



K. Radošević\*

Prehrambeno-biotehnoški fakultet,  
Sveučilište u Zagrebu,  
Pierrotijeva 6, 10 000 Zagreb

## Kulture životinjskih stanica

U današnje doba kultura životinjskih stanica predstavlja značajan i široko korišten "alat" za primjenu u modernim istraživanjima i biotehnoškim procesima. Mnoga istraživačka područja temelje se na tehnologiji kultura životinjskih stanica (engl. *animal cell culture technology*), poput biologije matičnih stanica, biologije stanica raka, potpomognute izvantjelesne oplodnje, proizvodnje cjepiva, monoklonskih protutijela i rekombinantnih proteina, genske terapije, odabira i poboljšanja novih lijekova i drugo (slika 1).

Kultura stanica opći je idiom koji se primjenjuje za izuzimanje stanica, tkiva ili organa iz organizma, životinje ili čovjeka, i njihov uzgoj u umjetnom okruženju, odnosno u laboratoriju. Uzgoj stanica izvan živog organizma omogućen je upotrebom odgovarajućeg medija za uzgoj koji sadrži sve potrebne hranjive tvari za rast stanica u kulturi *in vitro* te osiguravanjem odgovarajućih fizikalno-kemijskih uvjeta. Današnja moderna znanost, biotehnologija i biomedicina bila bi svakako nezamisliva bez otkrića i primjene kulture životinjskih stanica.



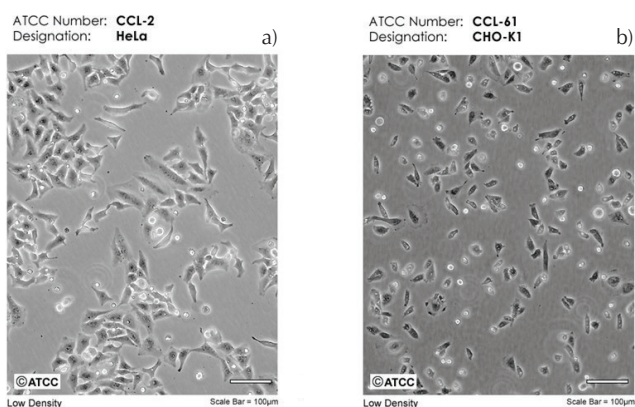
Slika 1 – Područja primjene kultura životinjskih stanica

### Razvoj i osnove tehnologije kulture životinjskih stanica

Gledano povijesno, više od 100 godina prošlo je od početka "uzgoja" kultura životinjskih stanica do široke primjene stanica i proizvodnje vezanih proizvoda. Uzgoj životinjska stanica u kulturi započeo je u posljednjem desetljeću 19. stoljeća s prvim eksperimentima kojima je bio cilj održati komadiće tkiva *in vitro* u laboratoriju u tjelesnoj tekućini tijekom nekoliko dana ili čak tjedna. Uspjeh tih prvih eksperimenata bio je ovisan o kvaliteti upotrijebljene hranjive tekućine i sterilnosti eksperimenta. Ross Harrison je 1907. prvi zabilježio održavanje i rast živčane stanice u visećoj kapi tijekom 30 dana, čime je pokazao da se normalne funkcije stanica mogu nastaviti *in vitro*, stoga se upravo 1907. godina obično označava kao početak uzgoja kulture životinjskih stanica. Već su tada Harrison, ali i njegovi nasljednici primijetili da su strogi aseptični uvjeti rada presudni za uspjeh rada s kultura stanica.

Metodološki, kulture stanica pripravljene iz tkiva ili organa uzetih neposredno iz organizma nazivaju se primarnim kulturama sve dok se subkultivanjem i imortalizacijom ne postignu svojstva stanične linije. Kulture su obično fenotipski heterogene, imaju diploidan karakter i malu specifičnu brzinu rasta. Također, one zadržavaju specifične funkcije tkiva iz kojeg su potekle i najbolje odražavaju svojstva stanica *in vivo*, stoga su pogodne za ispitivanje svojstava i odgovora koje daju diferencirane stanice. Subkultiviranje (precjepeljivanje) primarne kulture u svježi medij za uzgoj rezultira tzv. sekundarnom staničnom kulturom, čime se može dobiti velika količina jednolikog materijala pogodnog za dugotrajniju uporabu. Međutim, takve stanične kulture nakon nekoliko subkultiviranja ulaze u fazu replikativne senescencije koja završava odumiranjem stanica, stoga se takve stanice zovu i konačna ili smrtna stanična linija. Postupak pretvorbe u kontinuiranu ili besmrtnu staničnu liniju naziva se imortalizacija. Većina staničnih linija koje se danas upotrebljavaju u znanosti i industriji upravo su takve, besmrtno stanične linije, koje su komercijalno dostupne u bankama stanica. Dvije najveće banke staničnih linija su ECACC (engl. *European Collection of Animal Cell Culture*, [www.eacc.org](http://www.eacc.org)) i ATCC (engl. *American Type Culture Collection*, [www.atcc.org](http://www.atcc.org)), a obuhvaćaju preko 3000 različitih staničnih linija.

Na temelju morfoloških i funkcionalnih karakteristika stanica, tri su tipa stanica najzastupljenije kao kulture životinjskih stanica. Epitelne stanice su najčešće ovisne o površini za rast, odnosno adherentnog su tipa te su spljoštenog i poligonalnog oblika. Fibroblastne stanice također najčešće rastu pričvršćene za podlogu, izduženog su oblika za razliku od stanica limfoblasta koje su sfernog oblika i rastu u suspenziji. Među znanstvenicima je najpoznatija humana stanična linija HeLa, epitelne morfologije i izolirana iz adenokarcinoma grlića maternice 1952., dok se u biotehnoškim procesima najčešće upotrebljava stanična linija ovarija kineskog hrčka CHO-K1 (engl. *Chinese Hamster Ovary cell*), koja je također epitelne morfologije (slika 2).



Slika 2 – Dvije najpoznatije stanične linije: a) humana tumorska stanična linija HeLa (preuzeto s <https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/Micrographs/Cell/CCL-2.ashx>) i b) stanična linija ovarija kineskog hrčka CHO-K1 (preuzeto s <https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/Micrographs/Cell/CCL-61.ashx>)

\* Izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević  
e-pošta: [kristina.radosevic@pbf.unizg.hr](mailto:kristina.radosevic@pbf.unizg.hr)

Prema načinu uzgoja razlikujemo dvije vrste kultura životinjskih stanica ovisno o tome je li im za rast potrebno osigurati čvrstu površinu za prihvaćanje ili ne. Stanice koje rastu jedino ako su prihvaćene za površinu zovu se adherentne stanice, a one koje mogu rasti neovisno o površini suspenzijske stanice. Svojestvo stanica iz višestaničnog organizma je adhezijski i kontaktom ograničen rast u prisutnosti drugih stanica te su zbog toga u početcima tehnologije životinjskih stanica dominirale upravo adherentne kulture. Tek su nekoliko desetljeća kasnije transformacijama i selekcijom uspostavljene prve suspenzijske stanične kulture. Njihova primjena od iznimne je važnosti za uspješnost i ekonomičnost biotehnološkog procesa u industrijskom mjerilu.

## Biotehnološka primjena kultura životinjskih stanica

Prvi velik iskorak ka primjeni kultura životinjskih stanica u raznim biotehnološkim procesima bio je rad Endersa i suradnika iz 1949., kojim je pokazano da se virus poliomijelitisa može uzgajati u životinjskim stanicama i rabiti kao cjepivo. Nadalje, za uzgoj u industrijskom mjerilu iznimno je bio važan rad Earle & Eagle, koji su napravili opsežnu analizu nutritivnih zahtjeva stanica *in vitro* te 1955. formulirali kemijski definirani medij za uzgoj životinjskih stanica poznat kao EMEM (engl. *Eagle's Minimum Essential Medium*), koji je mogao zamijeniti do tada rabljene biološke tekućine promjenjivog i nedefiniranog sastava. Razvoj kontinuiranih staničnih linija koje se mogu neograničeno subkultivirati te onih koje imaju mogućnost rasta u suspenziji bio je od iznimne važnosti za primjenu životinjskih stanica u velikom mjerilu za potrebe biotehnoloških procesa. Prije sedam desetljeća, točnije 1954., proizvodnja cjepiva protiv virusa dječje paralize u primarnim stanicama bubrega majmuna bio je prvi proces razvijen u industriji, koji je otvorio vrata primjeni kultura životinjskih stanica za terapijsku primjenu u ljudi. Uspjeh Capsticka i sur. iz 1962., koji su uzgojili BHK21 (engl. *Baby Hamster Kidney cell*) stanice u suspenziji, bio je važan za industrijsku primjenu životinjskih stanica, budući da je taj tip stanica pogodniji za uporabu u biotehnološkim procesima. Razvoj i primjena tehnologije rekombinantnih proteina u 1970-im i 1980-im godinama rezultirala je proizvodnjom prvog humanog terapijskog proteina (rekombinantni inzulin), koji je odobren za upotrebu u ljudi 1982. Doduše, danas se rekombinantni inzulin zbog relativno jednostavne strukture proizvodi u bakteriji *Escherichia coli*, koja znatno brže raste i robusnija je za rad u usporedbi sa stanicama sisavaca. Druge proteinske molekule, koje su kasnije bile proizvedene kao rekombinantni proteini, složenije su strukture i zahtijevale su posttranslacijske modifikacije da bi bile funkcionalne te su mogle biti proizvedene samo u eukariotskim stanicama. Upravo zbog toga kulture životinjskih stanica danas zauzimaju glavno mjesto u proizvodnji raznih biofarmaceutika za terapijsku namjenu i kao ekspresijski sustavi za proizvodnju proteina su zastupljeni s oko 55 %, dok ostalo čini *E. coli* (24 %), kvasci (13 %) te stanice kukaca i transgenične biljke i životinje.

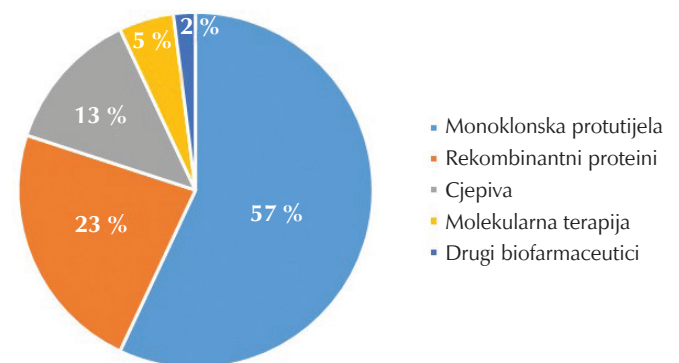
U biotehnološkoj i farmaceutskoj industriji kao glavni biofarmaceutici proizvedeni primjenom kultura životinjskih stanica ističu se cjepiva, rekombinantni proteini i monoklonska protutijela, pri

čemu su potonji najzastupljeniji (slika 3) te mogu imati i dijagnostičku i terapijsku namjenu (tablica 1).

**Tablica 1** – Proizvodi dobiveni pomoću kultura životinjskih stanica

Cjepiva za ljudsku upotrebu	bjesnoća, polio (dječja paraliza), rubeola, ospice, zaušnjaci, žuta groznica, gripa
Cjepiva za veterinarsku upotrebu	Marekova bolest, slinavka i šapa, Newcastle bolest, bjesnoća, štenećak, svinjska groznica, bolest plavog jezika
Dijagnostički proizvodi	Dijagnostička monoklonska protutijela
Terapeutski proizvodi	monoklonska protutijela, tkivni plazminogeni activator (tPA), Eritropetin (EPO), Interferon $\alpha$ , faktor VII, factor IX, Antitrombin III, itd.

Trenutačno je za primjenu odobreno i prisutno na tržištu više od 200 monoklonskih protutijela, kao i više od 20 rekombinantnih proteina, među kojima se kao iznimno uspješni terapijski proizvodi ističu npr. Rituxan, Remicade, Synagis i Herceptin.



**Slika 3** – Udio pojedinih biofarmaceutika na svjetskoj razini u 2017. (prilagođeno prema <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biopharmaceuticals-contract-manufacturing-market>)

Broj biofarmaceutika dobivenih primjenom kultura životinjskih stanica, osobito monoklonskih protutijela i rekombinantnih proteina, konstantno i brzo raste te je gotovo isti broj odobrenih proizvoda kao i onih koji su u fazi razvoja ili u kliničkim ispitivanjima. Takav trend svakako ukazuje na iznimnu važnost primjene kultura životinjskih stanica za zdravlje ljudi, ali također predstavlja velik izazov za procesne biotehnologe u industriji. Mogućnost proizvodnje sve većeg broja različitih biofarmaceutika u sve većim količinama objektivno ovisi o kapacitetu bioreaktora u uzvodnom (engl. *up-stream*) procesu te kapacitetu jedinica za izolaciju i pročišćavanje proizvoda u nizvodnom (engl. *down-stream*) procesu, pri čemu je upravo taj nizvodni proces najčešće "usko grlo" cjelokupne proizvodnje i predmet kontinuiranog razvoja i istraživanja s ciljem poboljšanja učinkovitosti.

## Literatura

- M. Butler, Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals, Appl. Microbiol. Biotechnol. **68** (2005) 283–291, doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1980-8>.
- R. I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, 5. izdanje, Wiley, New York, 2005., doi: <https://doi.org/10.1002/9780471747598>.
- M. Kesik-Brodacka, Progress in biopharmaceutical development, Appl. Biochem. Biotechnol. **65** (3) (2018) 306–322, doi: <https://doi.org/10.1002/bab.1617>.
- G. Kretzmer, Industrial processes with animal cells, Appl. Microbiol. Biotechnol. **59** (2002) 135–142, doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0991-y>.
- R. Nema, S. Khare, An animal cell culture: Advance technology for modern research, Adv. Biosci. Biotechnol. **3** (2012) 219–226, doi: <https://doi.org/10.4236/abb.2012.33030>.
- I. Slivac, V. Gaurina Srček, K. Radošević, Osnove tehnologije životinjskih stanica. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, 2016.