predstavlja bogat izvor celuloznih i drvenastih vlakana te bioaktivnih spojeva zanimljivih fizikalno-kemijskih svojstava zaslužnih za njezinu raznolikost primjenu. Sjeme konoplje sadrži 25 – 35 % lipida, 20 – 25 % proteina, 20 – 30 % ugljikohidrata, 10 – 15 % netopljivih vlakana, vitamina i minerala, uključujući fosfor, magnezij, kalij, natrij, sumpor, cink, željezo i kalcij (Callaway, 2004). Među proteinima konoplje najveći udio čine edestin (82 %) i albumin (13 %) koji sadrže esencijalne aminokiseline, posebice arginin i glutaminsku kiselinu, u većem udjelu nego soja, koja se smatra jednim od najpoznatijih izvora visokokvalitetnih proteina iz biljaka (Farinon i sur., 2020).

2.2.4. Valproična kiselina u kulturi životinjskih stanica

Većina današnjih biofarmaceutskih proizvoda izrađena je korištenjem CHO stanične linije kao stanica domaćina koje stabilno izražavaju rekombinantni terapijski protein od interesa. Budući je kultura stanica prvi korak u bilo kojem procesu proizvodnje bioloških lijekova, poboljšanje produktivnosti ovog procesa igra ključnu ulogu u smanjenju troškova i povećanju proizvodnog kapaciteta kod plasiranja bioloških lijekova na tržište. Uz pristupe inženjeringa staničnih linija i optimizacije medija, jedna od strategija za povećanje titra proizvoda je nadopunjavanje kulture malim molekulama induktorima kao što su natrijev

butirat i valproična kiselina (Yang i sur., 2014). Valproična kiselina (VPA) trivijalni je naziv za 2-propilpentansku kiselinu prvi put sintetiziranu 1882. godine od strane B.S. Burtona. To je mala razgranata karboksilna kiselina koja ima sposobnost inhibicije histon deacetilazne aktivnosti. U vodenim otopinama koje sadrže alkalijske metale postoji u disociranom obliku te se može lako dostaviti u organizam u obliku natrijevih ili magnezijevih soli. Odobrena je od strane američke agencije za hranu i lijekove (FDA) kao lijek za liječenje epileptičkih napadaja i manija koje se javljaju kod osoba s bipolarnim poremećajem, a podaci pokazuju da valproična kiselina utječe na rast stanica, diferencijaciju, apoptozu i imunogenost uzgojenih stanica raka i tumora zbog čega se nameće kao potencijalni lijek u borbi protiv raka (Kostrouchova i sur., 2007).

Stanice sisavaca koriste epigenetske modifikacije kao što su deacetilacija i metilacija histona DNA kao obrambene mehanizme za sprječavanje ekspresije neželjenih ili stranih gena, poput onih uključenih u nastanak raka ili integraciju virusa. Kod ekspresije heterolognih proteina kao što su antitijela u CHO stanicama, ovi obrambeni mehanizmi mogu djelovati kao prepreka za dobivanje visokih prinosa proizvoda. Acetilirani i deacetilirani histoni povezani su s transkripcijski aktivnim i neaktivnim kromatinom, a inhibitori histonske deacetilaze (iHDAC) kao što su VPA, trihostatin A i natrijev butirat, kada se primjenjuju na stanice sisavaca *in vivo* ili *in vitro*, mogu spriječiti transkripcijsko utišavanje gena (Wulhfard i sur., 2010). Uistinu, pokazalo se da nekoliko iHDAC, kada su dodani u medij za uzgoj, povećavaju prinos rekombinantnih proteina u nestabilno i stabilno transfektiranim stanicama sisavaca, prilikom čega VPA najmanje utječe na održivost kulture u usporedbi s drugim inhibitorima (Segar i sur., 2017). Dodatkom VPA prilikom uzgoja CHO i HEK-293 (engl. *Human Embryonic Kidney 293*) kultura, Backliwel i sur. (2008.) su uspjeli povećati prinos imunoglobulina G (IgG) za 1,5 puta odnosno 5 puta. Nadalje, Wulhfard i sur. (2010.) u CHO staničnim linijama tretiranim VPA zabilježili su 10 puta veću količinu mRNA koja kodira za teški i laki lanac IgG-a i samim time veću produktivnost stanične kulture. Također se pokazalo da dodatak veće koncentracije valproične kiseline u kasnijim fazama uzgoja šaržne kulture CHO stanica povećava prinos monoklonskog protutijela bez značajne promjene u kvaliteti proizvedenog proteina (Yang i sur., 2014). Uz inhibiciju aktivnosti histon deacetilaza smatra se da valproična kiselina sudjeluje i u drugim regulatornim putevima, uključujući nadzor endoplazmatskog retikuluma i odgovor organizma na stres poznatiji kao odgovor nesmotanih proteina (engl. *Unfolded Protein Response, UPR*), te zaustavljanje staničnog ciklusa u G1 fazi (Segar i sur., 2017).

2.3. VRSTE UZGOJA ŽIVOTINJSKIH STANICA

Otpriblike krajem 1970-ih postalo je očito da se stanice mogu uzgajati *in vitro* u velikim mjerilima za proizvodnju širokog spektra proizvoda za poboljšanje zdravlja u ljudi. Od tada se sve više provode istraživanja s ciljem definiranja uvjeta okoliša ključnih za učinkovitu proliferaciju stanica u umjetnom okruženju. Iako postoje različite klasifikacije bioreaktorskih sustava, najopćenitija je podjela prema načina rada koja uključuje: šaržni uzgoj (engl. *batch*), šaržni uzgoj s prihranom (engl. *fed-batch*), kontinuirani i perfuzijski uzgoj. Šaržni uzgoj oblik je diskontinuiranog načina rada te je daleko najjednostavniji način uzgoja, a karakterizira ga rast stanica u konstantnom volumenu tijekom cijelog procesa. Zahvaljujući praktičnosti i lakoći izvedbe vrlo je popularan izbor za provođenje razvojnih istraživanja u akademskim i industrijskim laboratorijima, omogućuje jednostavno praćenje rasta stanica i stvaranja produkta, te je prikladan za manje eksperimente s ograničenim resursima i vremenom. Osim jednostavnosti opreme i operativnog postupka, glavne značajke šaržnog uzgoja su mali rizik od kontaminacije, niska produktivnost te primjenjivost u industrijskim procesima u mjerilima do 20 000 L (Véliz i sur., 2008).

Šaržni uzgoj s prihranom najčešća je metoda uzgoja životinjskih stanica u komercijalnoj proizvodnji rekombinantnih proteina (Freund i Croughan, 2018). Razlika ovog načina rada u usporedbi sa šaržnim uzgojem je što se jedna ili više hranjivih tvari unosi u reakcijsku smjesu tijekom samog uzgoja kao nadomjestak za onaj dio nutrijenata koji su stanice već konzumirale. Iz tog razloga, šaržne kulture s prihranom počinju s radnim volumenom nižim od maksimalnog radnog volumena, kako bi se supstrati mogli dodavati tijekom razdoblja uzgoja. U šaržnom procesu s prihranom, bazalni medij podržava početni rast stanica, a prihrana supstratom sprječava iscrpljivanje hranjivih tvari te produžuje fazu produktivnog rasta (Fan i sur., 2017). Na taj način povećava se ukupna količina hranjivih tvari koje stanice metaboliziraju, što rezultira višim konačnim koncentracijama stanica i proizvoda, uz eliminaciju negativnih učinaka visokih početnih koncentracija supstrata. U usporedbi sa šaržnim uzgojem, metodom šaržnog uzgoja s prihranom postižu se duže trajanje uzgoja, veće gustoće stanica, veće koncentracije proizvedenog protutijela te niže koncentracije toksičnih nusprodukata, laktata i amonijaka (Xie i Wang, 1994). Nadalje, za razliku od perfuzijskog uzgoja, ciklusi šaržnog uzgoja s prihranom znatno su kraći, što olakšava validaciju procesa. Šaržnim uzgojem s prihranom postižu se konvencionalne koncentracije proizvoda koje se broje u mg L⁻¹, ali optimizacijom strategija prihrane i korištenjem poboljšanih rekombinantnih staničnih linija moguće je dostići koncentracije

proizvoda u g L^{-1} . U procesima šaržnog uzgoja s prihranom, produktivnost je obično ograničena nakupljanjem toksičnih metabolita, koji mogu inhibirati rast stanica i negativno utjecati na održivost kulture i stvaranje proizvoda. Neke od strategija suočavanja s ovim problemom su potpuna ili djelomična zamjena glukoze i glutamina supstratima koji stanice sporije metaboliziraju, optimizacija metaboličkih puteva primjenom metoda genetičkog inženjerstva, kao što je uvođenje gena za glutamin sintetazu koja omogućuje rast na podlogama koje imaju niske koncentracije ili uopće ne sadrže glutamin (Véliz i sur., 2008). Freund i Croughan su 2018. godine razvili tehnologiju suplementacije i adaptacije laktatom (engl. *Lactate Supplementation and Adaptation (LSA) technology*) kojom su uspjeli značajno smanjiti koncentracije laktata i amonijaka u CHO staničnoj liniji, uz postizanje vijabilnosti i maksimalne gustoće stanica usporedivim s trenutnim industrijskim standardima. Još jedan nedostatak šaržnog uzgoja s prihranom je dugo vrijeme zadržavanja proizvoda u reakcijskoj smjesi. Uzevši u obzir da su većina proizvoda od interesa proteini (glikoproteini), dugim zadržavanjem unutar bioreaktora u prisutnosti proteaza i glikozidaza povećava se rizik da ti enzimi razgrade i u nekim slučajevima unište važan dio aktivnog produkta koji se sintetizira. Glavne tehnološke značajke ove metode uzgoja su umjerena operativna složenost, umjereni rizik od kontaminacije, srednja volumetrijska produktivnost, dugo vrijeme zadržavanja proizvoda u bioreaktoru i mogućnost primjene u industrijskim procesima u mjerilima do 20 000 L. Uzgoj životinjskih stanica metodom šaržnog uzgoja s prihranom više od 25 godina koristi se za proizvodnju monoklonskih protutijela i drugih rekombinantnih proteina za klinička ispitivanja i komercijalnu prodaju. Tijekom tog razdoblja došlo je do značajnih poboljšanja u tehnologiji i rezultirajućih prinosa proizvoda. Daljnja poboljšanja ove operativne metode mogu omogućiti dosezanje proizvodnih prinosa više od 20 g L^{-1} , čime bi se dodatno povećala ekonomičnost komercijalne proizvodnje mnogih biofarmaceutika (Freund i Croughan, 2018).

U ovom radu istraživana je utjecaj prihrane proteinskim hidrolizatima konoplje na rast i produktivnost CHO DP-12 stanične linije. Korištene stanice su prilagođene na suspenzijski rast te uzgajane šaržno i s prihranom frakcijama proteinskih hidrolizata konoplje dobivenih hidrolizom proteolitičkim enzimima Neutraza i Protamex, u *serum-free* hranjivom mediju. Karakteristike njihovog rasta uspoređivane su s kontrolnim uzorcima uzgajanim u *serum-free* mediju bez dodatka proteinskih hidrolizata i uz dodatak valproične kiseline. Prilikom provedbe eksperimenta profil rasta stanica i vijabilnost kulture praćeni su svakodnevnim određivanjem broja živih i mrtvih stanica. Analiza metaboličkih potreba CHO DP-12 stanica,

tijekom uzgoja u različitim uvjetima, provedena je određivanjem koncentracije glukoze i amonijaka u mediju za uzgoj. Produktivnost stanica, koja se u ovom slučaju odnosi na uspješnost stanica da proizvode rekombinantno humano monoklonsko protutijelo, anti-IL8, izotop IgG1, određena je mjerenjem koncentracije nastalog proizvoda u hranjivom mediju na kraju uzgoja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Hidrolizat uljne pogače konoplje

Hidrolizat uljne pogače konoplje te njegove peptidne frakcije određenih molekularnih masa korišteni u izradi ovog diplomskog rada navedeni su u tablici 1. Njihova priprema provedena je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te su do uporabe u eksperimentu čuvane na temperaturi od -80 °C. Za njihovu pripravu korišteno je brašno uljne pogače konoplje (Bio Hemp Protein Powder, Soul Food) te proteolitički enzimi *Neutra*TM (N) i *Protamex*TM (P). Detaljan opis pripreme hidrolizata konoplje kao i postupak pripreme frakcija proteina molarne mase <10 kDa opisani su u diplomskom radu kolegice Anje Damjanović (2021).

Tablica 1. Prikaz hidrolizata konoplje (HK), tj. njihovih peptidnih frakcija u točno određenim koncentracijama, korištenih kao dodatak serum free mediju (prihrana) tijekom suspenzijskog uzgoja CHO DP-12 stanične linije. Volumen suspenzijske stanične kulture iznosio je 6 mL

Uzorak	Opis uzorka	Kratica	Vrijeme Prihrane	Volumen prihrane (µl)
Uzorak 1	Frakcija hidrolizata konoplje pripremljen enzimom Neutra sa proteinima <10 kDa, u koncentraciji od 2 g L ⁻¹	N10-2	0. dan uzgoja	173
Uzorak 2		N10-2 (4)	4. dan uzgoja	
Uzorak 3		N10-2 (6)	6. dan uzgoja	
Uzorak 4	Ukupni hidrolizat konoplje pripremljen enzimom Neutra, u koncentraciji 0,5 g L ⁻¹	NUK-1	0. dan uzgoja	70
Uzorak 5		NUK-1 (4)	4. dan uzgoja	
Uzorak 6		NUK-1 (6)	6. dan uzgoja	
Uzorak 7	Frakcija hidrolizata konoplje pripremljen enzimom Protamex sa proteinima <10 kDa, u koncentraciji 2 g L ⁻¹	P10-2	0. dan uzgoja	174
Uzorak 8		P10-2 (4)	4. dan uzgoja	
Uzorak 9		P10-2 (6)	6. dan uzgoja	
Uzorak 10	Bez dodatka hidrolizata	Kontrola 1	/	/
Uzorak 11	Bez dodatka hidrolizata	Kontrola 2	/	/
Uzorak 12	Valproična kiselina, 1 mM	Kontrola 3-VA	4. dan uzgoja	120

3.1.2. Kemikalije

Ala-Gln (200 mM Otopina Alanin-Glutamin), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
Anti-Clumping Agent, GIBCO by Life Technologies, Paisley, UK
Destilirana voda, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska
Dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat, Sigma-Aldrich Handels GmbH, Beč, Austrija
Etanol, 96 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska
Klorovodična kiselina, Kemika, Hrvatska
Limunska kiselina monohidrat, T.T.T. d.o.o., Sveta Nedelja, Hrvatska
Metotreksat (MTX), Cerilliant, Round Rock, Texas, SAD
Natrij-citrat dihidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Sigma-Aldrich Handels GmbH, Beč, Austrija
Natrijev hidroksid, Kemika, Hrvatska
Otopina Antibiotik/Antimikotik (100x), Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka
PowerCHO®-2 CD Chemically Defined Selective Medium, Lonza, Belgija
Rh-inzulin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
Tripan-plavo boja, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
TRIS [Tris(hidroksimetil)aminometan], Sigma-Aldrich, SAD
Valproična kiselina, Sigma-Aldrich, SAD

3.1.3. Otopine i puferi

Natrij-fosfatni pufer (0,1 M; pH 7,43; V = 0,5 L) – pufer za kalibraciju kolone

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	10,10 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	1,7 g
Destilirana voda	500 mL

Natrij-fosfatni pufer (50 mM; pH 7,53; 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 2,74; V = 1,0 L) – pufer za eluciju

Natrij-citrat dihidrat	2,76 g
Limunska kiselina monohidrat	17,4 g
Destilirana voda	1,0 L

TRIS pufer (20 mM; pH 7,43; V = 0,1 L)

Tris	0,24 g
HCl 2 M	1100 μ L
Destilirana voda	99 mL

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

Etanol (96 %)	20 mL
TRIS pufer (20 mM; pH 7,43)	80 mL

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

Fosfatni pufer (pH 7,5)	0,150 mol L ⁻¹
Klor-4-fenol	2 mmol L ⁻¹
4-aminoantripin (PAP)	0,8 mmol L ⁻¹
Glukozaoksidaza (GOD)	20 kU L ⁻¹
Peroksidaza (POD)	1,0 kU L ⁻¹

Standard za određivanje glukoze

Glukoza (5,55 mM)	100 mg dL ⁻¹
-------------------	-------------------------

Reagensi za određivanje amonijaka (L-Glutamine/Ammonia Assay kit, Megazyme, Bray, Irska)

R1:	pufer (pH 8,0)
R2:	NADPH
R3:	glutamat-dehidrogenaza

3.1.4. Uređaji i oprema

Centrifuga, ECEN-205, MRC Lab, Izrael

Digitalna magnetna miješalica Model 682/1

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

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

HPLC uređaj Agilent 1260 Infinity II, Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD

IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, SAD

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Memmert, Njemačka

Kolona Bio-Monolith Protein A, Agilent technologies, SAD

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

Laboratorijska vaga, Boeco, Njemačka

Laboratorijski pribor (epruvete, menzure, laboratorijske čaše, kivete, odmjerne tikvice, boce štrcaljke, i dr.)

Mehanička pipeta P20, P200, P1000, Gilson, SAD

Mehaničke pipete (0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 20 – 200 µL, 100 – 1000 µL) i nastavci za njih, Eppendorf, Hamburg, Njemačka

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

Ploče s jažicama, Corning, SAD

Serološke pipete 5 mL, 10 mL, 25 mL, LP Italiana, Italija

SevenCompact pH/Ion, Mettler-Toledo

Spektrofotometar Thermo Scientific Genesys 10 S UV/VIS, SAD

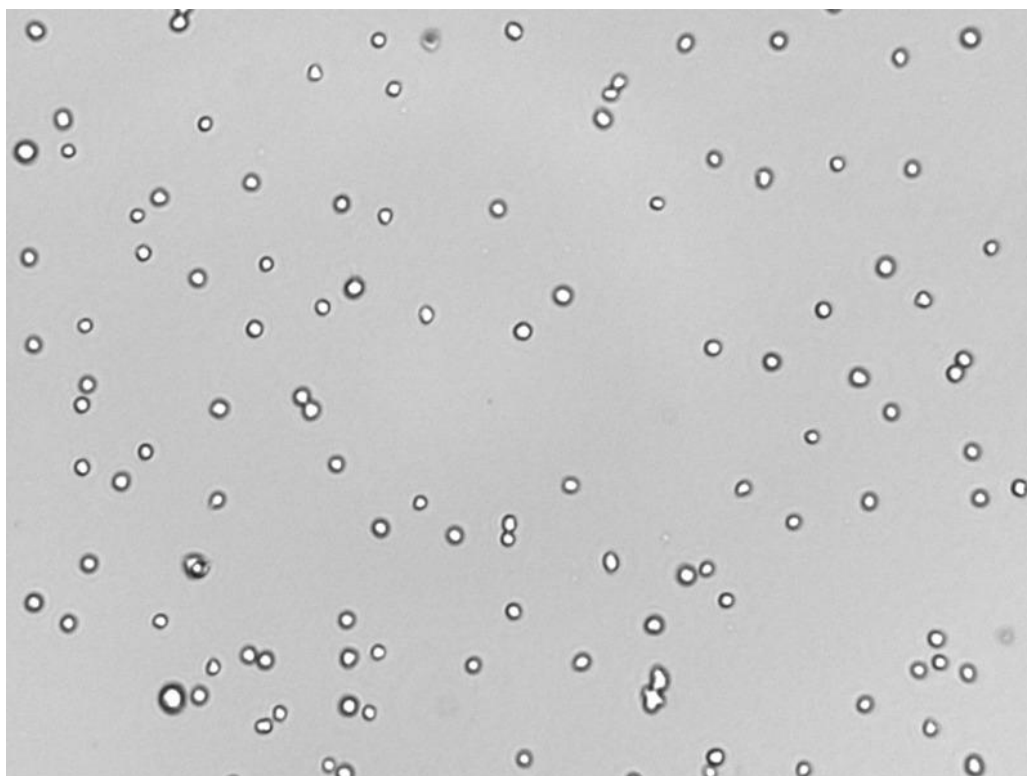
Sterilni filter CHROMAFIL Xtra RC (13 mm, 0,22 µm), Macherey-Nagel, Njemačka

Svjetlosni mikroskop AxioStar 1122-100, Carl Zeiss, Njemačka

Tresilica Biosan shaker PSU-10i, Biosan, Latvija

3.1.5. Stanična linija CHO DP-12

Tijekom izrade ovog diplomskog rada korištena je životinjska stanična linija fibroblasta ovarija kineskog hrčka, CHO DP-12 nabavljena iz *American Type Cell Collection* (ATTC) banke stanica kao adherentna stanična linija (slika 2) te naknadno prilagođena na suspenzijski rast u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Navedena stanična linija ima sposobnost proizvodnje rekombinantnog humanog monoklonskog protutijela, anti-IL8, koje je izotop IgG1.



Slika 2. Prikaz suspenzijske CHO stanične linije (McManus i sur., 2012)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Uzgoj CHO DP-12 stanica u suspenzijskoj kulturi s dodatkom proteina konoplje i prihranom supstrata

Uzgoj stanične linije CHO DP-12 započinje njihovim odmrzavanjem iz banke stanica gdje se čuvaju na temperaturi od $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ampula volumena 1 mL i koncentracije $1 \cdot 10^7$ stanica mL^{-1} odmrznuta je naglim uranjanjem u vodenu kupelj zagrijanu na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po odmrzavanju stanična suspenzija je prenesena u Erlenmeyerovu tikvicu za uzgoj volumena

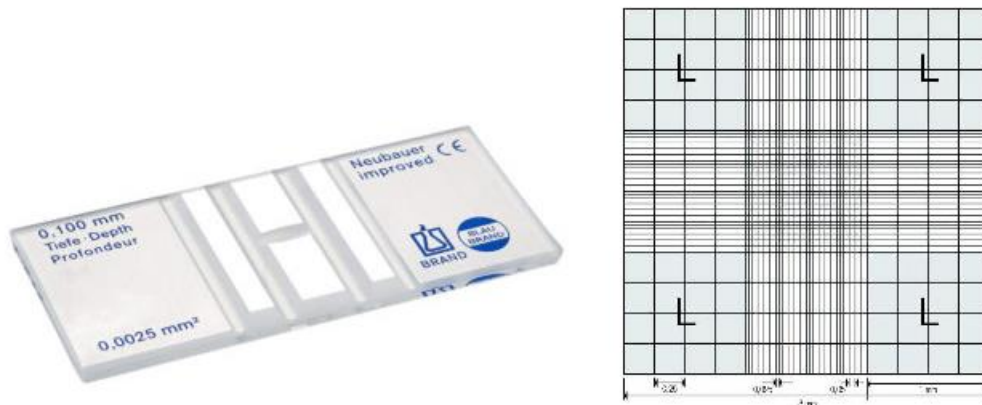
125 mL u koju je prethodno dodano 20 mL hranjivog medija. Stanice su uzgajane u kemijski definiranom hranjivom mediju *PowerCHO* s dodatkom rekombinantnog humanog inzulina (0,02 % v/v) koji služi za stimulaciju rasta i proliferacije stanica, metroteksata (0,01 % v/v) za amplifikaciju stanica, antibiotika (1 % v/v), smjese glutamina i alanina (4 % v/v) kao dodatnog izvora energije za stanice i *anti-clumping* reagensa (0,25 % v/v) koji onemogućava stvaranje staničnih agregata.

Nakon 4 precjepljivanja, stanice su nacijepljene u 12 centrifugalnih tuba od 50 mL u početnoj koncentraciji od $2,5 \cdot 10^5$ st mL⁻¹ u ukupnom volumenu od 6 mL. Stanice su uzgajane u *PowerCHO* hranjivom mediju uz dodatak ukupnih hidrolizata i frakcija proteina konoplje kako je navedeno u tablici 1. U dvije kontrolne tube stanice su uzgajane u mediju bez dodatka proteinskog hidrolizata, a u trećoj kontrolnoj tubi stanice su uzgajane u mediju uz prihranu valproičnom kiselinom 4. dana uzgoja.

Stanice su uzgajane na tresilici pri 160 rpm u inkubatoru na temperaturi od 37 °C i atmosferi 5 % CO₂ tijekom 10 dana, uz prihranu proteinskim hidrolizatima određenih uzoraka 4. i 6. dana uzgoja. Uzgoj je zaustavljen u trenutku kada je vijabilnost kulture pala ispod 80 %. Tijekom uzgoja svakodnevno su brojane žive i mrtve stanice u svrhu izračunavanja njihove koncentracije i vijabilnosti, te je izuziman alikvot hranjivog medija sa stanicama kako bi se pratila dinamika rasta kulture. Alikvot medija sa stanicama je centrifugiran na 15000 rpm tijekom 4 minute kako bi se uklonio stanični materijal, a supernatant je spremljen na -20 °C za daljnje postupke analize metabolizma i produktivnosti.

3.2.2. Određivanje broja stanica i vijabilnosti kulture metodom tripan-plavo

Dinamika rasta i vijabilnost kulture svih 12 uzoraka CHO DP-12 stanica praćena je svakodnevno tijekom 10 dana uzgoja pod svjetlosnim mikroskopom pomoću Neubauerove komorice (slika 3) i boje tripan-plavo. Kod mrtvih stanica dolazi do narušavanja integriteta membrane pa ona postaje propusna za boju radi čega su takve stanice pod mikroskopom plavo obojene, dok su žive stanice neobojene. Alikvot uzorka iz svake tube za uzgoj izuziman je u laminaru i stavljen u Eppendorf epruvetu te po potrebi razrijeđen prije miješanja s tripan-plavo bojom. Iz stanične suspenzije izuziman je volumen od 10 µL te pomiješan s 10 µL boje. Zatim je 10 µL tako pripremljenog uzorka nanoseno na Neubauerovu komoricu te su pod svjetlosnim mikroskopom prebrojane žive i nežive stanice u sva 4 velika kvadrata.



Slika 3. Neubauerova komorica (lijevo) (Anonymous 1, 2023) i kvadrati za brojanje stanica (desno) (Anonymous 2, 2023)

Koncentracija živih stanica u uzorku izračuna se prema formuli [1]:

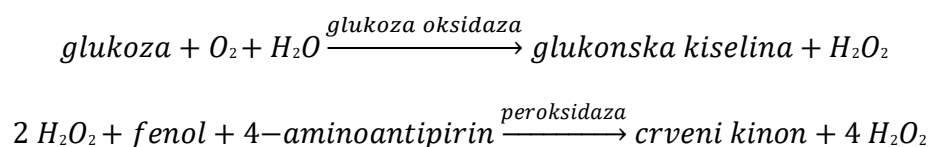
$$\text{broj stanica mL}^{-1} = \text{broj stanica u sva 4 kvadrata} \cdot 5000 \cdot \text{faktor rarjeđenja} \quad [1]$$

Vijabilnost kulture izračuna se uz pomoć slijedeće formule [2]:

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

3.2.3. Određivanje koncentracije glukoze u uzorcima hranjivog medija

Za određivanje glukoze u hranjivom mediju korišten je *Glucose-GOD-PAP* komercijalni set koji se zasniva na kolorimetrijskoj Trinderovoj metodi, a služi kao dijagnostički test za određivanje koncentracije glukoze u krvi. U prvom koraku glukoza iz uzorka se uz pomoć enzima glukoza-oksidadze (GOD) oksidira do glukonske kiseline i vodikova peroksida. Nastali vodikov peroksid se uz pomoć enzima peroksidaze u reakciji s kloro-4-fenolom i 4-aminoantipirinom (PAP) prevodi u kinonski spoj crvene boje. Intenzitet boje nastalog produkta proporcionalan je koncentraciji glukoze u uzorku, a određuje se uz pomoć spektrofotometra mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 500 nm.

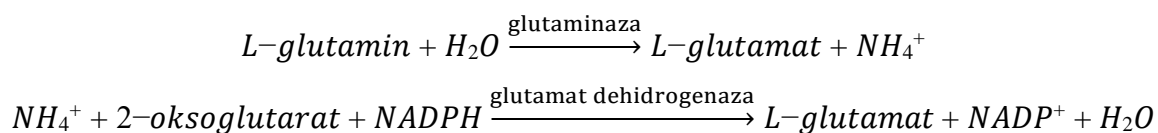


Mjerenja su provedena tako da se volumen od 5 μL uzorka hranjivog medija ili standarda glukoze ($c = 5,5 \text{ mmol L}^{-1}$) pomiješao s 500 μL *Glucose-GOD-PAP* reagensa. Slijepa proba se pripremila na način da je umjesto uzorka dodano 5 μL destilirane vode. Za svaki uzorak, kao i standard i slijepu probu rađena su 3 paralelna mjerenja. Dobivena otopina se resuspendirala te inkubirala pri temperaturi od 37 °C tijekom 10 minuta nakon čega se na spektrofotometru odredila apsorbancija. Koncentracija glukoze izračunata je prema formuli [3]:

$$c_{\text{glukoza}}[\text{mmol L}^{-1}] = \frac{A_{\text{uzorak}}}{A_{\text{standard}}} \cdot c_{\text{standard}} \cdot \text{faktor razrjeđenja} \quad [3]$$

3.2.5. Određivanje koncentracije amonijaka u uzorcima hranjivog medija

Koncentracija amonijaka u hranjivom mediju određena je pomoću *Megazyme L-Glutamine Ammonia Assay* kita. Spontanom razgradnjom L-glutamina u mediju nastaju L-glutamat i amonijevi ioni čija je prisutnost nepoželjna zbog njihove toksičnosti za stanicu. Ova metoda bazira se na enzimskoj reakciji pretvorbe NH_4^+ iona i 2-oksoglutarata pomoću glutamat dehidrogenaze uz oksidaciju koenzima NADPH u NADP^+ .



Koncentracija nastalog NADP^+ proporcionalna je koncentraciji amonijaka u uzorku i određuje se uz pomoć spektrofotometra mjerenjem smanjenja apsorbancije pri valnoj duljini od 340 nm uslijed potrošnje NADPH. Uzorci za mjerenje pripremljeni su prema uputama proizvođača prateći redosljed dodavanja. Pritom su volumeni svih otopina u protokolu umanjeni za $\frac{3}{4}$ kao što je prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Protokol za provedbu mjerenja koncentracije amonijaka

Otopine	Slijepa proba	Uzorak
Otopina 1	/	/
Uzorak	/	25 µL
Otopina 4	/	/
Promiješati, inkubirati 5 minuta na sobnoj temperaturi, zatim dodati:		
Destilirana voda	455 µL	430 µL
Otopina 2	75 µL	75 µL
Otopina 3	50 µL	50 µL
Promiješati, pričekati oko 4 min pa očitati apsorbanciju (A_1), zatim dodati:		
Otopina 5	5 µL	5 µL
Promiješati, pričekati oko 5 min pa očitati apsorbanciju (A_2)		

Koncentracija amonijaka konačno se izračunava prema formuli [5]:

$$C_{\text{amonijak}} [\text{mmol L}^{-1}] = \frac{V \cdot M}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta A_{\text{amonijak}} \cdot 58,72 \quad [5]$$

gdje je:

V – konačni volumen [mL]

M – molarna masa amonijaka [g mol^{-1}]

ϵ – molarni apsorpcijski koeficijent NADPH pri 340 nm = $6300 [\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}]$

d – debljina kivete = 1 [cm]

v – volumen uzorka [mL]

$$\Delta A_{\text{amonijak}} = (A_1 - A_2)_{\text{uzorak}} - (A_1 - A_2)_{\text{slijepa proba}}$$

3.2.6. Određivanje koncentracije monoklonskog protutijela IgG

Za određivanje koncentracije proizvedenog monoklonskog protutijela IgG korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) prema principu afinitetne kromatografije. Za razdvajanje molekula IgG od ostalih komponenti hranjivog medija korištena je Protein A kolona koja sadrži imobilizirani ligand s mogućnošću specifičnog i reverzibilnog vezanja imunoglobulina G preko njegove Fc regije teškog lanca. Prije stavljanja na kolonu uzorci su centrifugirani, a supernatanti su potom filtrirani kroz filtere pora 0,22 µm radi uklanjanja ostatka staničnog materijala. Na kolonu je injektirano 50 µL uzorka, a protok je tijekom 4,2 minute analize

održavan na 1,0 mL min⁻¹ pri temperaturi od 25 °C. Kao mobilne faze korišteni su 50 mM natrij-fosfatni pufer (pH = 7,53) za vezanje i 0,1 M limunska kiselina (pH = 2,74) za eluciju. Parametri razdvajanja protutijela na Protein A koloni djelovanjem različitih mobilnih faza prikazani su u tablici 4. Vezano protutijelo eluira se uslijed znatne promjene pH vrijednosti nakon dodatka limunske kiseline koja uzrokuje cijepanje interakcija između protutijela i liganda stacionarne faze. Eluirano protutijelo detektirano je pomoću UV/VIS detektora HPLC uređaja pri valnoj duljini od 280 nm. Pikovi kromatograma računalno su analizirani te je kvantifikacija provedena pomoću jednadžbe pravca baždarnog dijagrama.

Tablica 3. 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 (mL min ⁻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

3.2.7. Izračun procesnih parametara rasta CHO DP-12 stanične linije

Najveća specifična brzina rasta stanica (μ_{max})

Najveća specifična brzina rasta stanica u eksponencijalnoj fazi rasta šaržnog uzgoja s prihranom računa se prema jednadžbi [6]:

$$\mu_{max} = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt} \quad [6]$$

gdje je:

dN – povećanje broja stanica

dt – vremenski interval

N – broj stanica

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

$$\ln N = \ln N_0 + \mu(t-t_0) \quad [7]$$

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

$$\mu_{max} = \frac{\ln N - \ln N_0}{\Delta t} \quad [8]$$

gdje je:

N – broj stanica u 1 mL na kraju eksponencijalne faze

N₀ – broj stanica u 1 mL na početku eksponencijalne faze

Δt – trajanje eksponencijalne faze (dan)

Specifična produktivnost (Q_p)

$$Q_p = \frac{c}{\Delta t \cdot \Delta N} \quad [9]$$

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)

Volumetrijska produktivnost (V_p)

$$V_p = \frac{c}{t} \quad [10]$$

gdje je:

c – koncentracija protutijela IgG (mg L⁻¹)

t – vrijeme trajanja uzgoja (dan)

Relativna volumetrijska specifična produktivnost

$$IgG (\%) = \frac{V_p \text{ odnosno } Q_p (\text{uzorak})}{V_p \text{ odnosno } Q_p (\text{kontrola})} \quad [11]$$

3.2.8. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (\bar{x}) uzoraka u skupni:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [12]$$

s pripadajućim standardnim devijacijama (s):

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad [13]$$

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

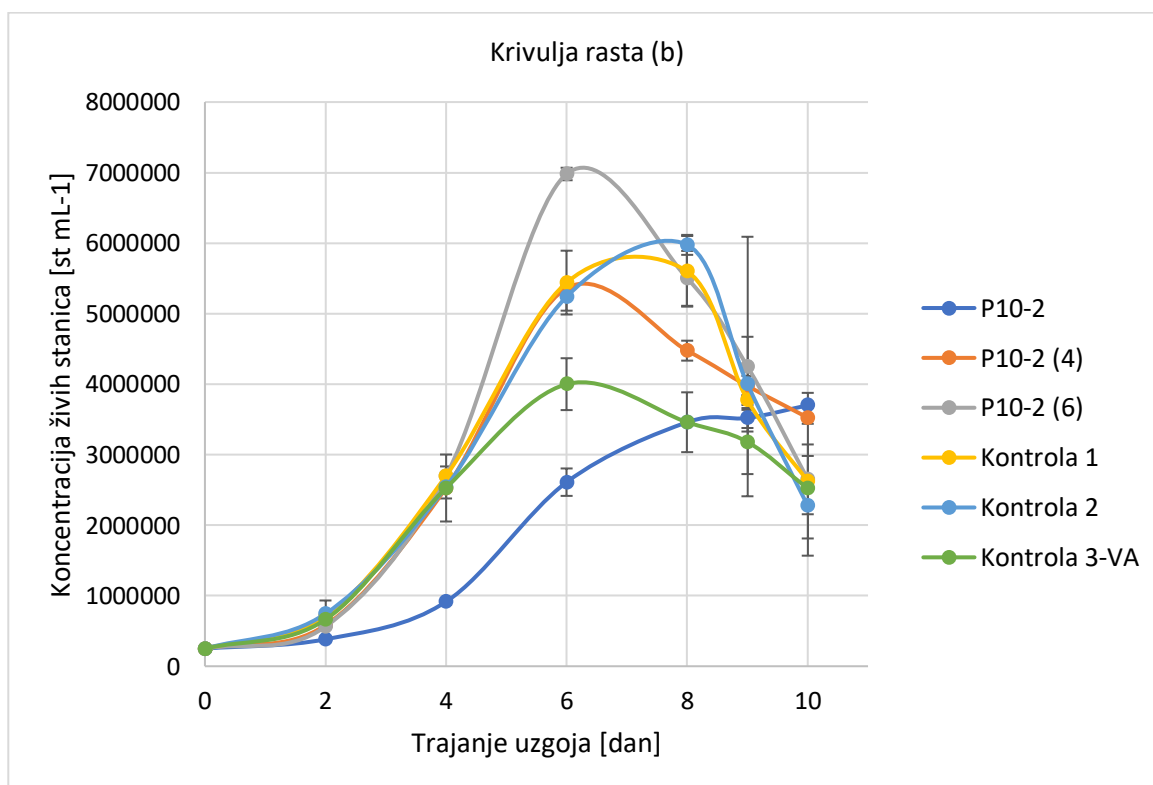
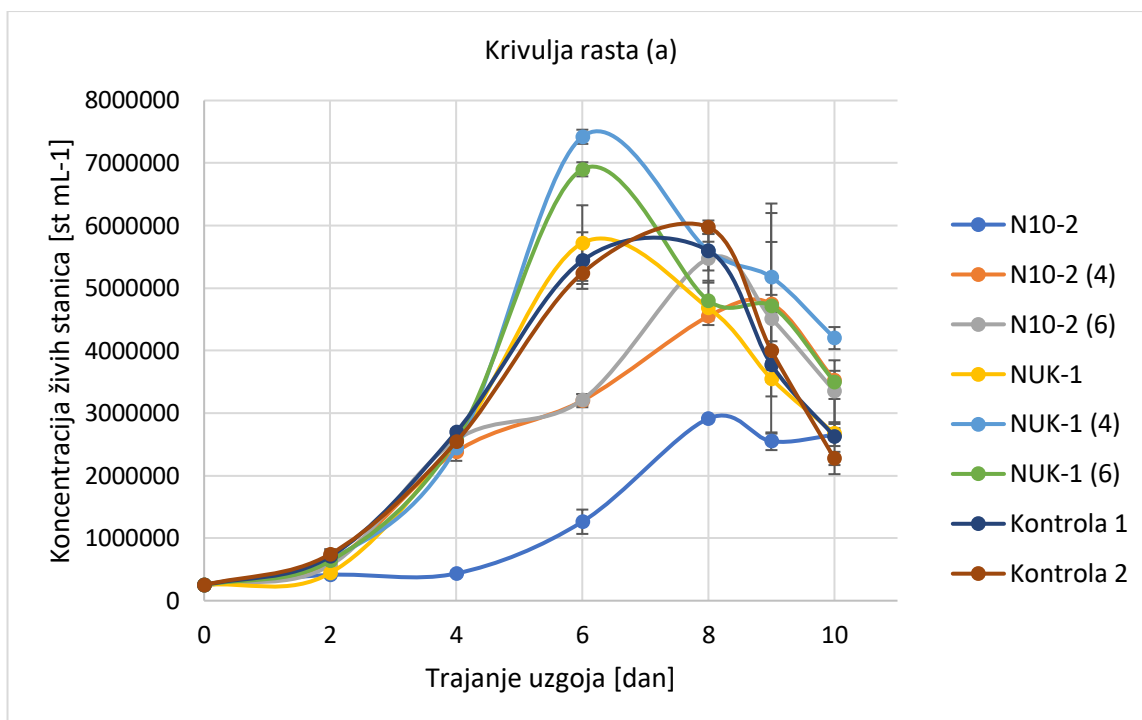
Kulture životinjskih stanica, prvenstveno CHO stanična linija, najčešće su primjenjivani sustav stanica domaćina za industrijsku proizvodnju rekombinantnih proteinskih terapeutika. CHO stanice sposobne su proizvoditi visokokvalitetne biološke lijekove koji sadrže posttranslacijske modifikacije nalik ljudskim u količinama mjerljivim u gramima. Međutim, procesi proizvodnje biofarmaceutika koji koriste stanice sisavaca još uvijek pate od ograničenja kao što su ograničen rast stanica, niska produktivnost i otpornost stanica na stres, kao i veći troškovi u usporedbi s ekspresijskim sustavima temeljenim na bakterijama i kvascima. Optimizacija medija kao najvažnije komponente u uzgoju stanica jedan je od pristupa na koji se fokusira velik broj nedavnih istraživanja. Kod uzgoja stanica sisavaca često nezaobilazan korak je suplementacija hranjivog medija životinjskim serumom koji iako predstavlja glavni izvor proteina, hormona i faktora rasta, zbog svojeg promjenjivog sastava otežava reproducibilnost proizvodnog postupka i povećava rizik od kontaminacije, dok način njegova dobivanja otvara etičke rasprave i značajno podiže cijenu proizvodnje te posljedično i samog proizvoda. Posljednjih nekoliko desetljeća veliki naponi ulažu se u razvoj tzv. *serum-free* medija i pronalazak proteinskih hidrolizata ne-životinjskog podrijetla s jednakim ili boljim utjecajem na proliferaciju i produktivnost stanica koji bi mogli zamijeniti serum. Biljni proteinski hidrolizati pokazali su se kao dobra alternativa serumu jer pozitivno utječu na rast i produktivnost životinjskih stanica kada su dodani u *serum-free* medij (Logarušić i sur., 2021; Verma i sur., 2020; Chun i sur., 2007; Farges-Haddani i sur., 2006). Osim toga biljni hidrolizati su zanimljivi i s ekonomskog gledišta s obzirom da se kao sirovine za njihovo dobivanje mogu koristiti otpadni biljni materijali i nusproizvodi prehrambene industrije što smanjuje njihovu cijenu.

U prijašnjim istraživanjima u sklopu projekta „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj (HRZZ IP-2016-06-3848)“ ispitivani su hidrolizati konoplje i njihove proteinske frakcije dodavane u medij u različitim koncentracijama. Nastavno na dosadašnje rezultate za ovaj rad su odabrane 3 različite frakcije hidrolizata konoplje (tablica 1), koje su pokazale bolji utjecaj na rast i/ili produktivnost CHO DP-12 stanične linije. Cilj ovoga rada bio je ispitati učinak prihrane proteinskim hidrolizatima konoplje na rast, vijabilnost, metabolizam i produktivnost CHO DP-12 stanica tijekom šaržnog uzgoja u suspenziji u *serum-free* mediju. Naime, ranijim istraživanjima ustanovljeno je da dodatak frakcija konopljina proteinskog hidrolizata (<10

kDa) dobivenih enzimima Neutraza i Protamex, otpočeka (šaržnog) uzgoja, djeluje gotovo citostatički, tj. vrlo značajno usporava stanični rast. Međutim unatoč sporom rastu, s kasnom ili gotovo bez eksponencijalne faze, stanice su se iskazale visokom produktivnošću, koje je za više od 10 % premašilo kontrolne uvjete uzgoja, tj. kulture bez dodanih hidrolizata i frakcija (Logarušić, 2023). Iz tog razloga ispitano je djelovanje navedenih frakcija konoplje kao naknadni dodatak mediju, tj. prihrana stanica kad su već u fazi logaritamskog rasta. Time bi se uspjelo dobiti značajnu količinu stanične biomase, čiji bi se rast zatim inhibirao djelovanjem frakcija, a stanice bi, prema pretpostavci, nastavile proizvoditi IgG. U ovom radu za prihranu su korištene navedene frakcije (<10 kDa), a kao kontrolni uvjeti postavljeni su prihrana ukupnim (nefrakcioniranim) hidrolizatima te medij bez ikakvih dodataka. Valproična kiselina služila je kao svojevrsna pozitivna kontrola, s obzirom da ona ima potvrđeno sličan učinak na proizvodne CHO stanice. Rast i vijabilnost stanica praćeni su svakodnevno brojanjem stanica metodom tripan-plavo, dok je utjecaj dodataka hidrolizata na metabolizam stanične linije istražen praćenjem potrošnje glukoze odnosno nastanka amonijaka, kao jednog od glavnih nusprodukata staničnog rasta. Koncentracije metabolita određivane su u razmacima uz pomoć komercijalnih enzimskih kitova. Uspješnost proizvodnje rekombinantnog humanog protutijela određena je mjerenjem koncentracije nastalog produkta uz pomoć Protein A kolone HPLC metodom u uzorcima na kraju uzgoja.

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

Hidrolizati konoplje i njegove frakcije korišteni u ovom radu prethodno su pripremljeni u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu iz brašna uljne pogače konoplje postupkom hidrolize koristeći dvije komercijalne endopeptidaze: Neutraza (N) i Protamex (P). CHO DP-12 stanice uzgajane su u suspenziji tijekom 10 dana, odnosno do pada vijabilnosti ispod 80 %. Odabrani proteinski hidrolizati konoplje dodavani su u tube za uzgoj 0. dana uzgoja (šaržni uzgoj) odnosno 4. i 6. dana uzgoja (šaržni uzgoj s prihranom) kako je prikazano u tablici 1. U dvije kontrolne tube stanice su uzgajane u hranjivom mediju bez dodatka proteinskih hidrolizata, dok je u trećoj kontrolnoj tubi uzgoj proveden uz dodatak valproične kiseline 4. dan uzgoja. Dinamika rasta prikazana je pomoću krivulja rasta (slika 4), koje prikazuju ovisnost koncentracije živih stanica o vremenu trajanja uzgoja.



Slika 4. Krivulja rasta CHO DP-12 stanica tijekom uzgoja u serum-free hranjivom mediju za 2 kontrolna uzorka (Kontrola 1 i Kontrola 2), uzorak s dodatkom valproične kiseline i 9 ispitivanih uzoraka u koje su dodani proteinski hidrolizati konoplje dobiveni hidrolizom uz pomoć enzima Neutraza (a) i Protamex (b) i njihove frakcije različitih molarnih masa (UK; <math><10\text{ kDa}</math>), koncentracija (

Na krivulji rasta (slika 4) može se uočiti da faza prilagodbe kod svih uzoraka, osim uzorka N10-2, traje 2 dana nakon čega stanice ulaze u eksponencijalnu fazu rasta. Eksponencijalna faza je u prosjeku trajala između 4 do 6 dana nakon čega su stanice ušle u stacionarnu fazu pa fazu odumiranja. Kod većine uzoraka nema razlike u rastu tijekom prvih četiri dana uzgoja, nakon čega neki uzorci doživljavaju kraj eksponencijalne faze 6. dan rasta, a neki završavaju eksponencijalni rast 8. dan uzgoja. Izuzetak čine uzorci N10-2 i P10-2 koji ne prate navedeni trend rasta već pokazuju puno slabiji rast od kontrolnih uzoraka, što je kod uzorka N10-2 vidljivo i odgođenim ulaskom u eksponencijalnu fazu rasta koji se desio tek 4. dana uzgoja. Osim toga, kod uzorka P10-2 zamijećeno je da po završetku eksponencijalne faze 8. dana uzgoja, stanice prelaze u stacionarnu fazu u kojoj se zadržavaju sve do završetka uzgoja, tj. nije vidljiv pad broja stanica. Najslabije kontrolnim uzorcima, uzgajanim bez dodatka proteinskih hidrolizata konoplje, rasli su uzorci NUK-1, N10-2 (6) i P10-2 (4). Kod uzorka N10-2, N10-2 (4) i N10-2 (6) primjećuje se evidentna promjena u dinamici rasta stanica nakon prihrane proteinskim hidrolizatom ovisno o vremenu njegovog dodatka u hranjivi medij. Frakcija proteinskog hidrolizata konoplje molarne mase <10 kDa dobivena enzimskom hidrolizom uz endopeptidazu Neutraza dodana u hranjivi medij u koncentraciji od 2 g L⁻¹ pokazala je jači učinak na usporavanje rasta CHO DP-12 stanica u uzorku N10-2 u koji je dodana na samom početku uzgoja u odnosu na uzorke N10-2 (4) i N10-2 (6) u koje je proteinski hidrolizat dodan naknadno u obliku prihrane. Nadalje, usporedbom krivulja rasta uzoraka N10-2 (4) i N10-2 (6) vidljivo je da je navedena frakcija proteinskog hidrolizata slabije djelovanje u vidu usporavanja rasta stanica pokazala u uzorku N10-2 (4) u kojem je u hranjivi medij dodana 4. dan uzgoja, a najslabije u uzorku N10-2 (6) u kojem je u hranjivi medij dodana najkasnije odnosno tek 6. dan uzgoja. Slično, usporedbom uzoraka P10-2, P10-2 (4) i P10-2 (6) u koje je frakcija proteinskog hidrolizata konoplje molarne mase <10 kDa dobivena enzimskom hidrolizom endopeptidazom Protamex dodana u hranjivi medij u koncentraciji od 2 g L⁻¹ primijećeno je da je efekt usporavanja rasta stanica jači u slučajevima ranijeg dodatka proteinskog hidrolizata u hranjivi medij. Tako je među navedenim uzorcima najveći rast stanica zabilježen u uzorku P10-2 (6), u uzorku P10-2 (4) zabilježen je prosječan rast uspoređan kontrolnim uzorcima uzgajanih bez dodatka hidrolizata, a najmanji rast stanica ostvarile su stanice u uzorku P10-2 u kojem su stanice uzgajane šaržno uz dodatak proteinskog hidrolizata od samog početka uzgoja. Dodatak ovog proteinskog hidrolizata konoplje 6. dan uzgoja, dapače, nije djelovao inhibitorno na stanice već je pospješio njihov rast pa je uzorak P10-2 (6) dostigao veću maksimalnu koncentraciju stanica od kontrolnih uzoraka 1 i 2. Primijećeno je da dodatak ukupnog proteinskog hidrolizata konoplje,

dobivenog hidrolizom uz pomoć enzima Neutraza, u koncentraciji od 0,5 g L⁻¹ pospješuje rast CHO DP-12 stanica kada je dodan u obliku prihrane tijekom ili krajem eksponencijalne faze rasta. Pritom su, zanimljivo, najveći rast stanice ostvarile u uzorku NUK-1 (4) odnosno kada je proteinski hidrolizat dodan 4. dan uzgoja. Najveći rast zamijećen je kod uzoraka NUK-1 (4), NUK-1 (6) i P10-2 (6), koji su dosegli 15 % veće maksimalne koncentracije stanica od kontrolnih uzoraka, nakon čega je uslijedilo smanjenje broja stanica. Pritom je najveći pad broja stanica zamijećen kod uzorka P10-2 (6), dok je kod uzoraka NUK-1 (4) i NUK-1 (6) nakon prvotnog pada vidljivo usporavanje smanjenja broja stanica te naposljetku ponovno nagli pad broja stanica. Uzorci N10-2, P10-2 i Kontrola 3-VA pokazali su najslabiji rast u odnosu na kontrolne uzorke uzgajane bez dodatka hidrolizata proteina konoplje što znači da je u tim uzorcima kao posljedica djelovanja hidrolizata proteina konoplje, odnosno valproične kiseline, došlo do najzamjetnijeg usporavanja rasta stanica. Da je inhibicija rasta uzrokovana upravo djelovanjem proteinskih hidrolizata, odnosno valproične kiseline, ukazuje i činjenica da je do usporavanja rasta došlo u trenutku dodatka navedenih supstanci, koji su u uzorke N10-2 i P10-2 dodani na samom početku uzgoja, a u uzorak Kontrola 3-VA 4. dan uzgoja, što je vidljivo na krivulji rasta.

Tablica 4. Vrijednosti maksimalnih specifičnih brzina rasta (μ_{\max}) za pojedine uzorke

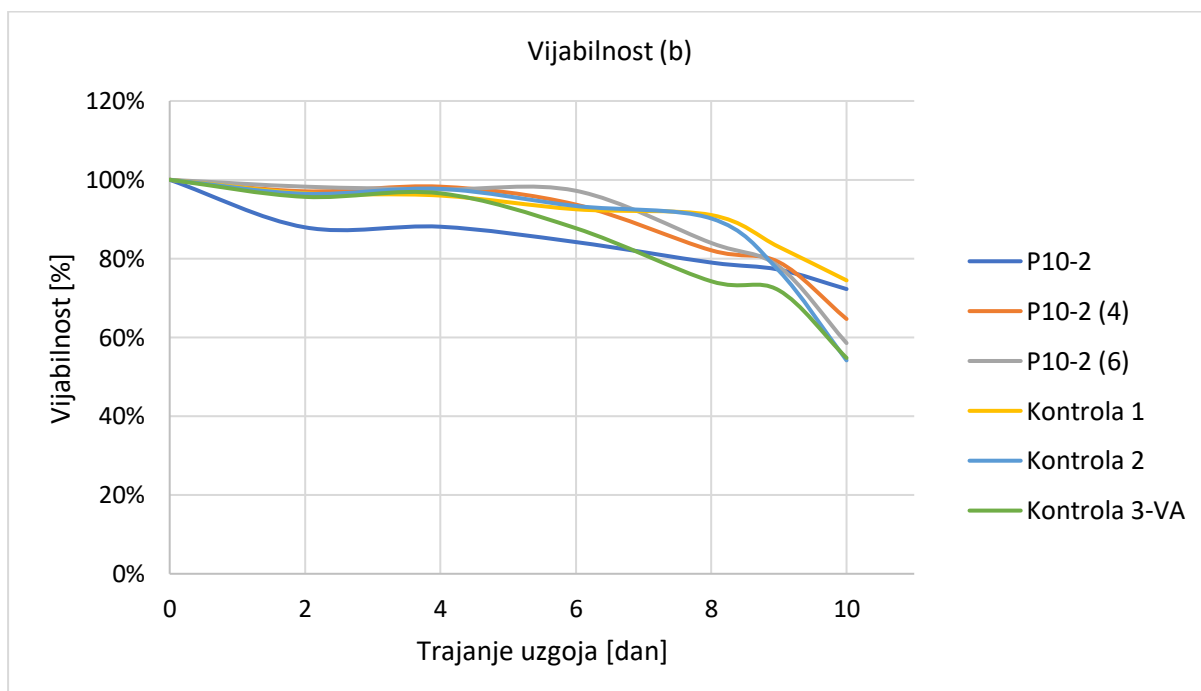
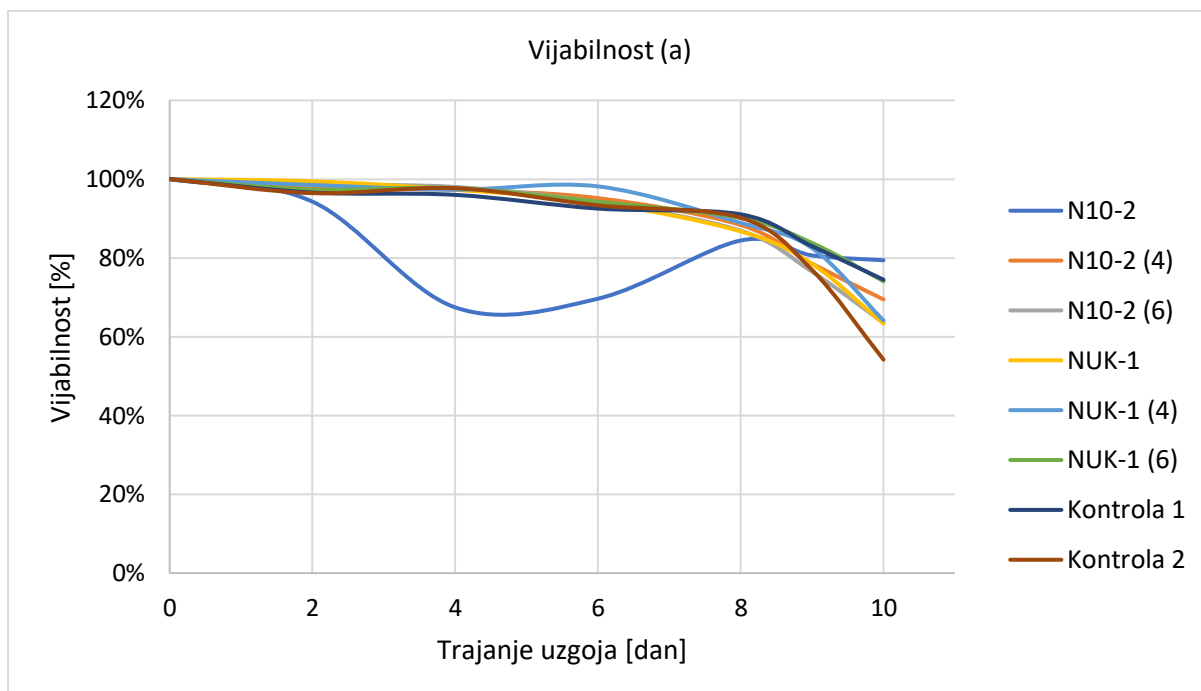
Uzorak	μ_{\max} (dan ⁻¹)
N10-2	0,48
N10-2 (4)	0,33
N10-2 (6)	0,38
NUK-1	0,64
NUK-1 (4)	0,61
NUK-1 (6)	0,60
P10-2	0,37
P10-2 (4)	0,55
P10-2 (6)	0,63
Kontrola 1	0,51
Kontrola 2	0,49
Kontrola 3-VA	0,45

Gledajući eksponencijalnu fazu rasta za svaki uzorak, iz tablice 4 vidljivo je da uzorci N10-2, P10-2 (4) i Kontrola 3-VA imaju maksimalnu specifičnu brzinu rasta najslabiju kontrolnim uzorcima u kojima je uzgoj tekao bez dodatka proteinskih hidrolizata, ali su im

maksimalne koncentracije stanica niže od kontrolnih uzoraka, što bi se u slučaju uzorka N10-2 moglo objasniti kasnijim ulaskom stanica u eksponencijalnu fazu rasta i kraćim trajanjem eksponencijalne faze rasta. Pritom je uzorak N10-2 tijekom cijelog vremena uzgoja pokazivao i manju vijabilnost stanica (slika 5a) od kontrolnih uzoraka, što ukazuje na to da su stanice kontinuirano tijekom eksponencijalne i stacionarne faze rasta veći dio energije koristile za proizvodnju protutijela IgG, a ne na rast i razmnožavanje. Takvo obrazloženje slaže se s dobivenim rezultatima za produktivnost (slika 8). Značajno negativan utjecaj na maksimalnu specifičnu brzinu rasta vidljiv je u uzorcima N10-2 (4), N10-2 (6) i P10-2 u kojima su stanice rasle daleko manjom maksimalnom specifičnom brzinom rasta nego stanice kontrolnih uzoraka 1 i 2. Pritom je kod uzorka P10-2 od samog početka uzgoja prisutna zamjetno manja iako relativno stabilna vijabilnost stanica. Razlog tome može biti da su, kao i kod uzorka N10-2, zbog utjecaja proteinskog hidrolizata, stanice potrošnju energije većinski usmjerile na produkciju protutijela, što je u skladu s dobivenim rezultatima produktivnosti stanica (slika 8). Najveće maksimalne specifične brzine rasta zabilježene su kod uzoraka NUK-1, NUK-1 (4), NUK-1 (6) i P10-2 (6), što je i očekivano budući su navedeni uzorci ostvarili i najveći rast stanica. Iznimka je uzorak NUK-1 kod kojeg je zabilježen samo prosječan rast stanica.

Promatrajući krivulje vijabilnosti stanica tijekom uzgoja (slika 5), vidljivo je da kod većine uzoraka vijabilnost počinje opadati 6. dan uzgoja kada u većini slučajeva završava i eksponencijalni rast stanica. Nagli pad vijabilnosti uzoraka događa se 9. dan uzgoja, kada vijabilnost svih uzoraka pada ispod 80 %, što označava završetak uzgoja CHO DP-12 stanica. Nagli pad vijabilnosti uzorka N10-2 2. dan uzgoja može se objasniti lošijom prilagodbom stanica na novu okolinu odnosno duljim trajanjem lag faze rasta. Vijabilnost tog uzorka počinje rasti tek 4. dan uzgoja, kada stanice konačno ulaze u eksponencijalnu fazu rasta, i nastavlja rasti sve do završetka eksponencijalne faze 8. dana uzgoja nakon čega stanice polagano počinju odumirati i dolazi do pada vijabilnosti kulture. Još jednu iznimku predstavlja uzorak P10-2 koji počinje doživljavati pad vijabilnost odmah po naciepljivanju stanica u hranjivi medij za uzgoj koji traje do 2. dana uzgoja, kada se vijabilnost stanica ustaljuje na 85 – 90 % sve do 5. dana uzgoja kada počinje umjereno opadati kako bi na posljetku spala ispod 80 % na 7. dan uzgoja. Moguće je da je do takvog trenda došlo jer su stanice doživjele šok uzrokovan promjenom okoline prilikom naciepljivanja u hranjivi medij, a s obzirom na nisku maksimalnu specifičnu brzinu rasta (tablica 4) i relativno dobre rezultate

produktivnosti (slika 8), vijabilnost tijekom uzgoja nije nadoknađena jer je stanica potencijalno veći udio energije trošila na proizvodnju protutijela.

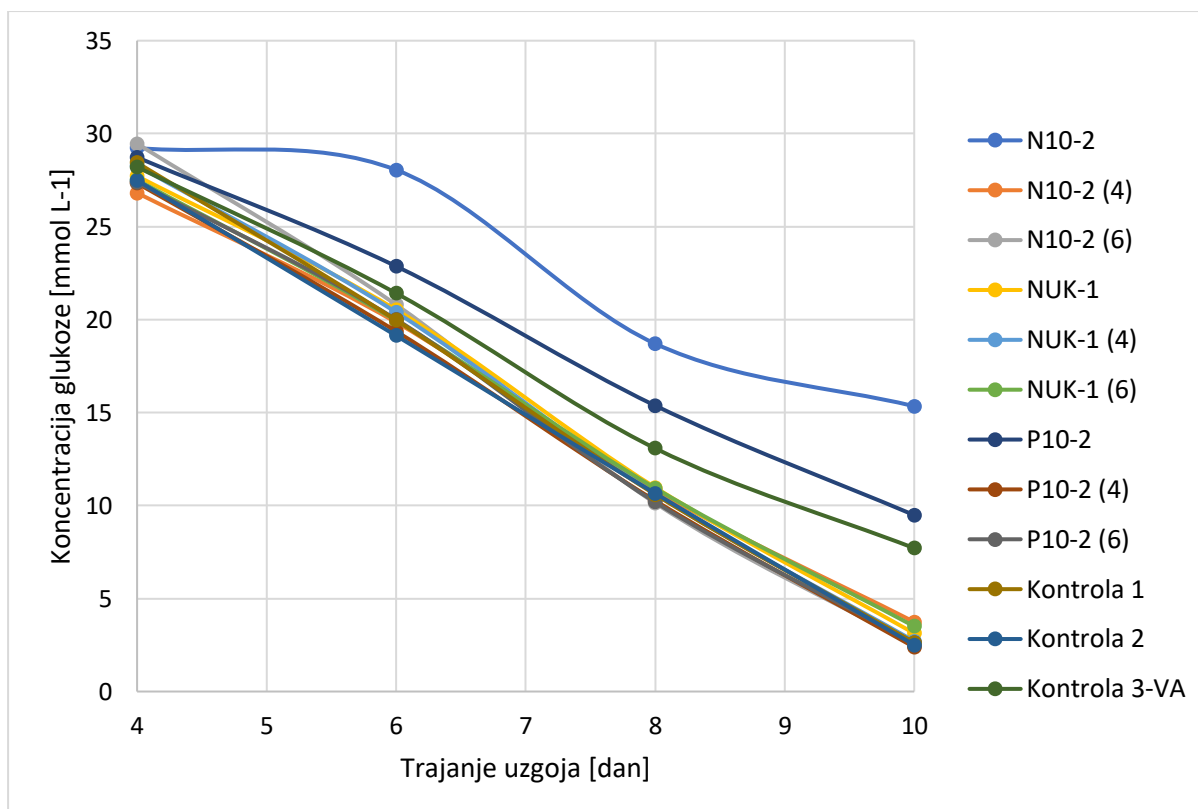


Slika 5. Grafički prikaz vijabilnosti stanica CHO DP-12 tijekom 10 dana uzgoja za uzorke s dodatkom proteinskih hidrolizata konoplje dobivenih uz pomoć enzima Neutraza (a) i Proteamex (b)

Zanimljiv je i uzorak Kontrola 3-VA kod kojeg je pad vijabilnosti zamijećen već 5. dan uzgoja, dok su se stanice još uvijek nalazile u eksponencijalnoj fazi rasta i odmah nakon dodatka valproične kiseline, i nastavio se sve do završetka uzgoja, prelazeći granicu od 80 % vijabilnosti na 7. dan uzgoja. Takvo ponašanje stanica je i očekivano budući je u prijašnjim istraživanjima dokazano da valproična kiselina usporava rast CHO stanica, te pospješuje proizvodnju sekundarnih metabolita, u ovom slučaju imunoglobulina G. Međutim, pokazano je da valproična kiselina također djeluje toksično na CHO stanice te uzrokuje pad vijabilnosti i gustoće stanica (Yang i sur., 2014).

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

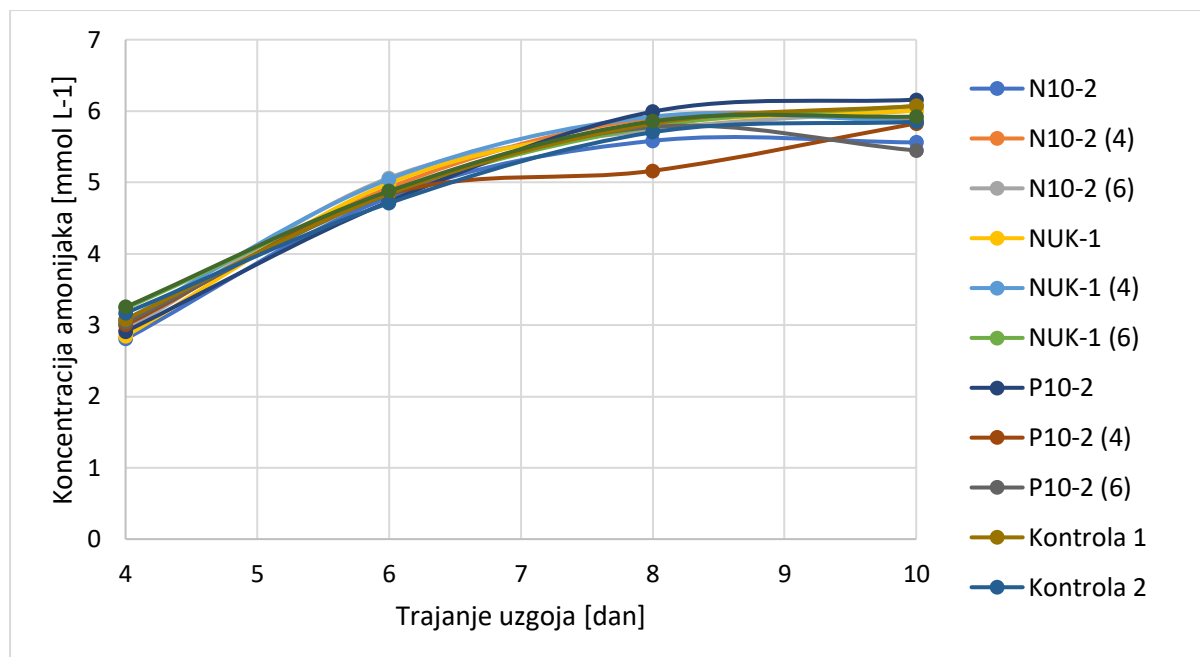
Prilikom izrade ovog diplomskog rada istražen je utjecaj dodatka proteinskih hidrolizata konoplje u hranjivi medij na metabolizam stanica CHO DP-12 tijekom šaržnog uzgoja i šaržnog uzgoja s prihranom proteinskim hidrolizatima. Postoje razni načini poboljšanja staničnog rasta, produljenja vijabilnosti i povećanja prinosa proizvoda, među kojima su optimizacija hranjivog medija i procesnih parametara te korištenje metoda genetičkog inženjerstva u svrhu identifikacije transkripcijskih aktivatora odnosno inhibitora proteina od interesa (Fischer i sur., 2015). Poznavanje metaboličkih potreba stanica tijekom njihovog uzgoja od iznimne je važnosti s obzirom da potrošnja supstrata i nastanak nusprodukata utječu na akumulaciju biomase, zadovoljenje energetske potrebe stanice, održivost kulture i specifičnu produktivnost. Uzgoj CHO stanične linije karakterizira brza potrošnja primarnih izvora ugljika i energije, koja ima za posljedicu nakupljanje laktata i amonijaka u hranjivom mediju. Akumulacija ovih nusprodukata metabolizma uzrokuje promjene sastava hranjivog medija i izaziva inhibiciju rasta i produktivnosti stanica (Kelly i sur., 2018). Kako bi dobili uvid u ponašanje CHO DP-12 stanica tijekom uzgoja, praćena je potrošnja glukoze (slika 6) te nakupljanje amonijaka (slika 7) od 4. do 10. dana uzgoja.



Slika 6. Prikaz promjene koncentracije glukoze u SF hranjivom mediju od 4. do 10. dana uzgoja CHO DP-12 stanica

Prema slici 6 vidljivo je da svi uzorci prate isti trend, odnosno da koncentracija glukoze pada s vremenom trajanja uzgoja jer ju stanice troše za rast i staničnu diobu, kao i proizvodnju staničnih produkata. Većina uzoraka pokazuje sličnu potrošnju glukoze kao kontrolni uzorci 1 i 2, izuzev uzoraka N10-2, P10-2 i Kontrola 3-VA, koji su pokazali nešto slabiju potrošnju glukoze u odnosu na ostale uzorke, što je u skladu sa znatno manjim porastom u koncentraciji stanica kod tih uzoraka vidljivim na krivulji rasta (slika 4). Odgođen početak rasta kod uzorka N10-2 rezultirao je kasnijim ulaskom u eksponencijalnu fazu što se odrazilo i na potrošnju glukoze čija je koncentracija krenula intenzivnije padati tek nakon 6. dana uzgoja te potom usporila nakon 8. dana uzgoja kada su stanice završile s eksponencijalnim rastom. U uzorcima N10-2, P10-2 i Kontrola 3-VA također su izmjerene i najviše koncentracije glukoze posljednjeg dana uzgoja, koje se mogu objasniti ranijim padom vijabilnosti ispod 80 % kod uzoraka P10-2 i Kontrola 3-VA zbog kojeg stanice jednostavno nisu imale vremena potrošiti jednaku količinu glukoze kao u ostalim uzorcima. S druge strane, uz visoku koncentraciju glukoze 10. dana uzgoja, u uzorku N10-2 prisutna je najveća vijabilnost stanica (79 %) koja ukazuje da su stanice ovog uzorka potencijalno mogle preživjeti i dulji period uzgoja da on nije bio prekinut 10. dana zbog pada vijabilnosti u

ostalim uzorcima. Takvi rezultati ukazuju da prisutnost hidrolizata u hranjivom mediju za uzgoj u stanicama može pobuditi anti-apoptotska svojstva i produžiti trajanje uzgoja, što potencijalno može dovesti do većih prinosa proizvoda (Franek i sur., 2000).



Slika 7. Prikaz promjene koncentracije amonijaka u SF hranjivom mediju od 4. do 10. dana uzgoja CHO DP-12 stanica

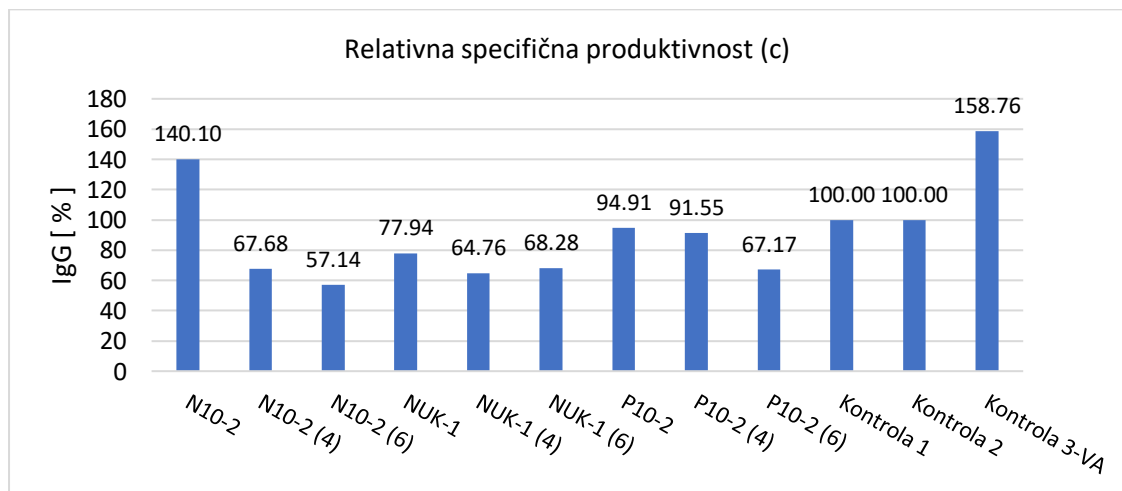
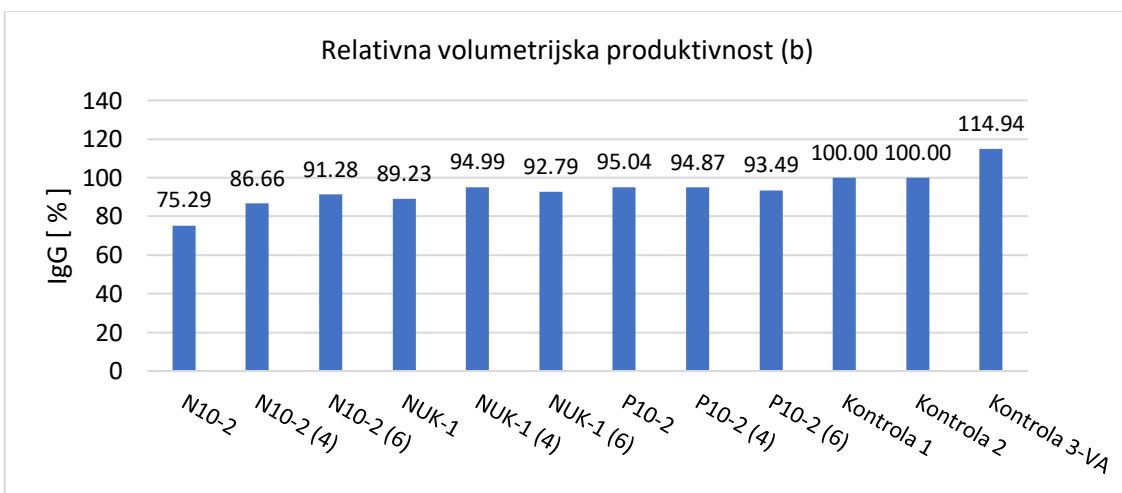
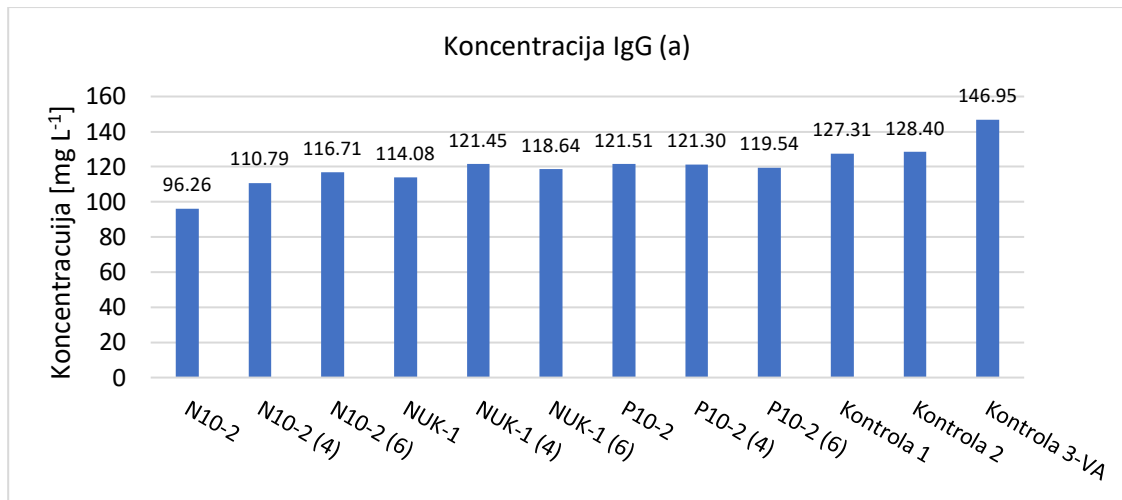
Na slici 7 vidljivo je da je koncentracija amonijaka rasla od 4. do 8. dana uzgoja nakon čega dolazi do stagnacije. Koncentracija amonijaka prestaje rasti jer stanice tada u većini uzoraka prestaju s eksponencijalnim rastom i ulaze u stacionarnu fazu, koju slijedi faza odumiranja. Sve krivulje prate isti trend osim uzorka P10-2 (4) u kojemu koncentracija amonijaka stagnira od 6. do 8. dana, nakon čega se javlja ponovni rast. Koncentracija amonijaka na kraju uzgoja u navedenom uzorku, međutim, ne nadmašuje koncentracije dosegnute u ostalim uzorcima. Blagi pad koncentracije amonijaka na kraju uzgoja vidljiv je u uzorcima N10-2 i P10-2 (6), što nije u skladu s literaturom. Do takvih rezultata moglo je doći zbog nepreciznog mjerenja, malog broja izvedenih paralela ili loše kvalitete kita za mjerenje. Prema literaturnim navodima, amonijak ima negativan utjecaj na stanice u koncentraciji od samo 2 – 10 mmol L⁻¹. Naime, u koncentraciji od 2 mmol L⁻¹ djeluje inhibitorno na proliferaciju stanica, a u koncentraciji od 5 mmol L⁻¹ inhibira i produktivnost staničnih linija (Freund i Croughan, 2018; Wagner, 1997). Nakon 6. dana uzgoja koncentracije amonijaka u svim uzorcima popele su se iznad 5 mmol L⁻¹, što je negativno utjecalo na stanični rast, vidljivo prema naglom padu vijabilnosti nakon 6. dana uzgoja (slika 5).

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

S obzirom da je u ovome radu korištena CHO DP-12 stanična linija koja ima svojstvo proizvodnje rekombinantnog humanog monoklonskog protutijela anti IL-8, izotop IgG1, osim utjecaja proteinskih hidrolizata konoplje na rast i metabolizam stanica, pratio se i njihov utjecaj na produktivnost. Produktivnost stanične linije određivana je mjerenjem koncentracije proizvedenog protutijela u uzorcima posljednjeg, odnosno 10. dana uzgoja. Rezultati mjerenja su obrađeni i grafički prikazani u obliku koncentracije IgG (slika 8a), relativne volumetrijske produktivnosti (slika 8b) i relativne specifične produktivnosti (slika 8c), na način da su relativne vrijednosti iskazane kao produktivnost uzoraka u koje su dodani hidrolizati ili valproična kiselina u odnosu na srednju vrijednost produktivnosti kontrolnih uzoraka 1 i 2, koji su uzgajani samo u SF hranjivom mediju. Relativna volumetrijska produktivnost govori koliko je protutijela u određenom uzorku proizvedeno po volumenu medija i danu, dok relativna specifična produktivnost služi za kvantifikaciju brzine ekspresije protutijela po stanici i jedinici vremena.

Iz prikazanih rezultata (slika 8a) vidljivo je kako je daleko najveća koncentracija protutijela proizvedena u uzorku Kontrola 3-VA, u kojemu su stanice uzgajane uz prihranu valproičnom kiselinom. Zanimljivo, uzorak Kontrola 3-VA također je postigao najviše vrijednosti relativne volumetrijske (slika 8b) i relativne specifične (slika 8c) produktivnosti. Naime, valproična kiselina, kao što je već dokazano, djeluje izrazito pozitivno na produktivnost životinjskih kultura pa su ovakvi rezultati i očekivani (Yang i sur., 2014). Iza njega slijede kontrolni uzorci 1 i 2 s nešto nižom koncentracijom proizvedenog protutijela, dok su svi uzorci koji su sadržavali proteinske hidrolizate konoplje pokazali manju produktivnost u odnosu na kontrole. Kontrolni uzorci 1 i 2, kao i uzorak koji sadrži valproičnu kiselinu, nadmašuju ostale uzorke ne samo prema titru proizvedenog protutijela, već i prema relativnoj volumetrijskoj i relativnoj specifičnoj produktivnosti. Iznimku čini uzorak N10-2, koji se istaknuo s izrazito visokom relativnom specifičnom produktivnošću, čak 40 % većom od kontrolnih uzoraka (slika 8c). Naime, navedeni uzorak najslabije je rastao tijekom cijelog uzgoja (slika 4a) te je, od ostalih uzoraka, odskakao i prema podacima vijabilnosti (slika 5a) i staničnog metabolizma (slika 6). Unatoč tome, visoka relativna specifična produktivnost ovog uzorka ukazuje na to da frakcija hidrolizata konoplje molarne mase <10 kDa dobivena hidrolizom proteolitičkim enzimom Neutraza u koncentraciji od 2 g L⁻¹ inhibira rast stanica i odgađa ulazak stanica eksponencijalnu fazu rasta, no promovira

proizvodnju sekundarnih metabolita što je već i pokazano u prethodnim ispitivanjima navedene frakcije proteinskog hidrolizata (Đurđević, 2021). Moguće je da je dodatak navedene frakcije uzrokovao preusmjeravanje staničnog metabolizma na nastanak produkta zbog čega su stanice manje energije trošile na rast i diobu stanica. Očekivalo bi se da će koncentracije imunoglobulina G biti najveće u uzorcima NUK-1 (4), NUK-1 (6) i P10-2 (6) s obzirom da su u ovim uzorcima zabilježene i najveće koncentracije biomase, međutim to nije bio slučaj. Premda su navedeni uzorci pokazali relativno visoke vrijednosti relativne volumetrijske produktivnosti, u odnosu na ostale uzorke koji su sadržavali hidrolizate, njihove relativne specifične produktivnosti bile su vrlo niske. U usporedbi s kontrolnim uzorcima najbližnju produktivnost pokazali su uzorci P10-2 i P10-2 (4), koji su kontrolnim uzorcima 1 i 2 bili slični prema titru nastalog produkta, kao i prema relativnoj volumetrijskoj i relativnoj specifičnoj produktivnosti. Usporedbom vrijednosti relativne specifične produktivnosti izmjerenih u uzorcima uzgajanim šaržno s onima koji su uzgajani s prihranom hidrolizatima konoplje (slika 8c), vidljivo je da su veće relativne specifične produktivnosti dostignute šaržnim uzgojem. Iz toga je moguće zaključiti da proteinski hidrolizati konoplje pospješuju produktivnost CHO DP-12 stanične linije kada su dodani u SF medij na samom početku uzgoja.



Slika 8. Prikaz koncentracije protutijela IgG (a), relativne volumetrijske (b) i relativne specifične (c) produktivnosti CHO DP-12 stanica uzgajanih u SF hranjivom mediju s dodatkom proteinskih hidrolizata konoplje tijekom šaržnog uzgoja i šaržnog uzgoja s prihranom

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Peptidna frakcija <10 kDa proteinskog hidrolizata konoplje, dobivena enzimom Neutraza, dodana u koncentraciji 2 g L⁻¹, ima negativno djelovanje na rast CHO DP-12 stanica bilo kao dodatak na početku šaržnog uzgoja ili kao odgođena prihrana kod šaržnog uzgoja.
2. Proteinski hidrolizat konoplje, dobiven enzimom Neutraza, dodan u koncentraciji 0,5 g L⁻¹, nije utjecao na rast CHO DP-12 stanične linije tijekom šaržnog uzgoja, međutim potaknuo je njihov rast tijekom šaržnog uzgoja s prihranom hidrolizatima.
3. Peptidna frakcija proteinskog hidrolizata konoplje <10 kDa, dobivena hidrolizom proteolitičkim enzimom Protamex, dodana u koncentraciji 2 g L⁻¹, usporava rast CHO DP-12 stanične linije u uvjetima šaržnog uzgoja, te nema nikakav učinak na rast stanica ili ga potiče u uvjetima šaržnog uzgoja s prihranom hidrolizatima.
4. Stanice CHO DP-12 uzgajane u mediju s dodatkom proteinskih hidrolizata konoplje ili njihovih frakcija (šaržno ili s prihranom) proizvele su manju količinu protutijela IgG nego stanice u kontrolnim uvjetima (tj. bez dodanih hidrolizata).
5. Vrijeme dodatka proteinskih hidrolizata konoplje u hranjivi medij utječe na jačinu opaženih učinaka na rast i produktivnost CHO DP-12 stanica. Dodatak hidrolizata konoplje i njihovih frakcija izraženije pokazuje nepovoljan utjecaj na rast stanica, a povoljan na njihovu specifičnu produktivnost pri šaržnom uzgoju, nego kad se uzgoj provodi s prihranom.
6. Dobiveni rezultati ne potvrđuju našu pretpostavku da se odgođenom prihranom kulture CHO stanica peptidnim frakcijama konoplje može dobiti veći titar IgG nego ako su ti isti peptidi dodani na početku uzgoja. Potrebno je dodatno istraživanje u smjeru određivanja doze prihranom dodanih frakcija te temeljitijeg odabira vremena prihrane.

6. LITERATURA

Ahn WS, Antoniewicz MR (2011) Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metab Eng* **13**, 598-609. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.07.002>

Alves PM, Carrondo MJT, Cruz PE (2008) Introduction to animal cell technology. U: *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy* (Castilho, L. R., Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Butler M., ured.), Taylor & Francis Group, New York, str. 1-11.

Anonymous 1 (2023) Neubauerova komorica <https://www.bionovo.pl/p/komora-do-liczenia-komorek-burkera/> Pristupljeno 21. ožujka 2023.

Anonymous 2 (2023) Mreža Neubauerove komorice <https://www.bdl.cz/laboratorni-pristroje-3k/opticke-pristroje-a-mikroskopy-20k/burkerovy-komurky-133k/pocitaci-komora-neubauer-289p> Pristupljeno 21. ožujka 2023.

Arora M (2013) Cell culture media: A review. *Mater Methods* **3**, 1-29. doi: [//dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.175](https://dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.175)

Backliwal G, Hildinger M, Kuettel I, Delegrange F, Hacker DL, Wurm FM (2008) Valproic acid: A viable alternative to sodium butyrate for enhancing protein expression in mammalian cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. **101**, 182–189. doi:10.1002/bit.21882

Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G (2010) Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media Interactive Online Database. *Altex*. **27**, 53-62. doi: <https://doi.org/10.14573/altex.2010.1.53>

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

Callaway JC (2004) Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*. **140**, 65-72.

Chandra S, Lata H, Khan IA, ElSohly MA (2017) *Cannabis sativa* L.: Botany and horticulture. U: Chandra S, Lata H, ElSohly M (ured.) *Cannabis sativa* L. – Botany and

biotechnology, Springer, Cham, Švicarska str. 79-100. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_3

Chun BH, Kim JH, Lee HJ, Chung NH (2007) Usability of size-excluded fractions of soy protein hydrolysates for growth and viability of Chinese hamster ovary cells in protein-free suspension culture. *Bioresour Technol* **98**, 1000–1005. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.04.012>

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.

Davis JM (2011) *Animal Cell Culture: Essential Methods*. Wiley-Blackwell, Chichester. doi: [10.1002/9780470669815](https://doi.org/10.1002/9780470669815)

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.

Fan Y, Ley D, Andersen MR (2017) Fed-Batch CHO Cell Culture for Lab-Scale Antibody Production. *Recombinant Glycoprotein Production*, 147–161. doi: [10.1007/978-1-4939-7312-5_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7312-5_12)

Farges-Haddani B, Tessier B, Chenu S, Chevalot I, Harscoat C, Marc I, Goerge JL, Marc A (2006) Peptide fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal proteins in CHO cell culture media. *Proc Biochem* **41**, 2297-2304. doi: <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. doi: <https://doi.org/10.3390/nu12071935>

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

Franek F, Hohenwarter O, Katinger H (2000) Plant Protein Hydrolysates: Preparation of Defined Peptide Fractions Promoting Growth and Production in Animal Cells Cultures. *Biotechnol Prog* **16**, 688-692. doi: <https://doi.org/10.1021/bp0001011>

Freshney RI (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5.izd, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, str. 129-143.

Freund N, Croughan M (2018) A Simple Method to Reduce both Lactic Acid and Ammonium Production in Industrial Animal Cell Culture. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, 385. doi: 10.3390/ijms19020385

Jelić A (2020) Rast i produktivnost CHO DP-12 stanica u kemijski definiranim hranjivim medijima (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Karnieli O, Friedner OM, Allickson JG, Zhang N, Jung S, Fiorentini D, Abraham E, Eaker SS, Yong TK, Chan A, Griffiths S, When AK, Oh S, Karnieli O (2016) A consensus introduction to serum replacement and serum-free media for cellular therapies. *Cytotherapy*. **19**, 155-169. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.11.011>

Kelly PS, Miguez AA, Alves C, Barron N (2018) From media to mitochondria – rewiring cellular energy metabolism of Chinese hamster ovary cells for the enhanced production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Chem Eng* **22**, 71-80. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coche.2018.08.009>

Kostrouchova M, Kostrouch Z, Kostrouchova M (2007) Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *FOLIA BIOLOGICA-PRAHA*-, **53**, 37.

Kuystermans D, Al-Rubeai M (2015) Biopharmaceutical Products from Animal Cell Culture. U: *Animal Cell Culture*, (Al-Rubeai, M., ured.), Springer International Publishing, str. 717-720. doi: 10.1007/978-3-319-10320-4_23

Lai T, Yang Y, Ng SK (2013) Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production. *Pharmaceuticals*. **6**, 579-603. doi: <https://doi.org/10.3390/ph6050579>

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

Li F, Vijayasankaran N, Shen AY, Kiss R, Amanullah A (2010) Cell culture processes for monoclonal antibody production, *MAbs*. **2**, 466-477. doi: 10.4161/mabs.2.5.12720

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. doi: <https://doi.org/10.3390/resources10060059>

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

McManus OB, Garcia ML, Weaver D, Bryant M, Titus S, & Herrington JB (2012). Ion channel screening. *Assay Guidance Manual*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK100915/?report=reader> Pristupljeno 20. ožujka 2023.

Moraes AM, Mendonca RZ, Suazo CAT (2008) Culture media for animal cells. U: *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy* (Castilho, L., Morales, A., Augusto, E. F. P., Butler, M., ured.), Taylor & Francis Group, New York, str. 111.-128.

Omasa T, Onitsuka M, Kim W-D (2010) Cell Engineering and Cultivation of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **11**, 233–240. doi:10.2174/138920110791111960

Park SY, Lee J, Baek H, Lee HG (2010) Purification and characterization of antioxidant peptides from soy protein hydrolysate. *J Food Biochem.* **34**, 120-132. doi:10.1111/j.1745-4514.2009.00313.x

Pasupuleti VK, Demain AL (2010) State of the art manufacturing of protein hydrolysates. U: *Protein hydrolysates in biotechnology*, (Pasupuleti, V. K., Demain, A. L., ured.), Springer Dordrecht Heilderberg, London/New York, str. 33-55. doi: 10.1007/978-1-4020-6674-0_2

Popović MK, Pörtner R (2012) Bioreactors and cultivation systems for cell and tissue culture, in *Biotechnology*, in *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Paris, France, [BIOREACTORS AND CULTIVATION SYSTEMS FOR CELL AND TISSUE CULTURE \(eolss.net\)](https://www.eolss.net/). Pristupljeno 24. travnja 2023.

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**, 1407-1426. doi: <https://doi.org/10.1002/btpr.2706>

Ryan JA (2008) Introduction to animal cell culture, Corning Incorporated Life Sciences, Lowell, Massachusetts, SAD, [CLS-AN-042.pdf \(corning.com\)](#). Pristupljeno 24. travnja 2023.

Segar KP, Chandrawanshi V, Mehra S (2017) Activation of unfolded protein response pathway is important for valproic acid mediated increase in immunoglobulin G productivity in recombinant Chinese hamster ovary cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **124**, 459–468. doi:10.1016/j.jbiosc.2017.05.005

Sung, YH, Lim SW, Chung JY, Lee GM (2004) Yeast hydrolysate as a low-cost additive to serum-free medium for the production of human thrombopoietin in suspension cultures of Chinese hamster ovary cells. *Appl Microbiol and Biotechnol*. **63**, 527-536. doi: 10.1007/s00253-003-1389-1

Teparić R (2017) Interna skripta iz predmeta Biokemija 2 (nastavni materijali), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Tihany B, Nyitray L (2021) Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug Discov Today: Technol*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.02.003>.

van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Fex Svenningsen Ä, Gstraunhaler G, Honegger P, Knudsen LE, Lindl T, Noraberg J, Price A, Scarino ML (2010) Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicol in vitro* **24**, 1053 – 1063. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.016>

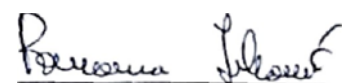
Véliz EC, Rodríguez G, Cardero AF (2008) Bioreactors for animal cells. U: *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy* (Castilho, L. R., Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Butler M., ured.), Taylor & Francis Group, New York, str. 221-258.

Verma A, Verma M, Singh A (2020) Models in discovery and translation. U: *Animal Biotechnology*, 2. izd., Academic Press, Cambridge, str. 269-293.

- Wagner R (1997) Metabolic control of animal cell culture processes. U: *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*, (Hauser, H., Wagner, R., ured.), Walter de Gruyter, Berlin, str. 193-232. doi: <https://doi.org/10.1515/9783110809282>
- Wulhfard S, Baldi L, Hacker DL, Wurm F (2010) Valproic acid enhances recombinant mRNA and protein levels in transiently transfected Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biotechnology*. **148**, 128–132. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.05.003
- Xie L, Wang DIC (1994) Applications of improved stoichiometric model in medium design and fed-batch cultivation of animal cells in bioreactor. *Cytotechnology*, **15**, 17–29. doi:10.1007/bf00762376
- Xu P, Dai XP, Graf E, Martel R, Russell R (2014) Effects of glutamine and asparagine on recombinant antibody production using CHO-GS cell lines. *Biotechnol Prog*. **30**, 1457–68. doi: <https://doi.org/10.1002/btpr.1957>
- Yang WC, Lu J, Nguyen NB, Zhang A, Healy NV, Kshirsagar R, Huang Y-M (2014) Addition of Valproic Acid to CHO Cell Fed-Batch Cultures Improves Monoclonal Antibody Titers. *Molecular Biotechnology*, **56**, 421–428. doi:10.1007/s12033-013-9725-x
- Yao T, Asayama Y (2017) Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Medicine and Biology* **16**, 99-117. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Romana Ivković 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.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Romana Ivković', written over a horizontal line.

Vlastoručni potpis