Archive of SID

Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره پانزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۸، پیاپی ۳۹: ۳۳-۲۱

بررسی تغییرات زمان دو برابر شدن، نرخ ویژه رشد و ضریب تزاید سلول کلیه نوزاد همستر با تغییر میزان مکمل های غذایی موجود در محیط کشت با روش تاگوچی

محمود حسنی *[۱]، رضا گل حسینی[۱]، سید محمود عظیمی[۲]، مهدی ارجمند[۳]، همایون مهروانی[۲]، شهریار سالمی پاریزی[۳و۴]

۱- استادیار گروه مهندسی شیمی ، دانشکده مهندسی ، دانشگاه کاشان

۲- استادیار بخش تب برفکی ، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیق آموزش و ترویج کشاورزی کرج- ایران.

۳- دانشیار گروه مهندسی شیمی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران ،ایران

۴- دانشجوی دکتری مهندسی شیمی ، عضو باشگاه پژهشگران و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۲۷

چکیده:

کشت سلول برای تولیدات بیولوژیکی و دارویی علی الخصوص دارو های دامی اهمیت ویژه ای دارد این تحقیق(کشت سلول) در شرایط کشت سوسپانسیون ، انجام شده است. برای بهینه سازی مکمل های غذایی موجود در محیط کشت از روش های متفاوتی مانند تغییر تک پارامترو ثابت نگه داشتن مابقی پارامترها(فاکتوریل) استفاده میشود که بسیار زمان برو دارای خطای بالائی میشود. در این مقاله از روش طراحی آزمایش به روش تاگوچی استفاده شده که نسبت به روشهای دیگر دقت بالاتر ،زمان کمتر و تعداد آزمایش کمتری انجام میشود. . با استفاده از این روش طراحی آزمایش سعی بر بهینه سازی محیط کشت مورد استفاده در پژوهش شد.با توجه به تعداد سلول نهایی، ضریب تزاید و زمان دو برابر شدن و نرخ ویژه رشد هر آزمایش محاسبه گردید و در باره اهمیت هرکدام از مکمل های غذایی و اثر آن ها بر روی سلول کلیه نوزاد همستر (Baby Hamster Kidney) اعمال نظر شده است.هرچه تعداد سلول نهایی بیشتر باشد در نتیجه زمان دو برابر شدن کمتر و نرخ ویژه رشد بیشتر می شود،که حاصل تمامی این ها باعث می شود کشت سلول بهره وری بیشتری داشته باشد. هدف از این تحقیق بررسی بر روی تاثیر مکمل های غذایی مختلف موجود در محیط کشت بر رشد و تکثیر سلول کلیه نوزاد همستر(BHK)متمرکز شده است. در فرآیند کشت سلول نتایج بدست آمده نشان دهنده بهبود رشد و تکثیر سلول‌ها شد. افزایش تعداد سلول به صورت کلی (در این پژوهش سلول BHK) موجب تولید بیشتر و با کیفیت بالاتر داروهای بیولوژیک می شود.میزان سرم اضافه شده در محیط کشت در این روش (۱۰٪) بیشترین تاثیر مثبت بر روی ضریب تزاید ، زمان دو برابر شدن و نرخ ویژه رشد را دارد و هم چنین افزایش میزان اسید های آمینه(۱۲ گرم در هر لیتر) تاثیری بر روی ضریب تزاید ، زمان دو برابر شدن و نرخ ویژه رشد ندارد.

کلمات کلیدی:زمان دو برابر شدن،نرخ ویژه رشد، کلیه نوزاد همستر، تاگوچی،محیط کشت

* نویسنده مسئول : محمود حسنی

آدرس: گروه مهندسی شیمی – دانشکده مهندسی – دانشگاه کاشان – تلفن ۰۳۶۳۲۷۲۹۰۶۱،

پست الکترونیک: mahmoudhasani2000@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه:

کشت سلول و بافت که از اوایل قرن بیستم ابداع شده است یک فرایند مصنوعی به منظور رشد، تکثیر و نگهداری سلول ها به منظور بررسی و پژوهش بر روی رفتار سلول های جانوری است(۱, ۲).

کشت سلول به صورت عمده در علوم زیستی مثل تکثیر ویروس، تولیدواکسن، تشخیص‌بیماری، تولید هورمون‌ها، مطالعات فیزیولوژیکی و بیولوژیکی و دارویی ، تحقیقات پایه ای و کاربردی مثل بیولوژی سلول، تولید پروتئین نوترکیب و ژن درمانی،تحقیقات سرطان و تولید دارو ها و بسیاری ازجنبه های دیگر کاربرد دارد(۴,۳).

سلول های مورد استفاده در کشت سلول به چند زیر مجموعه تقسیم بندی می شوند . سلول های پرایمری به عنوان دسته اول که به طور مستقیم از بافت جاندار گرفته می شوند و دسته دوم که سلول های لاین هستنند و تحت شرایط ازمایشگاهی به هر میزان و به صورت نا محدود کشت داده می شوند (۵ ,۶).

سلول BHK بیشتر در تولیدات محصولات دامی که مهم ترین آنها تولید واکسن تب برفکی و هاری است مورد استفاده قرار می گیرد . هم چنین در تولید پروتئین های نوترکیب مثل فاکتور IIIV، برای استخراج DNA و تولید آنتی ژن *ELISA*ویروس انسفالیت ژاپنی (Japanese Encephalitis –JE) مورد استفاده قرار گرفته است(۷-۹).

توسعه سیستم های کشت سوسپانسیون در بسیاری از موارد اجازه بالا بردن تعداد سلول و غلظت آن و بازدهی حجمی را می دهد . هم چنین شرایط تلقیح در مقیاس های بزرگ تر و ترکیب محیط کشت را بهبود بخشیده و تسهیل می کند (۱۰).

یک محیط کشت کلی ترکیبی از اسید های امینه ضروری و غیر ضروری،ویتامین،نمک های معدنی،گلوکز و سرم است . در محیط کشت بدون سرم به سختی می توان سلول ها را زنده نگه داشت(۱۱, ۱۲).

سرم به صورت کلی یک ماده پیچیده حاوی مقادیر زیادی ازترکیبات بهبود دهنده و محدود کننده رشد، آلبومین، اسید های آمینه، پروتئین، ویتامین، کربوهیدرات، لیپید، مواد معدنی و عناصر کمیاب است . مهم ترین نقش های سرم در کشت سلول عبارتند از: تامین هورمون های تحریک کننده رشد و تکثیر سلول ، جا به جایی پروتئین های معدنی و عناصر کمیاب و لیپید ها، فاکتور های چسبنده و گسترنده ، حفظ pH و مقاومت در مقابل مواد سمی است (۱۳– ۱۵). هدف از این تحقیق بررسی بر روی تاثیر مکمل های غذایی مختلف موجود در محیط کشت بر رشد و تکثیر سلول کلیه نوزاد همستر(BHK)متمرکز شده است..میزان سرم اضافه شده در محیط کشت در این روش (۱۰٪) بیشترین تاثیر مثبت بر روی ضریب تزاید ، زمان دو برابر شدن و نرخ ویژه رشد را دارد و هم چنین افزایش میزان اسید های آمینه(۱۲ گرم در هر لیتر) تاثیری بر روی ضریب تزاید ، زمان دو برابر شدن و نرخ ویژه رشد ندارد.

مواد و روش ها:

تهیه سلول و محیط کشت:

ابتدا سلول کلیه نوزاد همستر که از بخش تب برفکی موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی کرج تهیه شده را در فلاسک های کشت سلول با محیط کشت بهبود یافته MEM (Minimum essential media) و میزان سرم گاوی تیمار شده با پلی اتیلن گلایکول 10% کشت داده می شود . محیط کشت MEM (شرکت

www.SID.ir

Archive of SID

سیگما با شماره کاتالوگ M8028) و سرم گاوی که با PEG تیمار شده از بخش تب برفکی موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی‌کرج تهیه شد . زمانی که سلول به صورت تک لایه کامل درآمد وتقریبا بیش از ۹۰٪ سطوح ظرف کشت(فلاسک کشت سلول) را پوشاند می بایست سلول ها به کشت سوسپانسیون انتقال داده شود . بدین منظور محیط روی سلول درون فلاسک به کمک پیپت تخلیه می شود . تریپسین $\%\ 0/25\frac{w}{v}$ به فلاسک حاوی سلول اضافه می شود . بعد از ۲-۱ دقیقه تریپسین اضافی تخلیه شده وفلاسک حاوی سلول کشت داده شده در گرم خانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از ۴-۳ دقیقه فلاسک را از گرم خانه خارج کرده و با استفاده از ضربه زدن سلول های چسبیده به سطح فلاسک را از روی سطح جدا و سپس ۵ میلی لیتر محیط کشت به فلاسک حاوی سلول اضافه کرده و پیپتینگ انجام میشود تا تمام سلول ها از هم جداشوند. سلول ها را به ظروف کشت جدید که حاوی محیط کشت و سرم به میزان مشخص می باشد توسط پیپت انتقال داده میشود . بیوراکتور مورد استفاده در این تحقیق دارای همزن و منافذ تبادل هوا بوده و تمامی آزمایشات در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی گراد و با دی اکسید کربن 5% و دور همزن ۱۲۵ دور بر دقیقه انجام گرفت . تمامی سلول ها قبل از انجام آزمایشات موردنظر دو الی سه پاساژ را در شرایط فیزیکی و شیمیایی ذکر شده طی نمودند و سپس وارد مرحله انجام تحقیقات شدند .

شمارش و حیات سلول:

به منظور شمارش سلول های زنده و حذف سلول های مرده از روش رنگ آمیزی تریپان بلو با لام هموسیتومتر و تقسیم بندی نئوبار استفاده گردید . سلول های مرده قادر به ممانعت از ورود این رنگ نیستند و رنگ آبی تیره وارد سیتوپلاسم شده و آن ها را به رنگ آبی در می آورد . حجم مساوی از سوسپانسیون سلولی و رنگ تریپان بلو $\%\ 5\frac{w}{v}$ را به یک لوله آزمایش اضافه کرده و خوب مخلوط میکنند . مقداری از سوسپانسیون مذکور را روی لام نئوبار مناسب قرار داده و با کمک میکروسکوپ نوری سلول های داخل یک مربع مطابق با پروتکل شمارش سلول توسط لام نئوبار و رنگ تریپان بلو شمارش می شود . تعداد سلول شمارش شده را در عدد۱۰۰۰۰ ضرب کرده تا تعداد سلول های موجود در هر میلی لیتر به دست آید . برای بررسی حیات یا مرگ سلول با استفاده از لام نئوبار و هم زمان با شمارش سلول ها وضعیت سلول های مرده را نیز می بایست مورد بررسی قرارداد . سلول های رنگ شده حکایت از سول های مرده و سلول های سفید رنگ یا رنگ نشده به معنای سلول های زنده اند . به منظور محاسبه حیات سلول ها تعداد سلول های زنده را تقسیم بر تعداد سلول کل یا همان تجمیع تعداد سلول زنده و مرده می شود .

طراحی آزمایش به روش تاگوچی:

به منظور بررسی شرایط موثر بر روی رشد و تکثیر سلول کلیه نوزاد همستر از روش تاگوچی استفاده گردید. بدین صورت که شش متغیر ،گلوکز ،گلوتامین،پروتئین ،ویتامین ،اسید های آمینه و سرم گاوی در چهار سطح مدنظر قرار گرفته شد . در این پژوهش هر آزمایش دو بار تکرار شد که میانگین آنها در جدول قرارداده شده است.(جدول ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۱- طراحی آزمایشات جهت ارزیابی متغیرها با توجه به ٤ سطح و با استفاده از نرم افزار تاگوچی

شماره آزمایشات	متغیر ها و سطوح					
	سرم گاوی تیمار شده با پلی اتیلن گلایکول (%حجمی)	گلوکز(g/l)	گلوتامین(g/l)	مجموعه پروتئین ها (g/l)	مجموعه ویتامین ها(g/l)	مجموعه اسید های آمینه ضروری (g/l)
۱	۱/۰۰	۱/۰۰	۰/۲۵	۰/۹۶	۱/۵۰	۱/۵۰
۲	۱/۰۰	۲/۰۰	۰/۵۰	۳/۵۰	۳/۰۰	۳/۰۰
۳	۱/۰۰	۴/۰۰	۰/۷۵	۷/۰۰	۶/۰۰	۶/۰۰
۴	۱/۰۰	۶/۰۰	۱/۰۰	۱۰/۰۶	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰
۵	۲/۰۰	۱/۰۰	۰/۲۵	۳/۵۰	۳/۰۰	۶/۰۰
۶	۲/۰۰	۲/۰۰	۰/۵۰	۰/۹۶	۱/۵۰	۱۲/۰۰
۷	۲/۰۰	۴/۰۰	۰/۷۵	۱۰/۰۶	۱۲/۰۰	۱/۵۰
۸	۲/۰۰	۶/۰۰	۱/۰۰	۷/۰۰	۶/۰۰	۳/۰۰
۹	۵/۰۰	۱/۰۰	۰/۵۰	۷/۰۰	۱۲/۰۰	۱/۵۰
۱۰	۵/۰۰	۲/۰۰	۰/۲۵	۱۰/۰۶	۶/۰۰	۳/۰۰
۱۱	۵/۰۰	۴/۰۰	۱/۰۰	۰/۹۶	۳/۰۰	۶/۰۰
۱۲	۵/۰۰	۶/۰۰	۰/۷۵	۳/۵۰	۱/۵۰	۱۲/۰۰
۱۳	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۰/۵۰	۱۰/۰۶	۶/۰۰	۶/۰۰
۱۴	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۰/۲۵	۷/۰۰	۱۲/۰۰	۱۲/۰۰
۱۵	۱۰/۰۰	۴/۰۰	۱/۰۰	۳/۵۰	۱/۵۰	۱/۵۰
۱۶	۱۰/۰۰	۶/۰۰	۰/۷۵	۰/۹۶	۳/۰۰	۳/۰۰
۱۷	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۰/۹۶	۱۲/۰۰	۳/۰۰
۱۸	۱/۰۰	۲/۰۰	۰/۷۵	۳/۵۰	۶/۰۰	۱/۵۰
۱۹	۱/۰۰	۴/۰۰	۰/۵۰	۷/۰۰	۳/۰۰	۱۲/۰۰
۲۰	۱/۰۰	۶/۰۰	۰/۲۵	۱۰/۰۶	۱/۵۰	۶/۰۰
۲۱	۲/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۳/۵۰	۶/۰۰	۱۲/۰۰
۲۲	۲/۰۰	۲/۰۰	۰/۷۵	۰/۹۶	۱۲/۰۰	۳/۰۰
۲۳	۲/۰۰	۴/۰۰	۰/۵۰	۱۰/۰۶	۱/۵۰	۳/۰۰
۲۴	۲/۰۰	۶/۰۰	۰/۲۵	۷/۰۰	۳/۰۰	۱/۵۰
۲۵	۵/۰۰	۱/۰۰	۰/۷۵	۷/۰۰	۱/۵۰	۳/۰۰
۲۶	۵/۰۰	۲/۰۰	۱/۰۰	۱۰/۰۶	۳/۰۰	۱/۵۰
۲۷	۵/۰۰	۴/۰۰	۰/۲۵	۰/۹۶	۶/۰۰	۱۲/۰۰
۲۸	۵/۰۰	۶/۰۰	۰/۵۰	۳/۵۰	۱۲/۰۰	۶/۰۰
۲۹	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۰/۷۵	۱۰/۰۶	۳/۰۰	۱۲/۰۰
۳۰	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۱/۰۰	۷/۰۰	۱/۵۰	۶/۰۰
۳۱	۱۰/۰۰	۴/۰۰	۰/۲۵	۳/۵۰	۱۲/۰۰	۳/۰۰
۳۲	۱۰/۰۰	۶/۰۰	۰/۵۰	۰/۹۶	۶/۰۰	۱/۵۰

www.SID.ir

Archive of SID

محاسبه ضریب تزاید و زمان دو برابر شدن و نرخ ویژه رشد:

برای محاسبه ضریب تزاید به تعداد سلول در شروع کشت و در انتهای کشت نیاز است که با استفاده از رابطه زیر به دست می آید :

$$\text{ضریب تزاید} = \frac{\text{تعداد سلول در انتها کشت}}{\text{تعداد سلول در ابتدا کشت}}$$

برای محاسبه زمان دو برابر شدن نیز به تعداد سلول در ابتدا و انتها کشت نیاز است و از طریق رابطه زیر مقدار آن به دست می آید :

$$\text{زمان دو برابر شدن} = \frac{\text{زمان کشت} * Log2}{Log\text{تعداد سلول ابتدا کشت} - Log\text{تعداد سلول انتها کشت}}$$

برای محاسبه نرخ ویژه رشد نیز به تعداد سلول در ابتدا و انتها کشت نیاز است و از طریق رابطه زیر مقدار آن به دست می آید :

$$\text{نرخ ویژه رشد} = \frac{lnx_1 - lnx_2}{t_2 - t_1}$$

که در این رابطه :

$X_2 =$ تعداد نهایی سلول

$X_1 =$ تعداد سلول در اغاز

$t_2 =$ زمان انتهای کشت

$t_1 =$ زمان شروع کشت(۱۹) .

نتایج:

به منظور بررسی وضعیت کشت سلول کلیه نوزاد همستر با استفاده از طراحی آزمایش به روش تاگوچی به منظور بررسی تاثیر مکمل های مختلف غذایی موجود در محیط کشت آزمایشات پیشنهادی توسط روش تاگوچی انجام گرفت . نتایج حاصل شامل تعداد سلول نهایی پس از ۲۴ ، ۴۸ و۷۲ ساعت پس از شروع کشت است . پس از به دست آوردن تعداد سلول نهایی با استفاده از روابط ذکر شده ،ضریب تزاید و زمان دو برابر شدن و نرخ ویژه رشد به دست آمد . نتایج تعداد سلول های به صورت جدول شماره ۲ در ذیل ارائه شده است.تعداد سلول اولیه در فرایند کشت سلول ۳۵۰۰۰۰ سلول در هر میلی لیتر بود.

www.SID.ir

Archive of SID

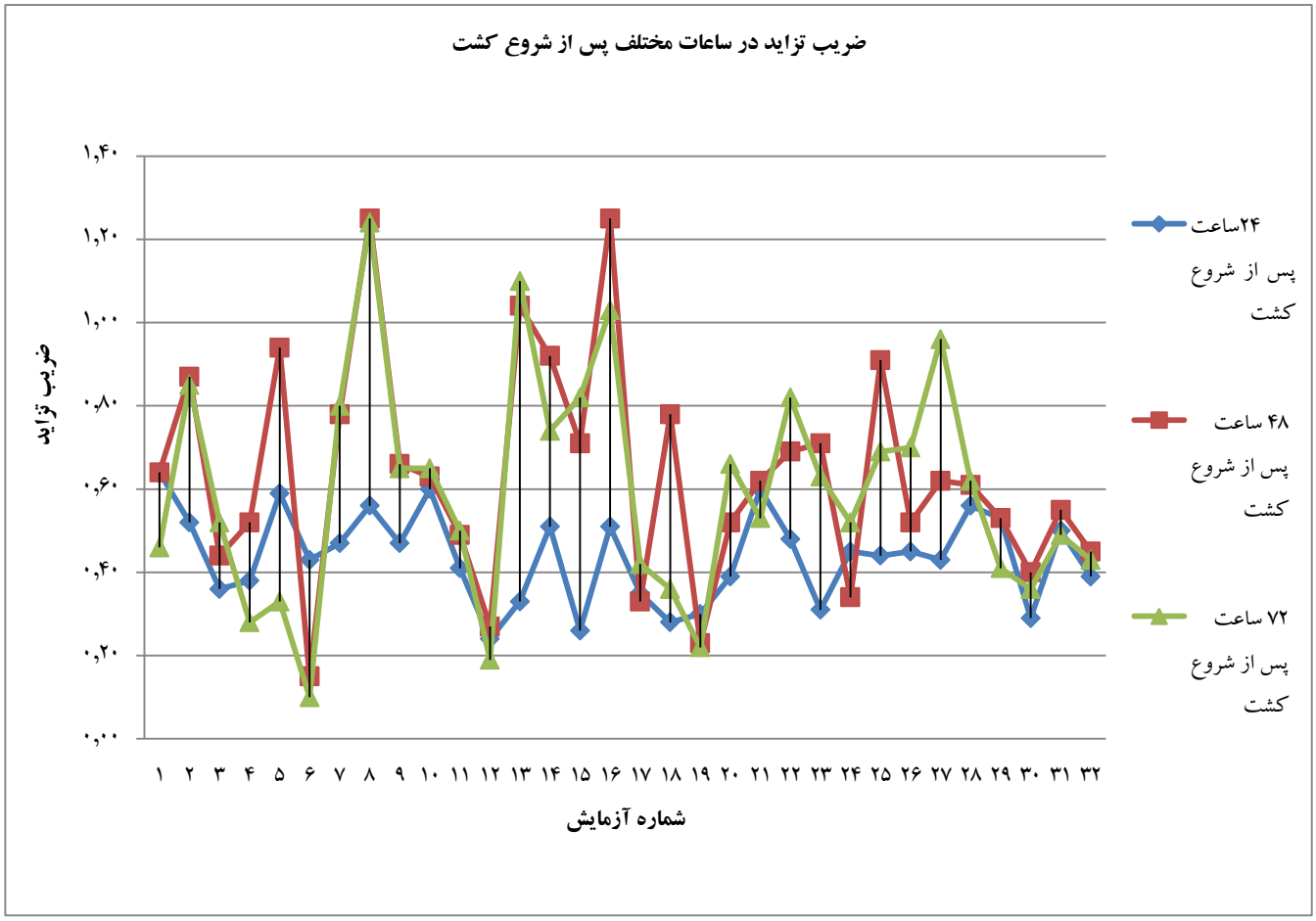
جدول شماره ۲- تعداد سلول درمحیط کشت به ازای ساعت های مختلف نمونه گیری

شماره آزمایش	۲٤ ساعت پس از شروع کشت 10^{+6}	٤۸ ساعت پس از شروع کشت 10^{+6}	۷۲ ساعت پس از شروع کشت 10^{+6}
۱	۰/٦٤	۰/٦٤	۰/٤٦
۲	۰/۵۲	۰/۸۷	۰/۸۵
۳	۰/۳٦	۰/٤٤	۰/۵۲
٤	۰/۳۸	۰/۵۲	۰/۲۸
۵	۰/۵۹	۰/۹٤	۰/۳۳
٦	۰/٤۷	۰/۱۵	۰/۱۰
۷	۰/٤۷	۰/۷۸	۰/۸۰
۸	۰/۵٦	۱/۲۵	۱/۲٤
۹	۰/٤۷	۰/٦٦	۰/٦۵
۱۰	۰/٦۰	۰/٦۳	۰/٦۵
۱۱	۰/٤۱	۰/٤۹	۰/۵۰
۱۲	۰/۲٤	۰/۲۷	۰/۱۹
۱۳	۰/۳۳	۱/۰٤	۱/۱۰
۱٤	۰/۵۱	۰/۹۲	۰/۷٤
۱۵	۰/۲٦	۰/۷۱	۰/۸۲
۱٦	۰/۵۱	۱/۲۵	۱/۰۳
۱۷	۰/۳۵	۰/۳۳	۰/٤۲
۱۸	۰/۲۸	۰/۷۸	۰/۳٦
۱۹	۰/۳۰	۰/۲۳	۰/۳۲
۲۰	۰/۳۹	۰/۵۲	۰/٦٦
۲۱	۰/٦۰	۰/٦۲	۰/۵۳
۲۲	۰/٤۸	۰/٦۹	۰/۸۲
۲۳	۰/۳۱	۰/۷۱	۰/٦۳
۲٤	۰/٤۵	۰/۳٤	۰/۵۲
۲۵	۰/٤٤	۰/۹۱	۰/٦۹
۲٦	۰/٤۵	۰/۵۲	۰/۷۰
۲۷	۰/٤۳	۰/٦۲	۰/۹٦
۲۸	۰/۵٦	۰/٦۱	۰/٦۲
۲۹	۰/۵۳	۰/۵۳	۰/٤۱
۳۰	۰/۲۹	۰/٤۰	۰/۳٦
۳۱	۰/۵۰	۰/۵۵	۰/٤۹
۳۲	۰/۳۹	۰/٤۵	۰/٤۳

www.SID.ir

Archive of SID

به منظور محاسبه ضریب تزاید ، زمان دو برابر شدن و نرخ ویژه رشد لازم است که تعداد سلول ابتدای بازه زمانی مورد نظر و انتهای آن مشخص شده باشند. پس از به دست آوردن این مقادیر و با محاسباتی صورت گرفته مشخص گردید که بالاترین میزان ضریب تزاید در ۲۴ ساعت مربوط به سه شماره آزمایش ۱، ۱۰ و ۲۱ می باشد. همین پارامتر در ۴۸ ساعت پس از شروع کشت در سه شماره آزمایش ۵، ۸ و ۱۶ دارای بالاترین مقادیر می باشد. سه شماره آزمایش ۸ ، ۱۳ و ۱۶ نیز دارای بالاترین مقدار ضریب تزاید در میان تمام ۳۲ آزمایش صورت گرفته می باشند . ضریب تزاید هایی که میزان آن ها کمتر از ۱ باشد ، بدین معناست که تعداد سلول در انتهای زمان مورد نظر کمتر از مقدار اولیه یا همان ۳۵۰۰۰۰ سلول در هر میلی لیتر است . (نمودار شماره ۱)



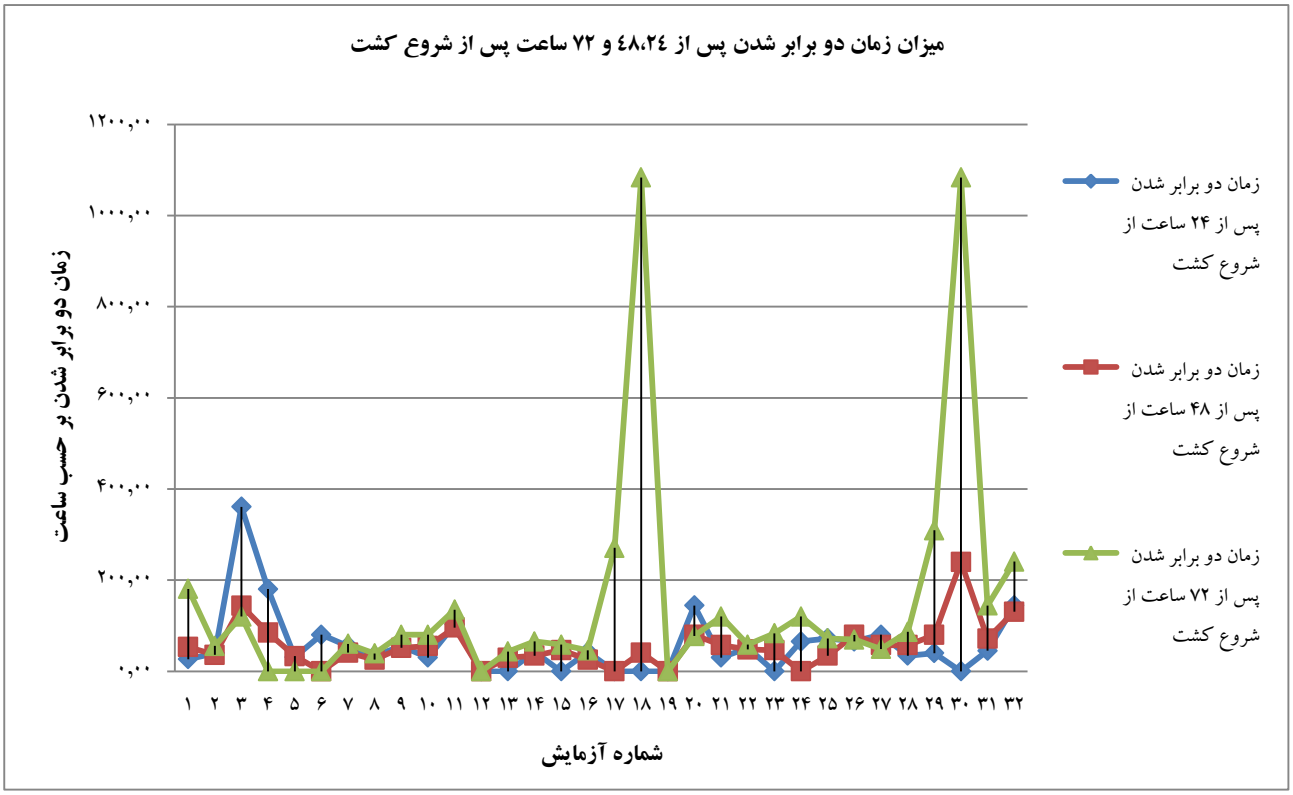
نمودار شماره۱-میزان ضریب تزاید در سلول کلیه نوزاد همستر به ازای ساعت های مختلف نمونه گیری

زمان دو برابر شدن بدین معنا است که مدت زمانی که جمعیت سلول ها دو برابر جمعیت اولیه شود . در حقیقت منظور از جمعیت سلول ها تعداد سلول های زنده می باشد. هرچه این زمان کمتر باشد تعداد سلول نهایی در بازه مشخص بیشتر می شود و این رخداد دلخواه می باشد. در بررسی صورت گرفته در ۲۴ ساعت اول بیشترین زمان دو برابر شدن مربوط به آزمایش شماره ۳ می باشد . نکته قابل ذکر در این جا آن است ، همان طور که ذکر شد

www.SID.ir

Archive of SID

برای محاسبه زمان دو برابر شدن نیاز به تعداد سلول نهایی و تعداد سلول اولیه است . با استفاده از این تعریف هر گاه که تعداد سلول نهایی در انتهای بازه زمانی موردنظر کمتر از تعداد سلول اولیه شود ، مقدار زمان دو برابر شدن با عدد صفر گزارش شده است . هم چنین در ۴۸ ساعت پس از شروع کشت بیش ترین میزان زمان دو برابر شدن مربوط به سه شماره آزمایش۳، ۳۰ و ۳۲ می باشد . شماره آزمایش ۳ در ۲۴ ساعت پس از شروع کشت و ۴۸ ساعت پس از شروع کشت دارای زمان دو برابر شدن بالایی است. سه شماره آزمایش ۱۸ ، ۲۹ و ۳۰نیز دارای بیشترین زمان دو برابر شدن در ۷۲ ساعت پس از شروع کشت را دارا هستند .(نمودار شماره ۲)

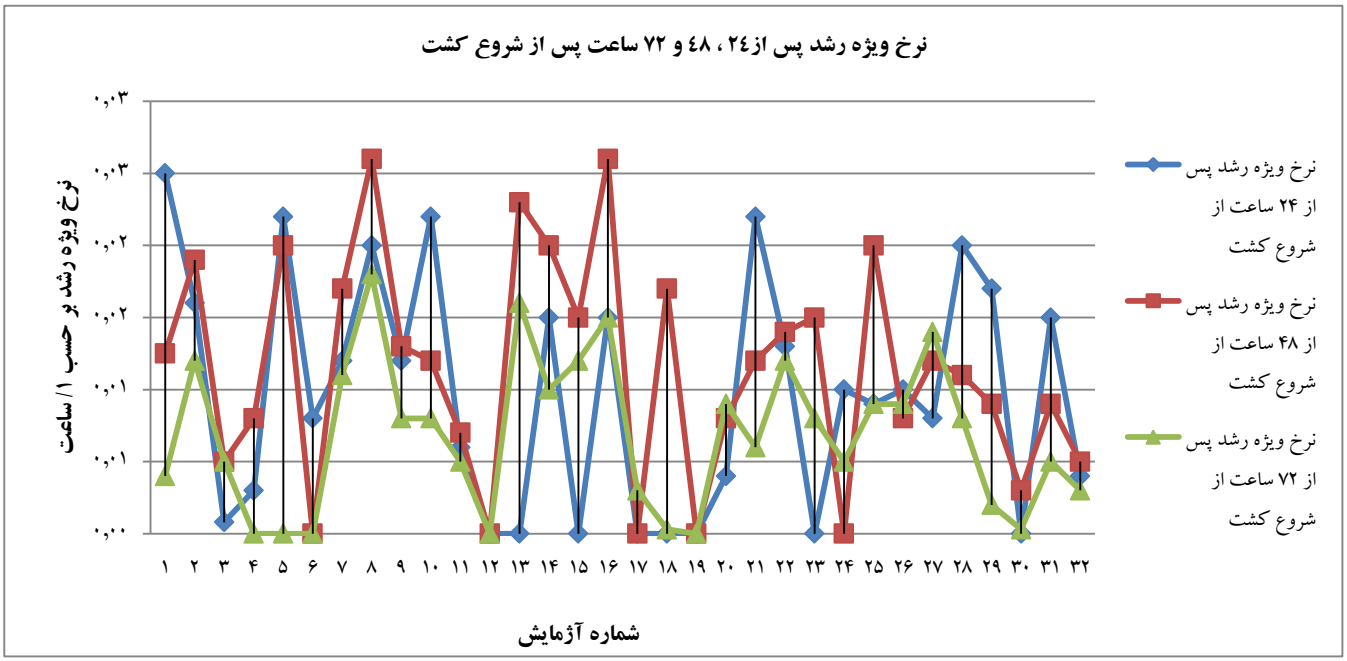


نمودار شماره۲-میزان زمان دو برابر شدن سلول کلیه نوزاد همستر و به ازای ساعت های مختلف نمونه گیری

نرخ ویژه رشد پارامتری است که نشان دهنده سرعت رشد و تکثیر سلول ها است و پر واضح است که هرچه میزان آن بیشتر باشد ، برای فرایند مطلوب تر است . به صورت عام در ۲۴ ساعت اول، نرخ ویژه رشد می بایست پایین تر از ۲۴ ساعت دوم و۲۴ ساعت سوم پس از شروع کشت باشد . دلیل این امر نیاز سلول به تطابق با محیط جدید است و به همین دلیل گاهی چند ساعت در فرایند کشت صرف این موضوع می شود . بیش ترین نرخ ویژه رشد به صورت کلی و در میان تمام آزمایشات صورت گرفته و در هر سه بازه زمانی مربوط به شماره آزمایش های ۸ و ۱۷ است که هر دوی آن ها در ۴۸ ساعت پس از شروع کشت دارای نرخ ویژه رشد بالایی بوده اند(نمودار شماره ۳) .

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار شماره۳-نرخ ویژه رشد سلول کلیه نوزاد همستر به ازای ساعت های مختلف نمونه گیری

میزان زمان دوبرابر شدن، ضریب تزاید و نرخ ویژه رشد سه پارامتری هستنند که همگی به تعداد سلول اولیه و نهایی وابسته اند.هرچه میزان ضریب تزاید و نرخ ویژه رشد بالاتر بوده و میزان زمان دو برابر شدن کمتر باشد حاکی از آن است که فرایند کشت ما بهتر صورت گرفته است. ضریب تزاید در ۲۴ ساعت اول کشت به صورت کلی دارای کمترین میزان در میان سه بازه زمانی مختلف است و بیشترین آن به صورت عمومی در ۲۴ ساعت دوم یعنی حدفاصل ۲۴ ساعت پس از شروع کشت تا ۴۸ ساعت پس از شروع کشت رخ می دهد.هم چنین بیشترین نرخ ویژه رشد نیز هم چنین وضعیتی را داراست.بر خلاف این دو بیش ترین زمان دوبرابر شدن مربوط به ۲۴ ساعت سوم یا همان حد فاصل ۴۸ ساعت پس از شروع کشت تا ۷۲ ساعت پس از شروع کشت و هم چنین ۲۴ ساعت اول کشت می باشد

بر اساس نتایج بالا که مقایسه محیط کشت بهینه سازی شده توسط طراحی آزمایش به روش تاگوچی و نمونه شاهد است ، ضریب تزاید ، زمان دو برابر شدن و نرخ ویژه رشد در جدولی به شرح ذیل مشخص می گردد. (جدول شماره ۳ و ۴)

بر اساس نتایج حاصل از آزمایشات و محاسبات صورت گرفته در تمامی پارامتر های مورد بررسی قرار گرفته و در تمامی زمان ها ، محیط کشت بهینه سازی شده توسط طراحی آزمایش برتری مناسبی نسبت به محیط کشت شاهد دارد.بالاترین ضریب تزاید در هر دو نمونه مربوط به ۷۲ ساعت پس از شروع کشت می باشد.هم چنین کم ترین زمان دو برابر شدن و بیش ترین نرخ ویژه رشد در هر دو نمونه مربوط به ۲۴ ساعت اول کشت می باشد. (جدول شماره ۵)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۳-ترکیب محیط کشت بهینه سازی شده توسط طراحی آزمایش به روش تاگوچی

نام محیط کشت	سرم گاوی تیمار شده با پلی اتیلن گلایکول (حجمی٪)	گلوکز (گرم در لیتر)	گلوتامین (گرم در لیتر)	مجموعه پروتئین ها (گرم در لیتر)	مجموعه ویتامین ها (گرم در لیتر)	مجموعه اسید های آمینه ضروری (گرم در لیتر)
بهینه سازی شده	۱۰/۰۰	۲/۰۰	۰/۵۰	۶/۰۰	۱۲/۰۰	۶/۰۰

محیط کشت ذکر شده به عنوان محیط کشت بهینه سازی شده در حقیقت بر گرفته از نتایج به دست آمده در ۳۲ آزمایش پیشنهادی توسط تاگوچی می باشد که به صورت بالا مشخص گردیده است.

جدول شماره ٤- تعداد سلول درمحیط کشت بهینه سازی شده و شاهد به ازای ساعت های مختلف نمونه گیری

شماره آزمایش	۲٤ ساعت پس از شروع کشت 10^{+6}	٤۸ ساعت پس از شروع کشت 10^{+6}	۷۲ ساعت پس از شروع کشت 10^{+6}
بهینه سازی شده	۰/۹۹	۱/۳۲	۱/۴۶
شاهد(MEM)	۰/۷۰	۱/۱۰	۱/۱۸

بر اساس مقایسه صورت گرفته بین محیط کشت متداول یا همان شاهد و محیط کشت بهینه سازی شده توسط روش تاگوچی مشاهده می شود در هر سه بازه زمانی تعداد سلول در محیط کشت بهینه سازی شده بیش از نمونه شاهد است و این خود نشان از موفقیت روش و محیط کشت جدید دارد .

جدول شماره ۵-ضریب تزاید،نرخ ویژه رشد و زمان دو برابر شدن در محیط کشت بهینه سازی شده و شاهد به ازای ساعت های مختلف نمونه گیری

پارامتر	ساعت پس از شروع کشت	بهینه سازی شده	شاهد
ضریب تزاید	۲۴	۲/۸۳	۲/۰۰
	۴۸	۳/۷۷	۳/۱۴
	۷۲	۴/۱۷	۳/۳۷
زمان دو برابر شدن	۲۴	۱۶/۰۰	۲۴/۰۰
	۴۸	۲۵/۰۶	۲۹/۰۵
	۷۲	۳۴/۹۴	۴۱/۰۶
نرخ ویژه رشد	۲۴	۰/۰۴۴	۰/۰۲۹
	۴۸	۰/۰۲۸	۰/۰۲۴
	۷۲	۰/۰۲۰	۰/۰۱۷

بحث:

بر اساس نتایج به دست آمده که در جدول شماره ۲ به صورت خلاصه نمایش داده شده است ، سه شماره آزمایش ۸، ۱۳ و ۱۶ دارای بیشترین تعداد سلول در ۷۲ ساعت پس از شروع کشت یا همان نقطه پایانی فرایند کشت هستند.هم چنین همین سه شماره آزمایش در ۴۸ ساعت پس از شروع کشت سلول دارای بیشترین تعداد سلول هستنند. اولین موردی که می توان به آن اشاره کرد افت تعداد سلول در پایان ۴۸ ساعت نسبت به تعداد سلول در پایان ۷۲ ساعت از شروع کشت است.درحقیقت تعداد سلول در ۴۸ ساعت پس از شروع کشت به صورت نسبی

www.SID.ir

Archive of SID

بیش از ۷۲ ساعت از شروع کشت است.در دو شماره آزمایش ۱۳ و ۱۶ میزان سرم تیمار شده برابر با ۱۰٪ است. سرم ها به دلیل حاوی مواد معدنی ، فاکتور های رشد و هورمون های متعدد برای رشد و تکثیر سلول بسیار مناسب هستنند.هم چنین میزان پروتئین آن ها نیز بسیار بالاست و از طرفی دیگر مقادیر زیادی ویتامین در خود دارا هستنند. به همین دلیل افزایش میزان آن ها تا مقداری قابل مشخص می تواند باعث بهبود رشد و تکثیر سلول ها شود.در دو آزمایش شماره ۸ و ۱۶ میزان گلوکز موجود در محیط کشت برابر با ۶ گرم در هر لیتر است.افزایش میزان گلوکز می تواند باعث افزایش لاکتات در فرایند کشت سلول شود. وظیفه اصلی گلوکز تامین انرژی سلول ها برای رشد و تکثیر و حیات است.هر چه سلول ها فعالیت بیشتری داشته باشند در حقیقت احتیاج بیشتری به گلوکز که منبع اصلی کربن در فرایند کشت سلول است پیدا می کنند. میزان ویتامین در آزمایشات شماره ۸ و ۱۳ برابر با ۶ گرم در هر لیتر است.عمده تاثیر ویتامین ها در فرایند تکیر سلولی است و در هنگام تکثیر هست که میزان آن ها اهمیت پیدا می کند.میزان اسید های آمینه موجود در دو شماره آزمایش ۸ و ۱۶ برابر با ۶ گرم در هر لیتر است. اسید های آمینه در تمامی فرایند های رشد و تکثیر سلول حضور فعال دارند .به همین دلیل وجود آن ها در محیط کشت الزامی است.نکته مهم در این است که در این پژوهش ار اسید های آمینه ضروری استفاده شده است و میزان آنها در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفته است.ازاین میزان اسید های آمینه می تواند باعث افزایش آمونیوم و لاکتات در محیط کشت شود.

ضریب تزاید ، نرخ ویژه رشد و زمان دو برابر شدن از مهم ترین پارامتر های سینتیک رشد سلول ها است.بررسی هر کدام از آن ها می تواند نشان دهنده رشد و تکثیر و بیانگر وضعیت سلولی باشد.بر اساس آن که هر کدام از مکمل های غذایی چه تاثیری بر روی تعداد سلول نهایی و در نتیجه بر روی ضریب تزاید ، زمان دو برابر شدن و نرخ ویژه رشد می گذارند ، میتوان وضعیت بهینه محیط کشت را با طراحی آزمایش به روش تاگوچی به دست آورد. .بر این اساس افزودن مجموعه پروتئین ها به محیط کشت که به دو صورت در این پژوهش مشخص است(خود پارامتر پروتئین و پروتئین موجود در سرم گاوی) تاثیر مثبت بر روی رشد و تکثیر سلول ها دارد و می تواند باعث کاهش زمان دو برابر شدن شود.نتیجه این پژوهش با نتیجه پژوهش دوامی و همکاران (۱۶) که بررسی اثر افزودن پپتون (نوعی پروتئین) به محیط کشت سلول CHO است همسو بوده و در هردو پژوهش پروتئین ها موثر در فرایند کشت سلول بوده اند.آزمایش شماره ۳ در ۲۴ ساعت پس از شروع کشت و همین طور در ۴۸ ساعت پس از شروع کشت دارای زمان دو برابر شدن بالایی است که این نشانه آن است که شرایط کشت در محیط کشت مرتبط با این شماره آزمایش مطلوب نیست که این می تواند ناشی از پایین بودن میزان سرم (برابر با۱٪ حجمی) باشد .در تحقیقات فنگ و همکاران که به بررسی اثر سرم و جایگزین های سرم در فرایند رشد طولانی مدت اختصاص داشته ، مشخص گردید که حضور سرم تاثیر به سزایی در رشد و تکثیر سلول ها دارد و این که آیا می توان جایگزینی برای سرم ها پیدا کرد، هم چنان نیاز به تحقیقات و مطالعات بیشتر دارد (۱۷). بیش ترین نرخ ویژه رشد در هر سه بازه زمانی مربوط به شماره آزمایش های ۸ و ۱۷ است. نکته مهم در بین این دو محیط برابر بودن میزان گلوتامین و اسید های آمینه

www.SID.ir

Archive of SID

ضروری است. میزان گلوتامین برابر با ۱ گرم در هر لیتر و میزان اسید های آمینه ضروری برابر با ۳ گرم در هر لیتر است . هرچه میزان گلوتامین در محیط کشت کاهش یابد ، به نسبت میزان متابولیت های مضر (لاکتات و آمونیوم) در محیط کشت کاهش می یابد.در این پژوهش نیز محیط کشت بهینه شده دارای گلوتامین کمتری نسبت به محیط کشت شاهد است. لی و همکاران در پژوهشی با کاهش میزان گلوتامین در طول فرایند کشت نیمه پیوسته توانستند شرایط کشت سلولHEK-293 را بهبود بخشند (۱۸).

نتیجه گیری:

کشت سلول از مهم ترین تکنیک های مورد استفاده در فرایند های بیولوژیک است و تعداد بالای سلول و درصد حیات بالای آن همواره برای محققین و صنعت گران مرتبط با این تکنیک از اهمیت خاصی برخوردار بوده است . در این پژوهش سعی شد با استفاده از محیط کشت های مختلف و به دست آوردن ضریب تزاید ،زمان دو برابر شدن و نرخ ویژه رشد ،که هر سه از مهم ترین پارامتر های بررسی سینتیکی فرایند کشت سلولی اند، بهترین شرایط ممکن برای کشت سلول کلیه نوزاد همستر در شرایط کشت سوسپانسیون به دست آید. بر اساس نتایج حاصل شده آزمایشات شماره ۸ ، ۱۳ و۱۶دارای بالاترین تعداد سلول پس از ۷۲ ساعت از شروع کشت یا همان انتهای فرایند کشت بودند. بر این اساس آزمایشات فوق دارای بهترین بازده یعنی ،بالاترین ضریب تزاید و نرخ ویژه رشد و کمترین زمان دوبرابر شدن در ۴۸ ساعت پس از شروع کشت یا همان انتهای فرایند کشت در روز دوم است.

تشکر و قدردانی:

مطالب حاضر،حاصل یاری تمامی بزرگواران حاضر در آزمایشگاه مرجع تب برفکی موسسه تحقیقاتی واکسن وسرم سازی رازی کرج بوده و از تمامی همکاران کمال تشکر را دارم.

منبع:

1. Durrani A, Mirza A, H Khan Z, Khan N, S Kulkarni S,A Ali Y.(2015). Adaptation of mammalian cell from 10% serum medium to serum free or low serum media. *International Journal of Applied Research*. **1:** 770-772
2. Harison, R.J.,(1907). Observation on Living Developing Nerve Fibers. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*.: 140–3
3. Liu, D.Y. Yang, S.J., Xi Z.F., Wu L., Chen S. Dong, S.Q. Wang, J.L. and Guo D.Z.(2012). Expression and localization of Stanniocalcin-1 in bovine osteoblasts. *Pakistan Veterinary Journal*., **32:**242–246
4. Park JH, Park HH, Park TH..(2010). Cellular engineering for the high-level production of recombinant proteins in mammalian cell systems. *Korean Journal of Chemical Engineering* . **27:**1042–1048
5. Castillo, A.A., . Morier L.D, . Perez F.V and Durruthy M.C.(1991). Use of goat serum as a substitute for calf serum for growing various primary cultures from vertebrates. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. **43:** 89–92
6. Li, W.F., Huang Q., Li Y.L., . Rajput I.R , Huang Y. and Hu C.H.(2012). Induction of probiotic strain *Enterococcus faecium* EF1 on the production of cytokines, superoxide anion and prostaglandin E2 in a macrophage cell line. . *Pakistan Veterinary Journal*. **32:** 530–534
7. Aunin¸ s˘ JG.(2010). Viral vaccine production in cell culture. In: Flickinger MC (ed) Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology. *New York, Wiley*. pp 1–35
8. Bo¨deker BGD, Newcomb R, Yuan P, Braufman A, Kelsey W .(1994) .Production of recombinant factor VIII from perfusion cultures: I. Large-scale fermentation. In: Spier RE,Griffiths JB, Berthold W (eds) Animal cell

www.SID.ir

Archive of SID

technology:Products of today, prospects for tomorrow. *Butterworth-Heinemann, UK, Oxford*.pp. 580–583

9. Bundo, M.K. and Morita K.B.(1989). Detection of Japanese encephalitis virus antigens by the sandwich ELISA in infected cell culture fluid and cell homogenates. *Tropical Medicine Nagasaki*. **31:** 49–65

10. Griffiths JB Mammalian cell culture reactors, scale-up. In: Flickinger MC (ed). (2010). Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology. *New York, Wiley*. pp 1–13

11. Arora, M..(2015) .Cell Culture Media: A Review. *University of Pittsburgh Medical Center United States*. .

12. Gómez,D, Belaich,M, Rodríguez,V and Ghiringhelli,P.(2010) .Effects of Fetal Bovine Serum deprivation in cell cultures on the production of Anti carsiagemmatalis Multinucleopolyhedro virus. *BMC Biotechnology*. **10:**68

13. Clifford W, Anellis A.(1974). Ross EEvaluation of media, time and temperature of incubation and method of enumeration of several strains for Clostridium perfringens spores. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **27:**784-92

14. Hili, C. S. and Treisman, R.(1995) .Transcriptiona1 regulation by extracellular signals: mechansims and specificity *Cell* . ***8:*** *199-211.*

15. Yang H.(1991). Selection of culture media for human and rabbit corneal epithelia. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* .**27:**351-3.

16. Davami F , Eghbalpour F , Nematollahi L , Barkhordari F, Mahboudi F.(2015) . Effects of Peptone Supplementation in Different Culture Media on Growth, Metabolic Pathway and Productivity of CHO DG44 Cells; a New Insight into Amino Acid Profiles. *Iranian Biomedical Journal* ,**19 :**194-205.

17. Fang C-Y, Wu C-C, Fang C-L, Chen W-Y,Chen C-L. (2017). Long-term growth comparison studies of FBS and FBS alternatives in six head and neck cell lines. *PLoS ONE* ***12:****e0178960.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178960.*

18. Lee Y Y , Yap M G S , Hu W S , Wong K T K.(2003) . Low-Glutamine Fed-Batch Cultures of 293-HEK Serum-Free Suspension Cells for Adenovirus Production. *Biotechnology Progress*. **19:** 501-509.

19. Li.F, Vijayasankaran.V, Shen.A, Kiss.R and Amanullah.A .(2010) . Cell culture processes for monoclonal antibody production.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 15, Issue 2, 2019

Study doubling time, Specific Growth Rate, and multiplication ratio of the Baby Hamsters Kidney 's (BHK) by Altering the Amount of Nutritional Supplementation in the Culture using Taguchi Method

M. Hasani[1*], R. Golhosseini [1] , S.M.Azimi[2], M. Ardjmand[3], H. Mahravani[2], SH. Salemi Parizi [4]

1- Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Kashan University.
2- Assistant Professor of Foot and Mouth Disease Reference Laboratory, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
3- Associate Professor, Department of Chemical Engineering, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran.
5- PhD student in Chemical Engineering, Member of the Club of Researchers and Elites, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran.
Received: 05 August 2019 *Accepted: 17 March 2020*

Abstract

Cell culture is one of the most commonly used techniques in the production of biological products. Many physical and chemical parameters factors may affect cell growth and proliferation. This research (cell culture) has been conducted under conditions of suspension culture. To optimize the nutritional supplements available in the culture medium, different methods are used, such as factor, which takes a long time and has a high error. This study Using the experimental design and Taguchi method, which is more accurate, shorter, and has fewer tests than other methods. . Using this method of experimental design, an attempt was made to optimize the culture medium used in the research. According to the number of final cells, multiplication factor, doubling time and the specific growth rate of each experiment were calculated, and the importance of each of the supplements Food and its effect on the baby hamsters kidney's (BHK) has been considered. The higher the number of ultimate cells, the more time it doubles and the special rate of growth increases, which results in all of these causes cell cultures More productive. The amount of serum added in the culture medium in this method (10%) has the most positive effect on the growth rate, doubling time and specific growth rate. Also, increasing the amount of amino acids (12 gr/li) has no effect on the growth rate, doubling time and specific growth rate.

Keywords: Doubling time, Special growth rate, Baby hamster kidney, Taguchi, culture medium

Corresponding author : Mahmoud Hassani
Address: Department of Chemical Engineering - Faculty of Engineering - Kashan University.
Tel.: +98 2632729061
E-mail: mahmoudhasani2000@gmail.com

www.SID.ir