

Učinak proteinskih hidrolizata konoplje i lana na rast, metabolizam i produktivnost CHO DP-12 stanične linije

Đurđević, Patricia

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:336573>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2021.

Patricia Đurđević

**UČINAK PROTEINSKIH
HIDROLIZATA KONOPLJE I LANA
NA RAST, METABOLIZAM I
PRODUKTIVNOST CHO DP-12
STANIČNE LINIJE**

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

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



Od srca se zahvaljujem mentoru, izv. prof. dr. sc. Igoru Slivcu i Marijanu Logarušiću, mag. ing., na uloženom vremenu i trudu, danim savjetima, dostupnosti za sva pitanja, prenesenom znanju te svoj pomoći koju su mi pružili tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Također, veliko hvala i svim ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na ugodnoj atmosferi, pomoći i pristupačnosti.

Veliko hvala mojoj obitelji, osobito mojim roditeljima, koji su podnijeli najveću žrtvu i bili mi najveća podrška tijekom studija.

Hvala Piereu na beskrajnom strpljenju, razumijevanju i svoj pruženoj ljubavi.

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 PROTEINSKIH HIDROLIZATA KONOPLJE I LANA NA RAST, METABOLIZAM I PRODUKTIVNOST CHO DP-12 STANIČNE LINIJE

Patricia Đurđević, univ. bacc. ing. biotechn.
0058208728

Sažetak: Fetalni životinjski serum najčešća je hranjiva dopuna mediju za uzgoj životinjskih stanica. Zbog njegovog porijekla te drugih ograničenja seruma, već više od trideset godina ispituju se zamjenski supstrati poput hidrolizata proteina biljaka. Cilj ovog rada je istražiti *in vitro* utjecaj proteinskih hidrolizata uljne pogače lana i konoplje na rast, vijabilnost, metabolizam i produktivnost CHO DP-12 stanične linije uzgajane u suspenziji. Pritom je ispitan utjecaj peptidnih frakcija hidrolizata veličine do 10 i do 1 kDa u koncentracijama od 0,5 i 2 g L⁻¹. Rezultati su pokazali da su ispitane frakcije hidrolizata proteina konoplje imale pozitivan učinak na produktivnost, a da na rast puno bolje utječe koncentracija hidrolizata od 0,5 g L⁻¹, dok koncentracija od 2 g L⁻¹ djeluje citotoksično na stanice. Frakcije proteina <1 kDa hidrolizata lana vrlo slabo utječu na rast i proliferaciju, no pozitivno utječu na produktivnost stanica, dok frakcije proteina <10 kDa hidrolizata lana pozitivno utječu na rast i proliferaciju stanica, ali negativno utječu na njihovu produktivnost.

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

Rad sadrži: 60 stranica, 13 slika, 5 tablica, 44 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Igor Slivac

Pomoć pri izradi: Marijan Logarušić, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (predsjednica)
2. izv. prof. dr. sc. Igor Slivac (mentor)
3. prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček (članica)
4. doc. dr. sc. Teuta Murati (zamjenska članica)

Datum obrane: 3. prosinca 2021.

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 AND FLAXSEED PROTEIN HYDROLYSATES ON GROWTH, METABOLISM, AND PRODUCTIVITY OF CHO DP-12 CELL LINE

Patricia Đurđević, univ. bacc. biotechn.
0058208728

Abstract: The usual supplement to animal cell culture medium is fetal animal serum. Due to serum's compositional shortcomings and safety concerns, the use of plant protein hydrolysates has been investigated as a potential alternative to the serum for more than thirty years. The aim of this paper is to investigate the *in vitro* effect of protein hydrolysates of flaxseed and hemp on growth, viability, metabolism and productivity of CHO DP-12 cell line grown in suspension. The influence of peptide fractions of hydrolysates up to 10 and up to 1 kDa in concentrations of 0.5 and 2 g L⁻¹ was investigated. The results showed that the tested fractions of hemp protein hydrolysates had a positive effect on productivity, and that growth was much better influenced by a hydrolysate concentration of 0.5 g L⁻¹, while a concentration of 2 g L⁻¹ has a cytotoxic effect on cells. Protein fractions <1 kDa of flax hydrolysate have very little effect on growth and proliferation, but have a positive effect on cell productivity, while protein fractions <10 kDa of flax hydrolysate have a positive effect on cell growth and proliferation, but negatively affect their productivity.

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

Thesis contains: 60 pages, 13 figures, 5 tables, 44 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, Associate professor

Technical support and assistance: *Marijan Logarušić, mag. ing.*

Reviewers:

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

Thesis defended: December 3rd, 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA.....	3
2.1.1. Uvjeti uzgoja	3
2.1.2. Faze ciklusa rasta životinjskih stanica.....	4
2.1.3. Metabolizam životinjskih stanica	5
2.1.4. CHO stanična linija	6
2.2. HRANJIVI MEDIJ	7
2.2.1. Sastav hranjivog medija	7
2.2.2. Vrste hranjivih medija	9
2.2.3. <i>Serum-free</i> hranjivi medij.....	11
2.3. BILJNI HIDROLIZATI PROTEINA U KULTURI ŽIVOTINJSKIH STANICA	14
2.3.1. Lan (<i>Linum usitatissimum</i> L.).....	15
2.3.2. Konoplja (<i>Cannabis sativa</i> L.)	16
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1. MATERIJALI	19
3.1.1. Hidrolizati uljnih pogača konoplje i lana	19
3.1.2. Kemikalije	21
3.1.3. Otopine i puferi	22
3.1.4. Uređaji i oprema	23
3.1.5. CHO DP-12 stanična linija.....	24
3.2. METODE	24
3.2.1. Uzgoj CHO DP-12 stanične linije u suspenzijskoj kulturi	24
3.2.2. Određivanje broja te vijabilnosti CHO DP-12 stanica metodom tripan-plavo.....	25
3.2.3. Mjerenje koncentracije metabolita u uzorcima hranjivog medija tijekom uzgoja CHO DP-12 stanica	27
3.2.3.1. <i>Određivanje koncentracije glukoze</i>	27
3.2.3.2. <i>Određivanje koncentracije laktata</i>	28
3.2.3.3. <i>Određivanje koncentracije amonijaka</i>	30
3.2.4. Određivanje koncentracije monoklonskog protutijela IgG u hranjivom mediju za uzgoj.....	32

3.2.5. Određivanje procesnih parametara rasta CHO DP-12 stanične linije	33
3.2.6. Obrada podataka	35
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	36
4.1. UTJECAJ PROTEINSKIH HIDROLIZATA LANA I KONOPLJE NA RAST I VIJABILNOST CHO DP-12 STANIČNE LINIJE	38
4.2. UTJECAJ PROTEINSKIH HIDROLIZATA LANA I KONOPLJE NA METABOLIZAM CHO DP-12 STANIČNE LINIJE	43
4.3. UTJECAJ PROTEINSKIH HIDROLIZATA LANA I KONOPLJE NA PRODUKTIVNOST CHO DP-12 STANIČNE LINIJE	48
5. ZAKLJUČCI	55
6. LITERATURA	56

1. UVOD

Kultura životinjskih stanica je uzgoj životinjskih stanica u kontroliranim laboratorijskim uvjetima, a od 1970-ih godina, kada je došlo do razvoja tehnologije rekombinantne DNA, do danas, ona se koristi u mnogim područjima istraživanja, prvenstveno za proizvodnju važnih biofarmaceutika. Pritom se za proizvodnju humanih terapijskih proteina najčešće koristi CHO (engl. *Chinese Hamster Ovary*) stanična linija zbog mnogih prednosti koji ju čine povoljnim domaćinom za proizvodnju istih, prvenstveno zbog lakoće adaptacije CHO stanica na suspenzijski uzgoj, što omogućuje proizvodnju tih proteina u velikom mjerilu. Naime, sve veća potreba za proizvodnjom terapijskih proteina dovela je do znatnog napretka u optimizaciji eksperimenata i razvoja tehnologija koje promoviraju visoku kvalitetu i produktivnost CHO ekspresijskih sustava. Pritom se naglasak stavio na optimizaciju hranjivog medija za uzgoj, najvažnijeg faktora u kulturi životinjskih stanica, jer stanicama osigurava sve nutrijente potrebne za rast i preživljavanje, uključujući vodu, izvore ugljika, dušika i fosfata, aminokiseline, vitamine, anorganske soli i elemente u tragovima. Jedna od komponenti koja se često dodaje u hranjivi medij je i životinjski serum, koji služi kao izvor proteina, aminokiselina, lipida, ugljikohidrata, vitamina, hormona, faktora rasta i dr. Međutim, ponukani mnogim nedostacima i rizicima životinjskog seruma, te njegovom visokom cijenom, mnogi znanstvenici zadnjih nekoliko desetljeća pokušavaju pronaći dostojnu zamjenu za serum, kako bi se smanjili troškove proizvodnje, osobito *downstream* procesa, a istovremeno povećali prinosi proizvoda. Stoga su u fokusu znanstvenika jeftinije, pristupačnije i/ili sigurnije tvari koje nisu životinjskog porijekla, a dodatkom u hranjivi medij bi trebale imati isti ili čak i bolji učinak na rast i/ili produktivnost stanica kao i životinjski serum. Primjer takvih tvari, koje se istražuju već zadnjih pedesetak godina, proteinski su hidrolizati biljnog porijekla, a dosadašnja istraživanja su pokazala mnoge pozitivne učinke na rast i/ili produktivnost uzgajanih staničnih linija, odnosno da su biljni proteinski hidrolizati potencijalno dobra zamjena za životinjski serum. Najviše istraživanja do sada provedeno je na proteinima bogatim hidrolizatima soje, pšenice, uljane repice i pamuka, zbog čega je ovaj diplomski rad izrađen u sklopu projekta HRZZ, u sklopu kojeg se istražuju utjecaji proteinskih hidrolizata pripremljenih iz uljnih pogača lana i konoplje, još nedovoljno istraženih biljaka u svrhu primjene kao alternative za serum. Naime, ekstrakcijom ulja lana odnosno konoplje iz njihovih sjemenki zaostaju velike količine jeftinog nusprodukta, uljne pogače lana odnosno konoplje, koje su bogate proteinima, lipidima i vlaknima. Stoga, korištenjem tako jeftinih i lako dostupnih sirovina u svrhu dobivanja biljnih proteinskih

hidrolizata, koji bi se koristili za optimizaciju hranjivog medija zamijenivši potrebu za životinjskim serumom, smanjila bi se ukupna cijena te poboljšala kvaliteta proizvodnog procesa.

Za istraživanje su izabrani hidrolizati proteina upravo konoplje i lana zbog mnogih dokazanih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje koje one donose, jer njihove sjemenke sadrže veliku količinu bioaktivnih te nutritivnih spojeva.

Stoga, iz svega navedenog, proizlazi cilj ovog rada – proučiti djelovanje izabranih proteinskih hidrolizata uljnih pogača konoplje i lana i njihovih peptidnih frakcija na rast, vijabilnost, metabolizam i produktivnost CHO DP-12 stanične linije, koja proizvodi rekombinanto humano protutijelo imunoglobulin G (IgG) anti IL-8. Korišteni proteinski hidrolizati dobiveni su pomoću tri komercijalna mikrobna proteolitička enzima - *Alcalase*, *Neutrase* i *Protamex*. Korišteni hidrolizati proteina konoplje ispitani su u dvije različite koncentracije od 0,5 i 2 g L⁻¹, s veličinom peptida u frakciji <10 kDa, dok su korišteni hidrolizati proteina lana ispitani u koncentraciji od 0,5 g L⁻¹, ali u dvije različite frakcije, s peptidima molarne mase <10 kDa i <1 kDa. Različite frakcije hidrolizata proteina konoplje i lana dodavane su hranjivom mediju bez seruma, dok su u kontrolnom uzorku stanice uzgajane u *serum-free* mediju bez dodatka hidrolizata, kako bi se ispitaio utjecaj hidrolizata na rast, metabolizam i produktivnost CHO stanične linije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA

Kultura životinjskih stanica definirana je kao uzgoj životinjskih stanica u kontroliranim laboratorijskim uvjetima optimalnima za pojedinu vrstu stanica. Početkom 20. stoljeća uspostavljene su prve kulture stanica sisavaca, a sredinom 20. stoljeća kultura životinjskih stanica postala je uobičajena laboratorijska tehnika (Verma i sur., 2020). 1970-ih godina došlo je do razvoja tehnologije rekombinantne DNA (tzv. genetičko inženjerstvo), što je omogućilo proizvodnju velikih kompleksnih proteina terapijske važnosti u kulturama životinjskih stanica (Clarke i Dillon, 2011).

Kultura životinjskih stanica danas se koristi u mnogim područjima istraživanja, kao model za: istraživanja osnovne biologije stanica, mehanizama staničnog ciklusa, međustaničnih interakcija, testiranje toksičnosti novih lijekova, karakterizaciju tumorskih stanica, proizvodnju cjepiva, monoklonskih protutijela, kao i mnogih lijekova, hormona, citokina (interferona, interleukina), faktora zgrušavanja i drugih biofarmaceutika (Verma i sur., 2020). Većina navedenih proteina ne mogu se proizvesti u stanicama bakterija ili kvasaca, jer se u njima proteini ne mogu pravilno posttranslacijski glikozilirati, što je potrebno kako bi bili što sličniji humanim proteinima (Popović i Pörtner, 2012).

Korištenje životinjskih stanica u proizvodne svrhe doživjelo je veliki napredak razvojem trajnih staničnih linija i razvojem uzgoja stanica u suspenziji, što je omogućilo kultivaciju životinjskih stanica u velikom mjerilu, te razvojem kemijski definiranih medija za uzgoj, koji su znatno optimirali eksperimente omogućivši visoku reproducibilnost rezultata i cijelog proizvodnog procesa. Nedostatak prvih kemijski definiranih medija bio je nužan dodatak kemijski nedefiniranog krvnog seruma životinjskog porijekla, zbog čega mnogi znanstvenici zadnjih nekoliko desetljeća istražuju optimalne zamjene za serum (Ivanić, 2020).

2.1.1. Uvjeti uzgoja

Mnoge životinjske stanice mogu se prilagoditi na rast izvan izvornog tkiva ili organa, ukoliko im se osiguraju optimalni uvjeti uzgoja, uključujući sterilnu okolinu, optimalni medij kao izvor potrebnih nutrijenata i faktora rasta, te optimalni uvjeti temperature, pH, vlažnosti,

postotka CO_2 i O_2 te osmolalnosti. Vrlo važan faktor kod uzgoja životinjskih stanica je sastav samog medija, koji se odabire prema tipu stanica koji se uzgaja, kao i prema svrsi uzgoja stanica (Verma i sur., 2020). Medij za uzgoj mora sadržavati izvor aminokiselina, vitamina, minerala i ugljikohidrata, kako bi stanice mogle sintetizirati potrebne makromolekule, te kako bi imale dovoljno energije za odvijanje metabolizma. U medij se također dodaju razni puferi odgovorni za regulaciju pH vrijednosti, koja se za uzgoj stanica sisavaca mora održavati u rasponu od 7,0 do 7,4. Osim optimiranja sastava hranjivog medija i regulacije pH vrijednosti, kulture stanica sisavaca moraju se inkubirati pri optimalnoj temperaturi ($36 - 37\text{ }^\circ\text{C}$) te optimalnom postotku CO_2 ($2 - 10\%$), ovisno o tipu stanica koji se uzgaja. Osmolalnost (osmotski tlak) medija, koja osigurava regulaciju protoka tvari unutar i izvan stanica, regulira se dodatkom odnosno uklanjanjem soli iz medija (Ryan, 2008).

2.1.2. Faze ciklusa rasta životinjskih stanica

Stanice uzgajane u kulturi pokazuju karakterističan uzorak rasta, a ukoliko su im zadovoljeni uvjeti, krivulja rasta je sigmoidalnog oblika, kako je prikazano na slici 1.



Slika 1. Općeniti prikaz krivulje rasta stanica (prema Anonymous 1, 2021)

Izgled krivulje rasta ovisi o dostupnosti hranjivih tvari, uvjetima okoline za vrijeme uzgoja, adaptaciji kulture na medij i uvjete okoline, kao i o drugim faktorima. Ona je važna za uspostavu samog protokola eksperimenta (Jelić, 2020), a iz krivulje se može izračunati i vrijeme udvostručenja populacije, koje opisuje brzine dijeljenja stanica u kulturi, a pod utjecajem je stanica koje više ne rastu ili onih koje više nisu vijabilne. Krivulja je ključna jer može poslužiti i

za kvantificiranje odgovora stanica na različite uvjete uzgoja kulture, kao što je dodatak različitih koncentracija nutrijenata i/ili hormonskih ili toksičnih komponenata u hranjivi medij (Verma i sur., 2020). Faze staničnog rasta su: lag, log (eksponencijalna), stacionarna faza i faza odumiranja.

Nakon naciepljivanja stanica u hranjivi medij, započinje lag faza rasta, u kojoj se stanice ne dijele, odnosno ne dolazi do porasta njihova broja, a ovisno o vrsti uzgajanih stanica, traje od 2 do 24 sata. Trajanje lag faze uvelike ovisi o početnoj koncentraciji naciepljenih stanica, jer što je ta koncentracija veća, lag faza će kraće trajati (Berljavac, 2019). Ova faza naziva se i fazom prilagodbe, jer se tijekom nje stanice prilagođavaju na hranjivi medij, kao i na uvjete okoline, te se pripremaju za sljedeću, log fazu. Log (eksponencijalna) faza karakterizirana je aktivnom proliferacijom te eksponencijalnim povećavanjem broja stanica. Faktori koji utječu na trajanje log faze rasta su karakteristike same stanične linije, gustoća naciepljenih stanica, uvjeti uzgoja (temperatura, pH, dostupnost kisika i nutrijenata, sastav medija i dr.). Log faza traje sve dok u mediju ima dovoljno hranjivih tvari za rast i dijeljenje i/ili dok se proizvodi metabolizma stanica ne nakupe u hranjivom mediju u koncentracijama toksičnima za same stanice, nakon čega nastupa stacionarna faza rasta (Jelić, 2020). Tijekom nje nema značajne promjene u broju stanica, jer dolazi do izjednačenja brzina rasta i odumiranja stanica. To se događa uslijed male koncentracije nutrijenata, koji su potrošeni u prethodnoj fazi rasta, te nakupljanja inhibitornih produkata metabolizma. Međutim, stacionarna faza rasta karakteristična je po tome što tokom nje nerijetko dolazi do sinteze specifičnih, korisnih produkata metabolizma (npr. terapijskih proteina), tzv. sekundarnih metabolita (Berljavac, 2019). U posljednjoj fazi (fazi odumiranja) brzina odumiranja stanica veća je od brzine rasta, zbog čega vijabilnost kulture naglo opada i sami uzgoj se zaustavlja (Jelić, 2020).

2.1.3. Metabolizam životinjskih stanica

Metabolički put definiran je kao niz povezanih kemijskih reakcija kojima se jedna vrsta molekula prevodi u drugu molekulu (ili molekule). Katabolički putevi su oni putevi kojima stanica na račun razgradnje molekula makronutrijenata (ugljikohidrata, lipida, proteina i nukleinskih kiselina) dobiva energiju potrebnu za mehanički rad, aktivni transport molekula i iona kroz membrane, pojačavanje signala, prijenos genetičke informacije te odvijanje anaboličkih procesa. S druge strane, anabolički putevi su metabolički putevi kojima se iz

jednostavnijih molekula (aminokiselina, monosaharida, masnih kiselina i dušikovih baza), tzv. prekursora, uz utrošak energije sintetiziraju stanične makromolekule. Metabolizam je, stoga, skup svih metaboličkih (kataboličkih i anaboličkih) puteva koji se odvijaju u stanici, a koji su katalizirani brojnim enzimima te pritom strogo regulirani (Teparić, 2017).

Kulture stanica sisavaca od velike su važnosti u farmaceutskoj industriji, zbog sposobnosti proizvodnje rekombinantnih proteina, monoklonskih protutijela i cjepiva. Tako je većina bioterapeutika proizvedena pomoću staničnih linija sisavaca, kao što je na primjer CHO (engl. *Chinese Hamster Ovary*) stanična linija (Ahn i Antoniewicz, 2011). Opsežnim istraživanjima navedene stanične linije unazad više od 3 desetljeća, metaboličke potrebe, kao i proizvodi metabolizma CHO stanične linije vrlo su dobro okarakterizirani. Kod uzgoja CHO stanica, karakteristična je ubrzana potrošnja primarnih izvora ugljika i energije (glukoze i glutamina) (Kelly i sur., 2018), što rezultira akumulacijom velike količine laktata i amonijaka uslijed pretvorbe glukoze u laktat, odnosno uslijed razgradnje i metaboliziranja glutamina. Akumulirani metabolički nusproizvodi često inhibiraju stanični rast i proizvodnju proteina, te mogu smanjiti kvalitetu glikozilacije proteina (Ahn i Antoniewicz, 2011), zbog čega je važno pratiti njihove koncentracije tokom uzgoja stanične kulture.

2.1.4. CHO stanična linija

CHO (engl. *Chinese Hamster Ovary*) staničnu liniju uspostavio je T. Puck 1957. godine iz ovarija kineskog hrčka (*Cricetus griseus*), te danas predstavlja najčešće korištenu staničnu liniju sisavaca u biološkim i medicinskim istraživanjima, prvenstveno za proizvodnju humanih terapijskih proteina (Du i Webb, 2011). Neke od prednosti CHO stanične linije koje ju čine povoljnim domaćinom za proizvodnju terapijskih proteina uključuju: dobar rast u kemijski definiranoj i *serum-free* suspenzijskoj kulturi, sposobnost ekspresije rekombinantnih proteina sa posttranslacijskim modifikacijama sličnim humanima, lako uvođenje gena od interesa metodama genetičkog inženjerstva te sposobnost ekspresije tih gena u dovoljnim količinama te u zadovoljavajućoj kvaliteti za humanu upotrebu (Fischer i sur., 2015). Karakteristika CHO stanica da se mogu lako adaptirati na *serum-free* suspenzijski uzgoj vrlo je poželjna za njihov uzgoj i proizvodnju proteina u velikom mjerilu. Naime, rekombinantne CHO stanice koje proizvode bioterapeutike već se više od 10 godina uzgajaju u *serum-free* suspenzijskim kulturama u

bioreaktorima volumena većim od 10000 L (Kim i sur., 2012). Prvi rekombinantni protein sintetiziran pomoću CHO stanica odobren je od strane FDA (engl. *U.S. Food and Drug Administration*) 1987. godine, te su od tada mnogi proizvodi dobiveni na taj način odobreni za kliničku upotrebu (npr. eritropoetin, interferon- β , krvni faktori VIII i IX, razna monoklonska protutijela, i dr.) (Du i Webb, 2011).

Sve veća potreba za proizvodnjom terapijskih proteina dovela je do znatnog razvoja tehnologija koje promoviraju visoku kvalitetu i produktivnost CHO ekspresijskih sustava. Naime, industrijski procesi proizvodnje biofarmaceutika razvijaju se u smjeru povećanja prinosa proizvoda te smanjenja troškova ukupne proizvodnje, što se postiže poboljšavanjem karakteristika rasta, odnosno poboljšavanjem proliferacije stanica i/ili postizanjem veće maksimalne gustoće vijabilnih stanica. To se najčešće postiže optimizacijom hranjivog medija i drugih parametara bioprocesa te metodama genetičkog inženjerstva (Fischer i sur., 2015). Naime, jedan od nedostataka korištenja staničnih linija sisavaca za proizvodnju proteina je niska specifična produktivnost, no u CHO stanicama taj nedostatak savladan je mogućnošću amplifikacije gena. Za CHO stanice postoje već razvijeni sustavi amplifikacije gena, kao što je na primjer amplifikacija posredovana glutamin sintetazom (GS), te amplifikacija posredovana dihidrofolat – reduktazom (DHFR) (Kim i sur., 2012). Upravo zbog lakoće provođenja metoda genetičkog inženjerstva na CHO stanicama, iz originalne CHO stanične linije napravljeni su mnogi klonovi koji su sposobni stabilno eksprimirati gen od interesa u dovoljnim prinosima i zadovoljavajućoj kvaliteti za humanu uporabu, a koji pogoduju različitim istraživanjima (Fischer i sur., 2015).

2.2. HRANJIVI MEDIJ

2.2.1. Sastav hranjivog medija

Hranjivi medij najvažniji je faktor u tehnologiji staničnih kultura, jer njegov sastav utječe na preživljenje i proliferaciju stanica te stanične funkcije, zbog čega je u istraživanjima sa staničnim kulturama vrlo važno izabrati medij prikladan za potrebe pojedinog eksperimenta (Yao i Asayama, 2017). Naime, svaki hranjivi medij za uzgoj staničnih kultura zahtijeva gotovo iste hranjive tvari, esencijalne za rast i preživljenje stanica, uključujući vodu, izvore ugljika, dušika i fosfata, pojedine aminokiseline, masne kiseline, vitamine, anorganske soli i elemente u tragovima (Ritacco i sur., 2018).

Voda je vrlo važan sastojak hranjivog medija, te u svrhu uzgoja stanica sisavaca, ona mora biti vrlo dobro pročišćena, kako elementi u tragovima, razne bakterije i endotoksini ne bi kontaminirali staničnu kulturu.

Uz vodu, drugi najvažniji sastav hranjivog medija je izvor ugljika, koji je ujedno i izvor energije. Naime, u većini formulacija medija, osobito u kemijski definiranim medijima za uzgoj CHO stanične kulture, u tu svrhu koristi se glukoza. CHO stanice glikolizom prevode glukozu u piruvat, koji se zatim oksidira u ciklusu limunske kiseline, no u češćem slučaju dolazi do nakupljanja piruvata i povećanja koncentracije laktata, koji u velikim koncentracijama može inhibitorno djelovati na stanični rast. Stoga su provedena mnoga istraživanja u svrhu pronalaska alternativnih izvora ugljika i energije, uključujući istraživanja s galaktozom, manozom, fruktozom i drugim heksozama, no dosadašnji rezultati također nisu bili obećavajući. Nadalje, osim navedenih šećera, kao izvor energije u CHO staničnim kulturama također se koristi i glutamin, koji se metabolizira glutaminolizom, nakon čega ulazi u ciklus limunske kiseline kao α -ketoglutarat. Glutamin je esencijalan u mediju za uzgoj CHO stanične kulture jer poboljšava vijabilnost stanica, reducira proizvodnju laktata, povećava produktivnost te u njegovoj odsutnosti dolazi do odgode eksponencijalne faze rasta. Međutim, njegov nedostatak je taj što njegovom razgradnjom tijekom glutaminolize osim glutamata nastaje i amonijak, koji u visokoj koncentraciji može usporiti rast stanica te utjecati na stanično iskorištavanje drugih aminokiselina prisutnih u mediju. Zbog navedenih nedostataka, provode se razna istraživanja za optimizaciju medija, u kojem bi koncentracija glutamina bila znatno manja, ili bi glutamin bio zamijenjen nekim drugim tvarima (npr. alanil-glutaminom ili glicin-glutaminom), kako bi se usporio metabolizam glutamina (Ritacco i sur., 2018).

Aminokiseline su strukturni elementi proteina te su stoga važni sastojci svih hranjivih medija za uzgoj stanica. Esencijalne aminokiseline, koje stanice ne mogu sintetizirati, ključne su za proliferaciju stanica, te njihova koncentracija u mediju određuje maksimalnu gustoću stanica koja se može postići u određenoj kulturi. Osim esencijalnih, u hranjivi medij mogu se dodati i neesencijalne aminokiseline, u svrhu dohranjivanja onih koje su potrošene tokom staničnog rasta, što posljedično stimulira stanični rast i produljuje vijabilnost stanica. Nadalje, osim aminokiselina, u hranjive medije, osobito u *serum-free* medije, često se dodaju i razni peptidi i proteini, kao što su albumin, transferin i fibronektin.

Vitamini su također sastavni dio hranjivih medija, jer su mnogi od njih esencijalni za rast i proliferaciju stanica, osobito vitamini B skupine. Oni su važni dodaci mediju jer se u stanicama ne mogu sintetizirati u potrebnim količinama. Osim vitamina, za mnoge biološke procese u

stanicama ključan je dodatak malih količina ($< 5 \mu\text{M}$) elemenata u tragovima, kao što su bakar, cink, željezo, mangan, molibden, selenij i drugi. Nadalje, ključan je dodatak i anorganskih soli u medij, kao izvora natrijevih, kalijevih i kalcijevih iona, koji omogućuju održavanje osmotske ravnoteže te pomažu u regulaciji membranskog potencijala (Arora, 2013).

Uz navedene tvari, u hranjivi medij često se dodaju i razni suplementi, koji dodatno pospješuju rast i/ili produktivnost, ili služe kao zaštita od kontaminacije. U tu svrhu u hranjivi medij mogu se dodati antibiotici, koji kontroliraju rast mikrobnih i fungalnih kontaminanata, no nije preporučljiva njihova rutinska upotreba u staničnim kulturama, s obzirom na to da mogu maskirati kontaminaciju od strane mikoplazma i otpornih bakterija. Nadalje, tvari koje se često dodaju u hranjivi medij za pospješivanje rasta i produktivnosti stanica su faktori rasta. To su obično peptidi, mali proteini i hormoni, koji se ponašaju kao signalne molekule koje utječu na stanični rast, proliferaciju, oporavak stanica i diferencijaciju, te je bez njih u mnogim slučajevima stanični rast ili znatno inhibiran ili potpuno zaustavljen. Veliki broj faktora rasta sadržan je u životinjskom serumu, a u *serum free* medije dodaje se mali broj specifičnih faktora rasta, što znatno smanjuje kompleksnost formulacije samog hranjivog medija (Ritacco i sur., 2018).

2.2.2. Vrste hranjivih medija

Hranjivi medij najvažniji je faktor u kulturi stanica, zbog čega kvaliteta istoga izravno utječe na rezultate istraživanja. Stoga je nužno da znanstvenici koji rade s kulturama stanica znaju odabrati hranjivi medij prikladan za potrebe njihova istraživanja, pritom poznajući svojstva i sastav korištenog medija (Yao i Asayama, 2017).

Životinjske stanice mogu se uzgajati u potpuno prirodnim hranjivim medijima, koji sadrže isključivo biološke tekućine prirodno prisutne u organizmu, no već dugi niz godina one se prvenstveno uzgajaju u sintetskim hranjivim medijima, uz dodatak pojedinih prirodnih produkata (Arora, 2013). Sintetski hranjivi mediji mogu se podijeliti u nekoliko kategorija, koje su navedene i opisane u tablici 1.

U prirodne medije spadaju biološke tekućine (npr. plazma, serum, limfa i dr.), ekstrakti raznih tkiva (npr. jetre, slezene, koštane srži) te razni koagulansi ili ugrušci (plazma odvojena od heparinizirane krvi, seruma i fibrinogena) (Yao i Asayama, 2017). Oni su vrlo korisni i prikladni

za širok spektar kultura životinjskih stanica, no njihov glavni nedostatak je slaba reproducibilnost rezultata zbog nepoznavanja točnog sastava takvog hranjivog medija (Arora, 2013). Nadalje, kompleksna i nedefinirana priroda bioloških tvari sadržanih u prirodnim hranjivim medijima u većini slučajeva rezultira velikom varijabilnošću od šarže do šarže, povećanim rizikom od kontaminacije te nemogućnošću određivanja minimalnih količina specifičnih hranjivih sastojaka potrebnih za rast stanica u takvom mediju (Ritacco i sur., 2018). Upravo zbog navedenih nedostataka prirodnih hranjivih medija, s vremenom su razvijeni sintetski mediji, koji su pripravljeni dodatkom organskih i anorganskih hranjivih tvari, vitamina, soli, kisika i ugljikova dioksida, proteina seruma, ugljikohidrata, kofaktora i dr., u količinama ovisno o vrsti stanica koje se uzgajaju i svrsi njihova uzgoja (Arora, 2013).

Tablica 1. Vrste sintetskih hranjivih medija za uzgoj životinjskih stanica (prema Yao i Asayama, 2017)

Kategorija	Definicija	Tip	Primjer
Sintetski hranjivi mediji	sastavljeni su od osnovnog (bazalnog) medija i dodataka, kao što su serum, faktori rasta i hormoni	hranjivi medij sa serumom	dodatak humanog, goveđeg, konjskog ili nekog drugog seruma
		<i>serum-free</i> hranjivi medij	dodatak sirovih proteinskih frakcija, kao na primjer goveđeg serum albumina, ili α - ili β - globulina
		<i>protein-free</i> hranjivi medij	dodatak nedefiniranih komponenti, kao na primjer peptidnih frakcija (proteinskih hidrolizata)
		kemijski definirani hranjivi medij	umjesto nedefiniranih komponenti (npr. sirovih proteinskih frakcija, hidrolizata i ekstrakata tkiva), dodaju se visoko pročišćene komponente (npr. rekombinantni proteini)

2.2.3. Serum-free hranjivi medij

Serum je kompleksna biološka smjesa, koja se u hranjive medije obično dodaje u koncentraciji od 2 do 10 %, a služi kao izvor aminokiselina, proteina (npr. albumina, transferina, fibronektina i dr.), lipida, ugljikohidrata, vitamina (osobito onih topljivih u mastima), hormona, faktora rasta, minerala (npr. Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Fe^{2+} i dr.) i elemenata u tragovima. Naime, komponente seruma služe brojnim funkcijama u hranjivim podlogama: faktori rasta i hormoni iz seruma potiču rast stanica u kulturi, proteini seruma zaslužni su za vezanje stanica za supstrat i njihovo širenje po podlozi te transport molekula u stanice, a inhibitori proteaza štite stanicu od proteolize. Osim navedenih karakteristika, serum također povećava viskoznost hranjivog medija, što štiti stanice od nastanka mehaničkih oštećenja uslijed miješanja suspenzijskih kultura te pipetiranja, te poboljšava puferirajući kapacitet hranjivog medija (Arora, 2013). Danas se od seruma najviše koristi FBS (engl. *fetal bovine serum*), a osim njega i CS (engl. *calf serum*) te HS (engl. *horse serum*) (Yao i Asayama, 2017).

Međutim, unatoč mnogim nabrojenim prednostima uporabe seruma u hranjivim podlogama, serum ima i brojne negativne karakteristike. Naime, serum nema ujednačeni sastav, predstavlja povećani rizik od kontaminacije kulture, potrebno je testirati svaku šaržu prije upotrebe, serum može sadržavati i neke od faktora inhibicije rasta, te njegova prisutnost u hranjivom mediju može znatno otežati, produljiti i poskupjeti proces izolacije i pročišćavanja produkata stanične kulture (Arora, 2013). Nadalje, serum ima i ograničenu dostupnost te visoku cijenu, zbog čega se serum danas sve više smatra nepoželjnim za uporabu u industrijskoj primjeni staničnih kultura, i s procesnog i s regulatornog stajališta (Ritacco i sur., 2018).

Povedeni brojnim nedostacima uporabe seruma u hranjivim medijima za uzgoj staničnih kultura, znanstvenici su razvili hranjivi medij bez seruma (engl. *serum-free media*), pritom istraživši mnoge potencijalne alternative za serum. Naime, za razliku od hranjivog medija sa serumom, *serum-free* hranjivi medij ima definirani sastav, što osigurava visoku reproducibilnost rezultata, te se sami proces uzgoja u takvim hranjivim medijima može sigurnije, odnosno točnije pratiti. Podgrupe *serum-free* hranjivih medija, kao što su *protein-free* hranjivi medij i kemijski definirani hranjivi medij, osiguravaju dodatnu stabilnost i reproducibilnost sustava staničnih kultura, što posljedično olakšava identifikaciju staničnih izlučevina te smanjuje rizik od mikrobne kontaminacije (Yao i Asayama, 2017). Međutim, glavni izazov kod pripreme *serum-free* hranjivih medija je pronalazak serumu ekvivalentnih faktora za promoviranje rasta stanica, jer potreba za takvim faktorima značajno varira između staničnih linija, pa čak i različiti klonovi

iste stanične linije mogu imati različite zahtjeve za optimalni rast. Stoga je nemoguće dizajnirati univerzalnu formulaciju *serum-free* hranjivog medija, koja bi bila prikladna zamjena za serum za sve stanične linije (Butler, 2013). Dakle, u slučajevima kada primjena seruma u hranjivim medijima nije prikladna ili poželjna za uzgoj staničnih kultura, znanstvenici se mogu odlučiti za jednu od nekoliko već postojećih zamjena za serum (tablica 2).

Tablica 2. Karakteristike i ograničenja zamjena za serum (*prema* Yao i Asayama, 2017)

Alternative za serum	Primjeri	Karakteristike	Ograničenja
Ekstrakti seruma i tkiva	proteini iz FBS, ekstrakt goveđe hipofize	sadrže brojne komponente iz seruma ili tkiva te pozitivno utječu na stanično preživljenje i proliferaciju	nedefiniranog su sastava, stoga i velike varijabilnosti među šaržama te pružaju visoki rizik od kontaminacije
Hidrolizati	životinjskog porijekla (životinjska tkiva, mlijeko), mikrobnog porijekla (kvasci), biljnog porijekla (soja, pšenica, riža)	izvor su vitamina, lipida, minerala, malih peptida i aminokiselina, olakšan je <i>downstream</i> procesa, vrlo niska cijena u odnosu na serum	nedefiniranog su sastava, velike varijabilnosti među šaržama te pružaju visoki rizik od kontaminacije
Faktori rasta	epidermalni, fibroblastni, inzulinu sličan faktor rasta i dr.	u malim količinama induciraju proliferaciju, diferencijaciju, migraciju, izlučivanje i unos tvari	faktori rasta porijeklom od životinja predstavljaju rizik od kontaminacije virusima
Hormoni	hormon rasta, inzulin, hidrokortizon, trijodtironin, estrogen, androgeni, progesteron, prolaktin i dr.	hormon rasta i inzulin bitni su za pojačavanje proliferacije stanica, dok su hidrokortizon, prolaktin i mnoge kombinacije estrogena, progesterona i androgena nužni za održavanje epitela sisavaca	inzulin je nestabilan pri 37 °C (mora se u hranjivi medij dodati u većim koncentracijama), te mu je za biološku aktivnost potreban cink; hidrokortizon djeluje kao inhibitor rasta u kulturama velike gustoće

Tablica 2. Karakteristike i ograničenja zamjena za serum - *nastavak* (prema Yao i Asayama, 2017)

Alternative za serum	Primjeri	Karakteristike	Ograničenja
Proteinski nosači	albumin, transferin, laktoferin i dr.	albumin: nosač mnogih tvari (lipida, bakra i nikla, nekih aminokiselina i vitamina), neutralizira toksine, djeluje antiksidativno te smanjuje smični pritisak; transferin se koristi kao nosač željeza, a laktoferin može poslužiti kao zamjena za transferin	ukoliko je albumin izoliran iz seruma, postoji rizik od kontaminacije (virusima), te količina lipida i elemenata u tragovima vezanih za albumin dosta varira; transferin koji je izoliran iz seruma sadrži komponente svinjskog, goveđeg i humanog porijekla

Kratice: *FBS-fetalni goveđi serum (engl. *Fetal Bovine Serum*)

Postojeće zamjene za serum, od kojih su neke navedene u tablici 2, uključuju ekstrakte seruma i tkiva, hidrolizate, hormone, faktore rasta, proteinske nosače, vitamine, adhezijske faktore, zaštitne aditive, deterdžente, lipide, prijelazne metale, poliamine, reducense i druge. Broj kombinacija ovih suplemenata gotovo je neograničena te oni često stupaju u međusobne interakcije. Međutim, kao što je već natuknuto, upravo beskonačnost kombinacija zamjenskih komponenata za serum predstavlja problem pri pripravi *serum-free* hranjivih medija, jer njihov odabir i kombiniranje zahtijevaju veliki trud, veliki trošak i puno vremena (Yao i Asayama, 2017).

2.3. BILJNI HIDROLIZATI PROTEINA U KULTURI ŽIVOTINJSKIH STANICA

Zbog nedostataka uporabe seruma u staničnim kulturama, detaljno opisanih u prethodnom poglavlju, pojavili su se sve veći zahtjevi regulatornih tijela za uporabom *serum-free* hranjivih medija i u istraživačkim laboratorijima i u industrijskoj proizvodnji, kako bi se osigurala dosljednost izvedbe, smanjila varijabilnost od šarže do šarže te minimizirao rizik od kontaminacije konačnih proizvoda prionima ili virusima. Naime, prve formulacije *serum-free* hranjivih medija sadržavale su inzulin, transferin, albumin i kolesterol, no njihov je nedostatak i dalje bio prisutnost komponenata životinjskog porijekla, te relativno visok udio proteina. Stoga su se razvili *protein-free* hranjivi mediji, u kojima su proteini zamijenjeni komponentama manje molarne mase, kao što su peptidi, hormoni te anorganske soli, te hranjivi mediji koji sadrže samo rekombinantne proteine i proteinske hidrolizate koji nisu životinjskog porijekla (engl. *animal-derived component-free*, ADCF). Peptidni hidrolizati biljnog ili mikrobiološkog porijekla, koji se uvelike koriste u prehrambenoj industriji, s vremenom su postali i vrijedni izvori komponenata koje nisu životinjskog porijekla, a potiču rast stanica sisavaca (Butler, 2013).

Proteinski hidrolizati su, prema definiciji, proizvodi dobiveni kiselinskom, bazičnom ili enzimskom hidrolizom proteina, što uključuje slobodne aminokiseline, minerale, vlakna, ugljikohidrate, lipide i neke druge komponente nepoznate biološke aktivnosti. Naime, sve veći napredak u tehnologiji njihove proizvodnje omogućio je njihovu primjenu u mnogim područjima znanosti i industrije, kao što su medicina, agrikultura, proizvodnja rekombinantnih proteina, dijagnostici hranjivih medija, bioremedijaciji, industrijskim fermentacijama, i drugo. U biotehnologiji su proteinski hidrolizati naročito korisni kod proizvodnje monoklonskih protutijela, peptida i terapijskih proteina (Pasupuleti i sur., 2010).

Naime, hidrolizati proteina biljnog porijekla istražuju se i koriste već posljednjih pedesetak godina u svrhu smanjenja ili potpunog ukidanja uporabe FBS u bazalnom hranjivom mediju, kao što je DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*). Obično se dobivaju enzimatskom ili kiselinskom razgradnjom biljnih supstrata, od kojih se najčešće upotrebljavaju oni bogati proteinima, kao što su npr. sjemenke soje, suncokreta, sezama, pamuka i uljane repice. S obzirom na to da su proizvodi hidrolize mnogobrojni i za neke se ne zna njihova biološka aktivnost, nužno je prije njihove primjene u hranjivom mediju eksperimentalno odrediti dozu korištenog hidrolizata prikladnu za sastav hranjivog medija koji se upotrebljava, a koja može pozitivno utjecati na stanični rast, staničnu vijabilnost i/ili proizvodnju rekombinantnih proteina (Logarušić i sur., 2021).

2.3.1. Lan (*Linum usitatissimum* L.)

Lan je jednogodišnja biljka, koja stvara lanene sjemenke (slika 2) zlatno-žute do crvenkasto-smeđe boje (Lan i sur., 2020), a uglavnom se uzgaja u Kanadi, središnjoj Aziji, Egiptu, Mediteranskim zemljama i u južnoj Europi (Akbar, 2020). Sjemenke lana sadrže 3 – 4 % pepela, 30 – 41 % masnoće, 20 – 35 % prehrambenih vlakana te 18 – 30 % proteina. Lan se uglavnom uzgaja u svrhu dobivanja lanenog ulja, koje čini 32 – 45 % mase sjemenki (Parikh i sur., 2018), jer ono sadrži visoki udio (~ 55 %) α -linolenske kiseline (engl. *α -linolenic acid*, ALA), ω -3 polinezasićene masne kiseline vrlo korisne za ljudsko zdravlje (Lan i sur., 2020). Osim ALA, lanene sjemenke sadrže i druge bioaktivne komponente, uključujući oleinsku, linolensku i linoleinsku kiselinu te fenolske kiseline (Akbar, 2020), lignane, cikličke peptide, cijanogene glikozide, topljiva i netopljiva vlakna te lanene proteine, koji su bogati argininom. Nadalje, lignane iz lanenih sjemenki crijevne anaerobne bakterije metaboliziraju do slobodnih bioaktivnih lignana sisavaca, elektrolaktona i enterodiola. Upravo zbog toga što su lanene sjemenke bogate bioaktivnim komponentama, već više od dva desetljeća znanstvenici istražuju njihove korisne učinke za ljudsko zdravlje (Parikh i sur., 2018). Kao rezultat mnogih istraživanja, dokazano je da laneno ulje utječe pozitivno na ljudsko zdravlje, tako što smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti, raznih upala i progresije tumora, pomaže u liječenju simptoma dijabetesa i osteoporoze, pozitivno utječe na održavanje koncentracije lipida u krvi, štiti jetru i bubrege, ublažava simptome artritisa te igra ulogu u održavanju živčanih funkcija i metaboličke aktivnosti moždanog tkiva (Tang i sur., 2021).



Slika 2. Cvijet i sjemenke lana (Anonymous 2, 2021)

Osim ulja, procesom ekstrakcije ulja iz lanenih sjemenki kao nusproizvod nastaje i tzv. uljna pogača, koja je u ovom radu poslužila kao supstrat za izolaciju i hidrolizu proteina lana. Naime, uljne pogače lana bogate su prehranbenim vlaknima, lipidima te proteinima (20 - 30 %), koji su bogati argininom, glutamatom, lizinom, leucinom i valinom. Pritom je aminokiselinski sastav proteinskog izolata lana vrlo sličan onome kod proteinskih izolata sirutke i soje, koji se također koriste kao dodaci hranjivim medijima u obliku hidrolizata. Peptidi i peptidne frakcije dobivene razgradnjom proteina sjemenki lana pokazuju visoku antioksidativnu aktivnost, što može biti korisno za stanice koje rastu *in vitro* (Logarušić i sur., 2021).

2.3.2. Konoplja (*Cannabis sativa* L.)

Cannabis sativa L. (slika 3) je jednogodišnja, globalno rasprostranjena biljka, koja raste na raznim staništima, nadmorskim visinama te uvjetima tla i klime, odnosno od tropskih područja pa sve do podnožja planina. Stoga je teško točno odrediti od kuda točno potječe, no pretpostavlja se da potječe iz središnje Azije (točnije Kine), gdje se prvenstveno uzgajala u svrhu proizvodnje prehranbenih i tekstilnih vlakana, nakon čega se njezin uzgoj proširio na Bliski Istok, Europu i Južnu Ameriku početkom 16. stoljeća, a u Sjevernu Ameriku uvezena je tek stoljeće kasnije. *Cannabis* je biljka koja se od davnina koristi u medicinske svrhe, pri čemu su prvi zapisi o tome zabilježeni još iz 6. stoljeća prije Krista, a u Zapadnoj Europi se za liječenje mnogih bolesti i stanja počela koristiti tek početkom 19. stoljeća. Naime, *Cannabis sativa* danas se koristi u liječenju/ublažavanju simptoma bolova, reume, glaukoma, mučnine, migrene, depresije, neuralgije, multiple skleroze, tetanusa, epilepsije, astme, umora, nesаницe i dr. Osim terapijskog učinka, ova biljka vrlo je korisna i u tekstilnoj industriji (vlakna) te u prehrambenoj industriji (Frassinetti i sur., 2018; Chandra i sur., 2017).

Cannabis je jedini rod porodice *Cannabaceae* (Chandra i sur., 2017), a taksonomski se teško može odrediti koliko rod *Cannabis* zapravo ima vrsta. Međutim, nakon dugoročnih debata, većina znanstvenika se usuglasila da postoji samo jedna, vrlo raznolika vrsta, *Cannabis sativa* L., čiji su najpoznatiji varijeteti *C. sativa*, *C. indica* i *C. ruderalis*. Pritom su *sativa* i *indica* ekonomski važniji i globalno rasprostranjeniji varijeteti, dok varijetet *ruderalis* više raste u obliku korova, rijetko se uzgaja u proizvodne svrhe, a raste uglavnom na sjeveru Himalaje te u južnim državama bivšeg Sovjetskog Saveza (ElSohly i sur., 2017).



Slika 3. Industrijska konoplja (*Cannabis sativa*) (Chandra i sur., 2017)

Sojevi biljke *Cannabis sativa* obično se dijele na tri fenotipa: fenotip 1 (vrsta droge), koji ima visoki udio ($> 0,5\%$) $\Delta 9$ -tetrahidrokanabinola (engl. *$\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol*; $\Delta 9$ -THC) te niski udio ($< 0,5\%$) kanabidiola (engl. *cannabidiol*; CBD); fenotip 2 (umjereni tip), u kojem je CBD prisutan kao glavni kanabinoid, dok je THC prisutan u različitim koncentracijama; te fenotip 3 (vlaknasti tip, industrijska konoplja), koji sadrži vrlo mali udio THC-a (Chandra i sur., 2017).

Cannabis sativa vrlo je zanimljiva biljka brojnim znanstvenicima upravo zbog toga što proizvodi veliki broj bioaktivnih metabolita jedinstvenih struktura i fizikalno-kemijskih svojstava, pri čemu su najvažniji i najviše istraženi kanabinoidi i terpenoidi. Naime, do danas je iz biljke *Cannabis* izolirano oko 600 metabolita, od kojih više od 20% čine kanabinoidi, od kojih su najvažniji psihoaktivni $\Delta 9$ -THC te CBD, koji nema psihoaktivni učinak. Nadalje, osim proizvodnje bioaktivnih metabolita, ova biljka je i bogat izvor celuloznih i drvenastih vlakana. Stoga su proizvodi ove biljke od poprilične važnosti u mnogim sektorima, prvenstveno u medicini te kozmetičkoj, tekstilnoj i prehrambenoj industriji (Aliferis i Bernard-Perron, 2020).

Naime, zbog psihoaktivnog učinka THC-a, danas u većini Europskih zemalja postoji gornja granica za uzgoj konoplje za proizvodnju vlakana i sjemenki, pri čemu ona iznosi 0,2 % po masi suhe tvari. Sjemenke konoplje danas se prvenstveno koriste kao krmivo, ali proizvodi koji se dobivaju iz sjemenki (ulje, brašno, uljna pogača, proteinski prah) sve se više primjenjuju u ljudskoj prehrani jer su prirodni izvor nutrijenata, te sadrže sve esencijalne aminokiseline i masne kiseline u količinama i omjerima dovoljnim za prehrambene potrebe ljudi. Sjemenke konoplje sadrže 25 - 35 % lipida, 20 – 25 % proteina, 20 – 30 % ugljikohidrata, 10 – 15 % netopljivih vlakana te su bogate vitaminom E (90 mg/100 g) i mineralima, uključujući fosfor, magnezij, kalij, natrij, sumpor, cink, željezo i kalcij. U sjemenkama konoplje više od 30 % sačinjava ulje, koje je bogato polinezasićenim masnim kiselinama, prvenstveno linoleinskom (ω -6) i linolenskom (ω -3) kiselinom. Naime, u ulju konoplje omjer ω -6 i ω -3 masnih kiselina je 3:1, što se smatra optimalnim omjerom za ljudsko zdravlje, a mnoga istraživanja su pokazala da navedene masne kiseline imaju pozitivne učinke na agregaciju trombocita, ishemičnu bolest srca i druge aspekte kardiovaskularnog zdravlja. Nadalje, mnoga istraživanja su pokazala i da hidrolizati proteina iz sjemenki konoplje snižavaju krvni tlak te imaju antioksidativno djelovanje (Frassinetti i sur., 2018).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Hidrolizati uljnih pogača konoplje i lana

Hidrolizati uljnih pogača konoplje i lana, tj. njihove peptidne frakcije korištene u ovom radu navedene su u tablici 3. Navedene frakcije pojedinačno su dodane kompletnom PowerCHO mediju te svaka od njih ima pridružen broj uzorka u koji je dodana. Iste su pripremljene u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, te su do trenutka upotrebe u pojedinim eksperimentima čuvane na temperaturi od -80 °C.

Početna sirovina za pripremu hidrolizata proteina konoplje je brašno uljne pogače konoplje (Bio Soul Food, Shakti Co d.o.o., Samobor, Hrvatska), dok je za pripremu hidrolizata proteina lana korišteno brašno uljne pogače lana (Nutrimedica d.o.o., Zagreb, Hrvatska).

Hidrolizat lana pripremljen je iz proteinskog izolata uljne pogače lana postupkom opisanim u znanstvenom radu Logarušić i sur. iz 2021. godine. Postupak priprave hidrolizata konoplje iz proteinskog izolata uljne pogače konoplje opisan je u diplomskom radu kolegice Anje Damjanović (2021), a postupak priprave frakcija proteina molarne mase <10 i <1 kDa opisan je u diplomskom radu kolegice Marije Cavrić (2021).

Tablica 3. Prikaz korištenih hidrolizata konoplje (HK) i lana (HL), tj. njihovih izdvojenih frakcija u točno određenim koncentracijama, pripravljenih uporabom proteolitičkih enzima *Neutrase*TM (N), *Protamex*TM (P) i *Alcalase*TM (A)

UZORAK	OPIS UZORKA	KRATICA
Uzorak 1	Frakcija hidrolizata konoplje sa proteinima molarne mase < 10 kDa dobivenog enzimom neutraza, u koncentraciji od 2,0 g L ⁻¹	HKN < 10 kDa 2,0 g L ⁻¹
Uzorak 2	Frakcija hidrolizata konoplje sa proteinima molarne mase < 10 kDa dobivenog enzimom neutraza, u koncentraciji od 0,5 g L ⁻¹	HKN < 10 kDa 0,5 g L ⁻¹

Tablica 3. Prikaz korištenih hidrolizata konoplje (HK) i lana (HL), tj. njihovih izdvojenih frakcija u točno određenim koncentracijama, pripremljenih uporabom proteolitičkih enzima *Neutrase*TM (N), *Protamex*TM (P) i *Alcalase*TM (A) - nastavak

UZORAK	OPIS UZORKA	KRATICA
Uzorak 3	Frakcija hidrolizata konoplje sa proteinima molarne mase < 10 kDa dobivenog enzimom protamex, u koncentraciji od 2,0 g L ⁻¹	HKP < 10 kDa 2,0 g L ⁻¹
Uzorak 4	Frakcija hidrolizata konoplje sa proteinima molarne mase < 10 kDa dobivenog enzimom protamex, u koncentraciji od 0,5 g L ⁻¹	HKP < 10 kDa 0,5 g L ⁻¹
Uzorak 5	Frakcija hidrolizata lana sa proteinima molarne mase < 1 kDa dobivenog enzimom alkalaza, u koncentraciji od 0,5 g L ⁻¹	HLA < 1 kDa 0,5 g L ⁻¹
Uzorak 6	Frakcija hidrolizata lana sa proteinima molarne mase < 10 kDa dobivenog enzimom neutraza, u koncentraciji od 0,5 g L ⁻¹	HLN < 10 kDa 0,5 g L ⁻¹
Uzorak 7	Frakcija hidrolizata lana sa proteinima molarne mase < 1 kDa dobivenog enzimom neutraza, u koncentraciji od 0,5 g L ⁻¹	HLN < 1 kDa 0,5 g L ⁻¹
Uzorak 8	Frakcija hidrolizata lana sa proteinima molarne mase < 10 kDa dobivenog enzimom protamex, u koncentraciji od 0,5 g L ⁻¹	HLP < 10 kDa 0,5 g L ⁻¹

3.1.2. Kemikalije

- Destilirana voda, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska
- Tripan-plavo boja, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- PowerCHO® -2 CD, Chemically Defined Selective Medium, Lonza, Verviers, Belgija
- Ala-Gln (200 mM Otopina Alanin-Glutamin), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Anti-Clumping Agent, GIBCO by Life Technologies, Paisley, UK
- Rh-inzulin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Otopina Antibiotik/Antimikotik (100x), Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka
- Metotreksat (MTX), Cerilliant, Round Rock, Texas, SAD
- Glucose GOD-PAP, BIOLABO S.A.S., Maizy, Francuska
- L-Lactic Acid (L-Lactate) Assay Kit, Megazyme, Bray, Irska
- L-Glutamine/Ammonia Assay Kit (Rapid), Megazyme, Bray, Irska
- Etanol, 96%, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrij-citrat dihidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) (SIGMA 7-9®), $\geq 99\%$ (titracija), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Limunska kiselina monohidrat, T.T.T. d.o.o., Sveta Nedelja, Hrvatska
- Natrij-dihidrogenfosfat monohidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Dinatrij-hidrogenfosfat heptahidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska

3.1.3. Otopine i puferi

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

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	10,107 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1,697 g
Destilirana voda	500 mL

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

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

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

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

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

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

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

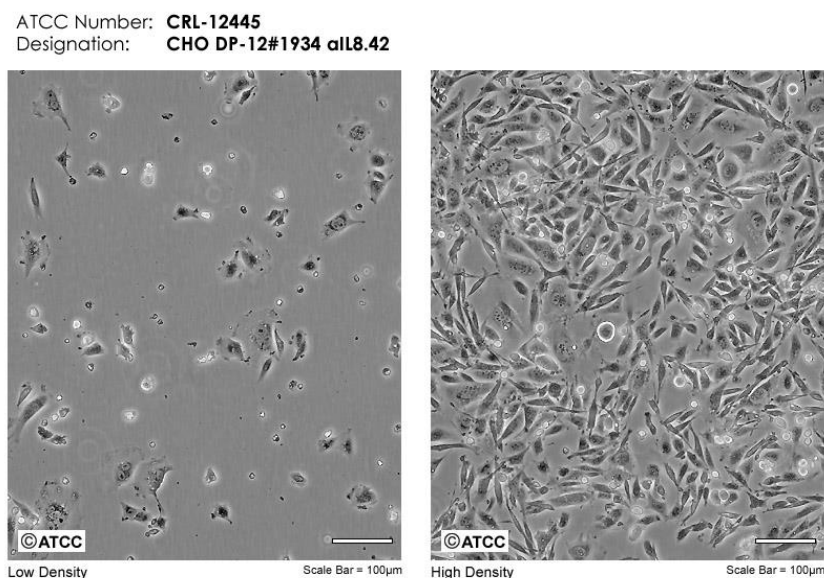
Etanol (96 %)	20 mL
TRIS pufer (20 mM; pH 7,4)	80 mL

3.1.4. Uređaji i oprema

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

3.1.5. CHO DP-12 stanična linija

U ovom diplomskom radu korištena je CHO (engl. *Chinese hamster ovary*) DP-12 stanična linija (slika 4), koja je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije adaptirana na suspenzijski rast. Ista je nabavljena iz banke stanica *American Type Culture Collection* (ATCC) kao adherentna stanična linija. Navedena stanična linija proizvodi rekombinantno humano monoklonsko protutijelo anti-IL-8, izotip IgG1.



Slika 4. Adherentna CHO DP-12 stanična linija (ATCC, 2021)

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj CHO DP-12 stanične linije u suspenzijskoj kulturi

Stanice se čuvaju zamrznute na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u ampulama volumena 1 mL (koncentracija stanica 1×10^7 stanica mL^{-1}). Prije uporabe, ampula sa stanicama je odmrznuta u vodenoj kupelji pri temperaturi od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, a zatim je sadržaj prenesen u sterilnu epruvetu sa 5-10 mL kompletnog PowerCHO medija. Sadržaj epruvete je podvrgnut centrifugiranju tijekom 5 minuta pri 1000 min^{-1} , nakon čega je supernatant uklonjen, a talog stanica je resuspendiran u PowerCHO

mediju. Stanice su potom naciepljene u koncentraciji od $2,5 \times 10^5$ st mL^{-1} u 22 mL medija u sterilnoj Erlenmeyerovoj tikvici te uzgajane do koncentracije od 2×10^6 st mL^{-1} , nakon čega su precijepljene.

Stanice su uzgajane u PowerCHO® - 2 CD hranjivom mediju, u čiji su volumen od 94,75 mL dodane sljedeće komponente: 4 mL otopine Ala-Gln, 1 mL Antibiotik/Antimikotik otopine, 250 μL Anti-Clumping otopine, 20 μL Rh-inzulina i 9 μL MTX-a. Time je PowerCHO® - 2 CD hranjivi medij postao kompletan za uzgoj suspenzijskih CHO DP-12 stanica.

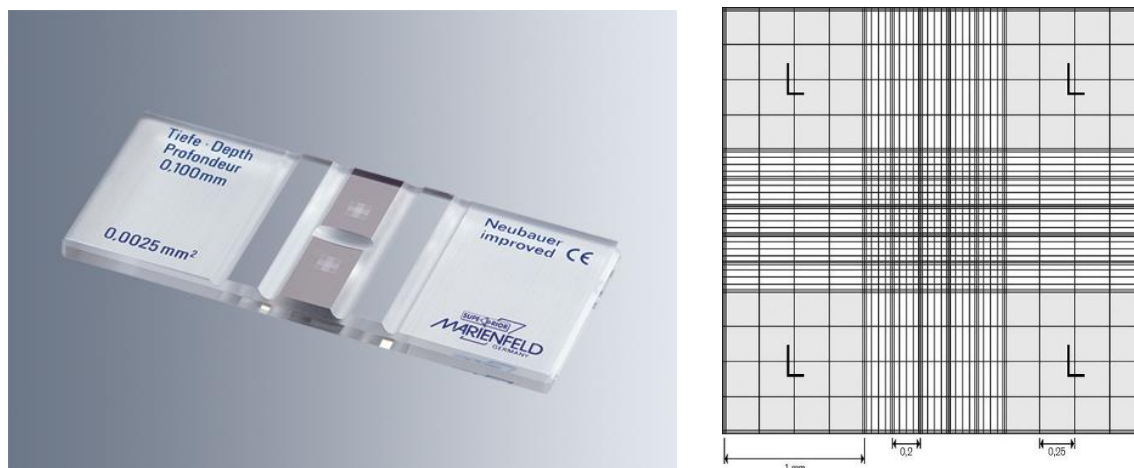
Nakon tri precijepljivanja stanica, stanice su naciepljene u 9 Erlenmeyerovih tikvica u početnoj koncentraciji od $2,5 \times 10^5$ stanica mL^{-1} . Stanice su uzgajane u kompletnom PowerCHO® - 2 CD mediju ukupnog volumena 22 mL, uz koji su u 8 tikvica dodani različiti hidrolizati proteina konoplje i lana, kako je navedeno u tablici 3. Deveta tikvica pritom je služila kao kontrola, jer nije sadržavala hidrolizate biljnih proteina, već su u njoj stanice uzgajane u samom mediju.

Nakon naciepljivanja stanica u medij, one su uzgajane 11 dana (izuzetak je uzorak 1, koji je uzgajan 15 dana), odnosno uzgoj je prekinut u trenutku kada je vijabilnost stanica pala ispod 70 %. Stanice su uzgajane na kružnoj tresilici (160 rpm) u inkubatoru, uz uvjete temperature 36,6 °C, atmosferskog tlaka i atmosferskog zraka (95 % zraka i 5 % CO_2). Tokom uzgoja svakodnevno je provjeravano je li došlo do kontaminacije kulture, brojane su žive i mrtve stanice, iz čega se računala njihova koncentracija i postotak vijabilnosti, te je svakodnevno izuziman alikvot medija za analizu sadržaja glukoze, laktata i amonijaka, a na kraju uzgoja i imunoglobulina G.

3.2.2. Određivanje broja te vijabilnosti CHO DP-12 stanica metodom tripan-plavo

Rast i vijabilnost svih 9 uzoraka CHO DP-12 stanica uzgajanih na tresilici u inkubatoru, čiji je uzgoj opisan u prethodnom poglavlju (3.2.1.), praćeni su svakodnevno do kraja uzgoja uporabom svjetlosnog mikroskopa, Neubauerove komorice (slika 5 lijevo) i boje tripan-plavo. Metoda tripan-plavo temelji se na tome da mrtve stanice gube integritet stanične membrane, zbog čega je ona propusna za boju, te su takve stanice posljedično plavo obojene, dok žive stanice ostaju neobojene (slika 6). Iz svake tikvice svakodnevno je u sterilnoj komori izuziman alikvot uzorka, koji je stavljen u Eppendorf epruvete, te je potom ili najprije razrijeđen ili je

izravno služio za miješanje s tripan-plavo bojom i određivanje broja stanica. Iz epruvete s uzorkom izuzeto je 10 μL uzorka te pomiješano s istim volumenom boje tripan-plavo, nakon čega je navedena smjesa automatskom pipetom prenesena u Neubauerovu komoricu te su žive i mrtve stanice iz uzorka prebrojene pod svjetlosnim mikroskopom.



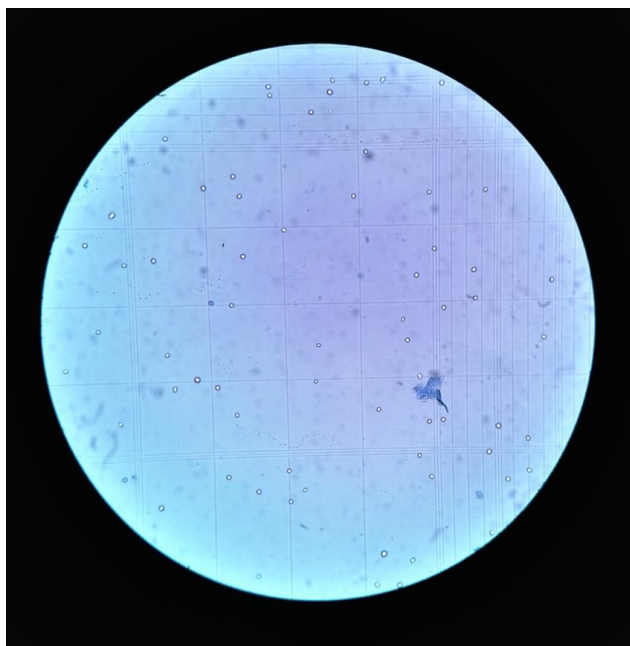
Slika 5. Neubauerova komorica za brojanje stanica (lijevo) (Anonymous 3, 2021) i mreža kvadrata Neubauerove komorice (desno) (Anonymous 4, 2021)

Stanice su prebrojane u 4 velika kvadrata unutar mreže Neubauerove komorice (slika 5 desno), te je potom koncentracija živih stanica u uzorku izračunata prema sljedećoj formuli [1]:

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

Vijabilnost stanica u kulturi računa se prema sljedećoj formuli [2]:

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



Slika 6. Prikaz stanica u Neubauerovoj komorici gledano pod mikroskopom (povećanje 100x) (vlastita fotografija)

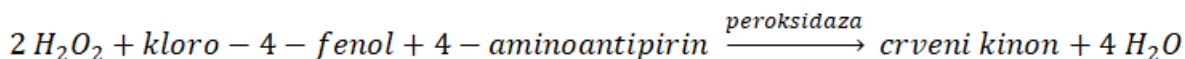
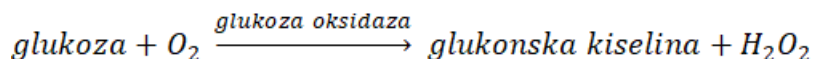
3.2.3. Mjerenje koncentracije metabolita u uzorcima hranjivog medija tijekom uzgoja CHO DP-12 stanica

Nakon izuzimanja po 20 μL uzorka za brojanje stanica u dvije paralele, preostali dio svakog izuzetog uzorka podvrgnut je centrifugiranju kroz 5 minuta pri 3000 rpm, kako bi se uklonile stanice. Nakon toga je supernatant uzoraka pažljivo premješten u drugu Eppendorf epruvetu, te je kao takav služio za daljnje određivanje glukoze, laktata i amonijaka u mediju. Do trenutka određivanja metabolita u odabranim uzorcima, supernatanti su čuvani u zamrzivaču pri -20 °C, a prije samog određivanja metabolita, ostavljeni su na sobnoj temperaturi da se otope.

3.2.3.1. *Određivanje koncentracije glukoze*

Koncentracija glukoze u hranjivom mediju određivana je Glucose-GOD-PAP setom, u kojem se nalazi reagens i standardna otopina glukoze (GOD-PAP, BIOLABO, Maizy, Francuska). Korištena metoda zasniva se na kolorimetrijskoj Trinderovoj metodi, a uobičajeno se koristi u medicinskim dijagnostičkim laboratorijima za određivanje koncentracije glukoze u krvi. Prema Trinderovoj metodi, glukoza se najprije pomoću enzima glukoza-oksidadaze (GOD)

oksidira do glukonske kiseline i vodikovog peroksida, koji se potom u reakciji s kloro-4-fenolom i 4-aminoantipirinom (PAP) pomoću enzima peroksidaze (POD) prevodi u crveno obojeni kinonski spoj. Apsorbancija nastalog obojenog kompleksa mjeri se pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 500 nm, a proporcionalna je koncentraciji glukoze u ispitivanom uzorku medija.



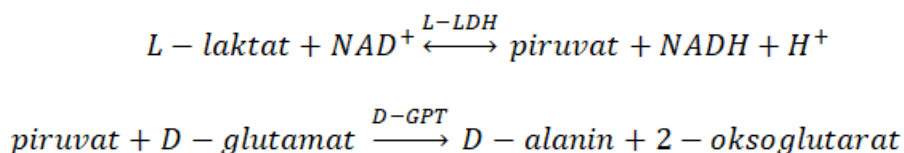
Sami test proveden je na način da je najprije dodano 500 µL Glucose-GOD-PAP reagensa te zatim 5 µL uzorka, odnosno Glucose-GOD-PAP standardne otopine poznate koncentracije ($c = 5,55 \text{ mmol L}^{-1}$), nakon čega je dobivena otopina resuspendirana. Za slijepu probu je umjesto uzorka dodano 5 µL destilirane vode. Svaki uzorak, kao i standard i slijepa proba, određivan je u dvije paralele.

Nakon resuspendiranja, otopina je inkubirana pri 37 °C kroz 10 minuta te je potom na spektrofotometru mjerena apsorbancija i prema sljedećoj formuli [3] je izračunata koncentracija glukoze u uzorku (BIOLABO, 2014):

$$\text{konc. glukoze u uzorku } [mmol L^{-1}] = \frac{A_{500}(\text{uzorka})}{A_{500}(\text{standarda})} \times \text{konc. standarda } [mmol L^{-1}] \quad [3]$$

3.2.3.2. Određivanje koncentracije laktata

Koncentracija laktata u hranjivom mediju određivana je *L-Lactic Acid (L-Lactate) Assay Kit*-om (Megazyme, Bray, Irska), koji se koristi u industriji prerade jaja za utvrđivanje kvarenja, za provjeru kvalitete mlijeka, povrća i voća, u industriji vina, kao i u kemijskoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. U ovom setu sadržani su reagensi koji omogućuju odvijanje dvije reakcije: u prvoj se reakciji pomoću enzima L-laktat dehidrogenaze (L-LDH) L-laktat oksidira do piruvata, pri čemu oksidirani oblik nikotinamid-adenin dinukleotida (NAD^+) prelazi u svoj reducirani oblik, NADH. S obzirom na to da se spektrofotometrijski mjeri apsorbancija NADH, ravnoteža ove reverzibilne reakcije mora biti pomaknuta na stranu nastajanja produkata. Zbog toga je potrebno odvijanje i druge reakcije, pretvorbe nastalog piruvata u D-alanin i 2-oksooglutarat pomoću enzima D-glutamat-piruvat transaminaze (D-GPT), uz prisustvo velikog suviška D-glutamata (Megazyme, 2018a).



Završetkom navedenih reakcija u nizu, količina NADH stehiometrijski je jednaka količini L-laktata u pojedinom uzorku medija. Apsorbancija NADH u uzorcima mjeri se pri 340 nm, a nakon toga se koncentracija L-laktata izračunava prema sljedećoj formuli [4] (Megazyme, 2018a):

$$c = \frac{V \times Mr}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A_{L-laktat} \quad [4]$$

Ili jednostavnije [5]:

$$c_{laktat} [mmolL^{-1}] = 0,3204 \times \Delta A_{laktat} \times 11,1 \times \text{broj razrjeđenja} \quad [5]$$

Gdje je:

c = koncentracija L-laktata [g L⁻¹]

V = konačan volumen [mL]

Mr = molarna masa L-laktata [g mol⁻¹]

ε = koeficijent ekstincije NADH pri 340 nm (= 6300 L mol⁻¹ cm⁻¹)

d = put svjetla [cm]

v = volumen uzorka [mL]

$$\Delta A_{L-laktat} = A_2 - A_1$$

Određivanje koncentracije L-laktata u uzorku medija provedeno je prema protokolu priloženom u samom setu, a uključivalo je dodavanje priloženih reagenasa i pojedinog uzorka u kivete određenim redoslijedom (Megazyme, 2018a):

1. 375 μL destilirane vode
2. 25 μL uzorka (*kod slijepe probe dodaje se destilirana voda)
3. 125 μL reagensa 1

4. 25 µL reagensa 2

5. 5 µL reagensa 3

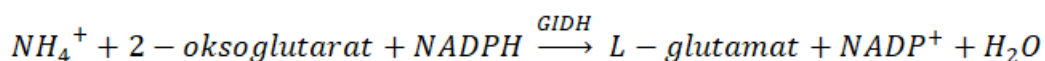
*Sadržaj je resuspendiran, ostavljen 3 min na 25 °C, te je na spektrofotometru pri 340 nm očitana prva vrijednost apsorbancije (A_1).

6. 5 µL reagensa 4

*Sadržaj je resuspendiran, ostavljen 10 min na 25 °C, te je na spektrofotometru pri 340 nm očitana druga vrijednost apsorbancije (A_2).

3.2.3.3. Određivanje koncentracije amonijaka

Koncentracija amonijaka u hranjivom mediju određivana je *L-Glutamine/Ammonia Assay Kit*-om (Megazyme, Bray, Irska), koji sadrži rekombinantne enzime koji omogućuju vrlo brzo određivanje L-glutamina i amonijaka u hranjivom mediju, supernatantu te drugim materijalima. Naime, L-glutamin u hranjivom mediju je labilan te se spontano razgrađuje na L-glutamat i slobodne amonijeve ione, koji su toksični za stanicu, zbog čega je vrlo važno praćenje njihove koncentracije tokom uzgoja stanica. Prisutnost i koncentracija amonijaka u hranjivom mediju ovom se metodom određuje na način da se u uzorke, osim pufera, dodaje reducirani nikotinamid-adenin dinukleotid fosfat (NADPH) i enzim glutamat dehidrogenaza (GIDH). U njihovom prisustvu amonijeve ioni iz medija reagiraju s 2-oksoglutaratom, pri čemu nastaje L-glutamat i oksidirani nikotinamid-adenin dinukleotid fosfat (NADP^+) (Megazyme, 2018b).



Količina nastalog NADP^+ stehiometrijski je jednaka količini amonijaka u mediju, a smanjenje koncentracije NADPH spektrofotometrijski se mjeri pri valnoj duljini od 340 nm. Koncentracija amonijaka u mediju potom se izračunava prema sljedećoj formuli [6] (Megazyme, 2018b):

$$c = \frac{V \times Mr}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A_{\text{amonijak}} \quad [6]$$

Ili jednostavnije [7]:

$$c_{\text{amonijak}} [\text{mmol L}^{-1}] = 0,06325 \times \Delta A_{\text{amoi jak}} \times 58,72 \times \text{broj razrijeđenja} \quad [7]$$

Gdje je:

c = koncentracija amonijaka [g L^{-1}]

V = konačan volumen [mL]

M_r = molarna masa amonijaka [g mol^{-1}]

ε = koeficijent ekstincije NADPH pri 340 nm ($=6300 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

d = put svjetla [cm]

v = volumen uzorka [mL]

$$\Delta A_{\text{amonijak}} = A_1 - A_2$$

Određivanje koncentracije amonijaka u uzorku medija provedeno je prema protokolu priloženom u setu, a uključivalo je dodavanje priloženih reagenasa i pojedinog uzorka u kivete određenim redoslijedom (Megazyme, 2018b):

1. 430 μL destilirane vode
2. 25 μL uzorka (*kod slijepe probe dodaje se destilirana voda)
3. 75 μL reagensa 2
4. 50 μL reagensa 3

*Sadržaj je resuspendiran, ostavljen 4 min na 25 °C, te je na spektrofotometru pri 340 nm očitana prva vrijednost apsorbancije (A_1)

5. 5 μL reagensa 5

*Sadržaj je resuspendiran, ostavljen 5 min na 25 °C, te je na spektrofotometru pri 340 nm očitana druga vrijednost apsorbancije (A_2)

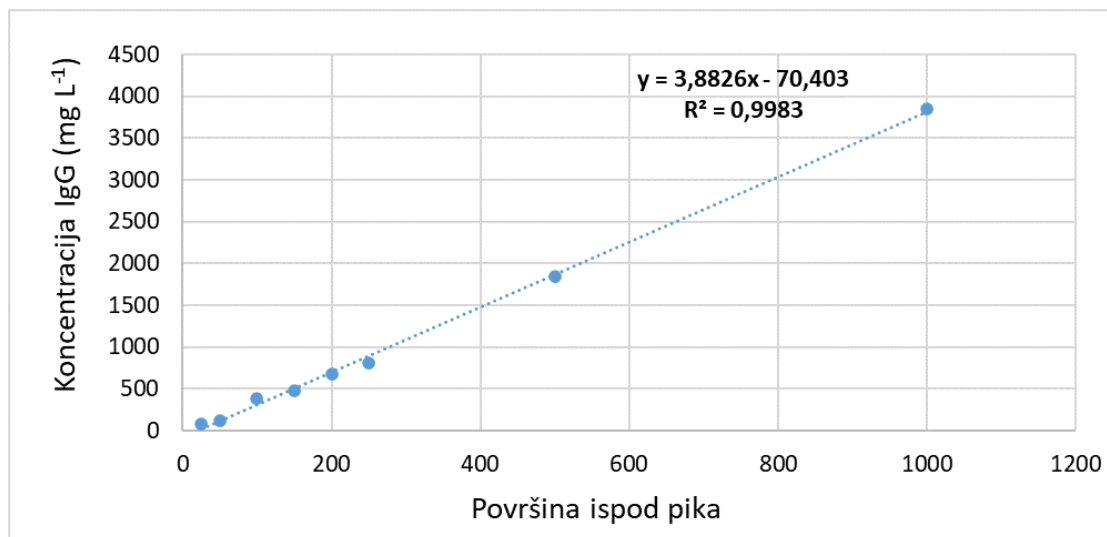
3.2.4. Određivanje koncentracije monoklonskog protutijela IgG u hranjivom mediju za uzgoj

Koncentracija monoklonskog protutijela IgG određivana je pomoću uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC; engl. *High Performance Liquid Chromatography*), pri čemu je korištena Protein A kolona. Molekule IgG na Protein A koloni razdvojene su od drugih komponenti hranjivog medija prema principu afinitetne kromatografije, odnosno protein A je ligand koji sadrži imunoglobulin-vezujuće domene, na koje se prolaskom kroz kolonu specifično vežu molekule imunoglobulina G preko svoje Fc regije teškog lanca. Uzorci supernatanta hranjivog medija su prije stavljanja na kolonu filtrirani pomoću filtera pora 0,22 µm, kako bi se uklonili stanični ostaci. Zatim je na kolonu injektirano 50 µL uzorka, a protok je tokom 4,2 minute analize održavan na 1,0 mL min⁻¹ pri temperaturi od 25 °C. Stacionarnu fazu predstavlja Protein A kolona, a kao mobilne faze su korišteni 50 mM natrij-fosfatni pufer (pH = 7,55) za vezanje i 0,1 M limunska kiselina (pH = 2,73) za eluciju. Parametri razdvajanja protutijela na Protein A koloni djelovanjem različitih udjela mobilnih faza prikazani su u tablici 4. Do elucije protutijela s kolone dolazi uslijed znatne promjene pH vrijednosti dodatkom limunske kiseline, zbog čega dolazi do cijepanja interakcija između protutijela i liganda na koloni. Eluirano protutijelo detektirano je pomoću UV/VIS detektora HPLC uređaja pri valnoj duljini od 280 nm.

Tablica 4. 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

Pikovi kromatograma računalno su analizirani te je koncentracija IgG u uzorcima izračunata pomoću jednadžbe pravca baždarnog dijagrama (slika 7). Baždarni dijagram napravljen je analizom 8 standardnih otopina IgG poznatih koncentracija u rasponu 25 – 1000 mgL⁻¹.



Slika 7. Baždarni dijagram za HPLC određivanje koncentracije IgG

3.2.5. Određivanje 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 računa se prema jednadžbi:

$$\mu_{max} = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt}$$

[8]

Gdje je:

dN = povećanje broja stanica

dt = vremenski interval

N = broj stanica

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

$$\ln N = \ln N_0 + \mu (t - t_0) \quad [9]$$

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

$$\mu_{max} = \frac{\ln N - \ln N_0}{\Delta t} \quad [10]$$

Gdje je:

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

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

Δt = trajanje eksponencijalne faze rasta (dan)

Volumetrijska produktivnost (V_p)

$$V_p = \frac{c}{t} \quad [11]$$

Gdje je:

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

t = vrijeme trajanja uzgoja (dan)

Specifična produktivnost (Q_p)

$$Q_p = \frac{c}{\Delta t \cdot \Delta N} \quad [12]$$

Gdje je:

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

Δt = vremenski interval trajanja eksponencijalne faze (dan)

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

Relativna volumetrijska/specifična produktivnost

$$IgG(\%) = \frac{Vp \text{ odnosno } Qp \text{ (uzorak)}}{Vp \text{ odnosno } Qp \text{ (kontrola)}} \quad [13]$$

3.2.6. Obrada podataka

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

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [14]$$

s pripadajućim standardnim devijacijama (s):

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad [15]$$

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

Mnogi vrijedni biotehnološki proizvodi, prvenstveno cjepiva i rekombinantni terapijski proteini, proizvode se procesom kulture životinjskih stanica. Pritom se 60-70 % rekombinantnih terapijskih proteina proizvodi u kulturi stanica sisavaca, poglavito u CHO (engl. *Chinese hamster ovary*) staničnoj liniji. U mnogim znanstvenim istraživanjima kod uzgoja staničnih kultura naglasak se stavlja na istraživanje utjecaja uvjeta uzgoja na vijabilnost i produktivnost stanične kulture, pri čemu je jedan od najvažnijih faktora sastav hranjivog medija za uzgoj. Naime, životinjski serum se posljednjih nekoliko desetljeća, od njegova otkrića 1950-ih godina, koristi kao glavni dodatak hranjivim medijima za uzgoj zbog njegovih brojnih prednosti, ali i zbog neprisustva dostojne zamjene za isti. Međutim, njegova visoka cijena (koja je od 2016. godine do danas porasla za više od 300 %), rizik od kontaminacije, nedefinirani sastav, visoki udio proteina, varijabilnost kvalitete od šarže do šarže ovisno o sezonskom i geografskom učinku, etička pitanja vezana uz njegovo dobivanje, kao i mnogi drugi nedostaci istoga, naveli su mnoge znanstvenike da krenu u potragu za načinima smanjenja ili potpunog ukidanja upotrebe seruma. Pritom se naglasak stavlja na komponente koje nisu životinjskog podrijetla, a za koje je poželjno da utječu na proliferaciju i produktivnost stanica jednako ili još bolje u usporedbi s uzgojem istih stanica u hranjivom mediju koji sadržava serum. Tako je, u tom kontekstu, u posljednjih pedesetak godina, znatno porastao interes za istraživanjem učinka proteinskih hidrolizata biljnog porijekla na rast i produktivnost životinjskih stanica uzgajanih u kulturi. Naime, osim što su biljni hidrolizati znatno jeftiniji, te imaju mnoge druge prednosti u usporedbi sa serumom, oni također pridonose i trendovima održive proizvodnje, s obzirom na to da se kao sirovina za njihovo dobivanje mogu koristiti otpadni biljni nusproizvodi iz industrije, kao što su npr. uljne pogače i brašna, koji zaostaju nakon ekstrakcije ulja iz sjemenki biljaka uljarica. Naime, kroz godine su provedena mnoga istraživanja o učincima dodatka biljnih proteinskih hidrolizata u hranjivi medij, uključujući hidrolizate iz soje, uljane repice, pamuka, pšenice, suncokreta i drugih biljaka uljarica, pri čemu su mnogi od njih pokazali pozitivan učinak na proliferaciju i produktivnost životinjskih stanica (Chelladurai i sur., 2021; Logarušić i sur., 2021; Verma i sur., 2020; Farges-Haddani i sur., 2006). Nastavno na već bolje istražene biljne hidrolizate, u ovom radu cilj je bio ispitati učinak proteinskih hidrolizata lana i konoplje na rast, vijabilnost i produktivnost CHO DP-12 stanica uzgajanih u suspenziji u *serum-free* hranjivom mediju. Naime, lan i konoplja biljke su koje dokazano imaju puno pozitivnih utjecaja na ljudsko zdravlje uslijed prisutnosti velikog broja bioaktivnih komponenata u njima.

U ovom eksperimentu rast stanica svakodnevno je praćen brojanjem stanica pod svjetlosnim mikroskopom u Neubauerovoj komorici, a vijabilnost stanica određivana je metodom tripan-plavo. Osim rasta i vijabilnosti stanica, tokom uzgoja stanica praćene su i promjene koncentracije metabolita u mediju u kojem su stanice rasle uporabom komercijalnih enzimskih kit-ova za određivanje koncentracije glukoze, laktata i amonijaka. U konačnici je pomoću Protein A kolone HPLC metodom određivana koncentracija proizvedenog imunoglobulina G u uzorcima hranjivog medija, kako bi se stekao uvid u to kako korišteni biljni hidrolizati utječu na produktivnost CHO stanica. Svi dobiveni rezultati praćenih parametara i njihove međusobne usporedbe, kao i usporedbe s kontrolnim uzorkom, u sljedećim su potpoglavljima grafički prikazani te detaljno raspravljani.

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

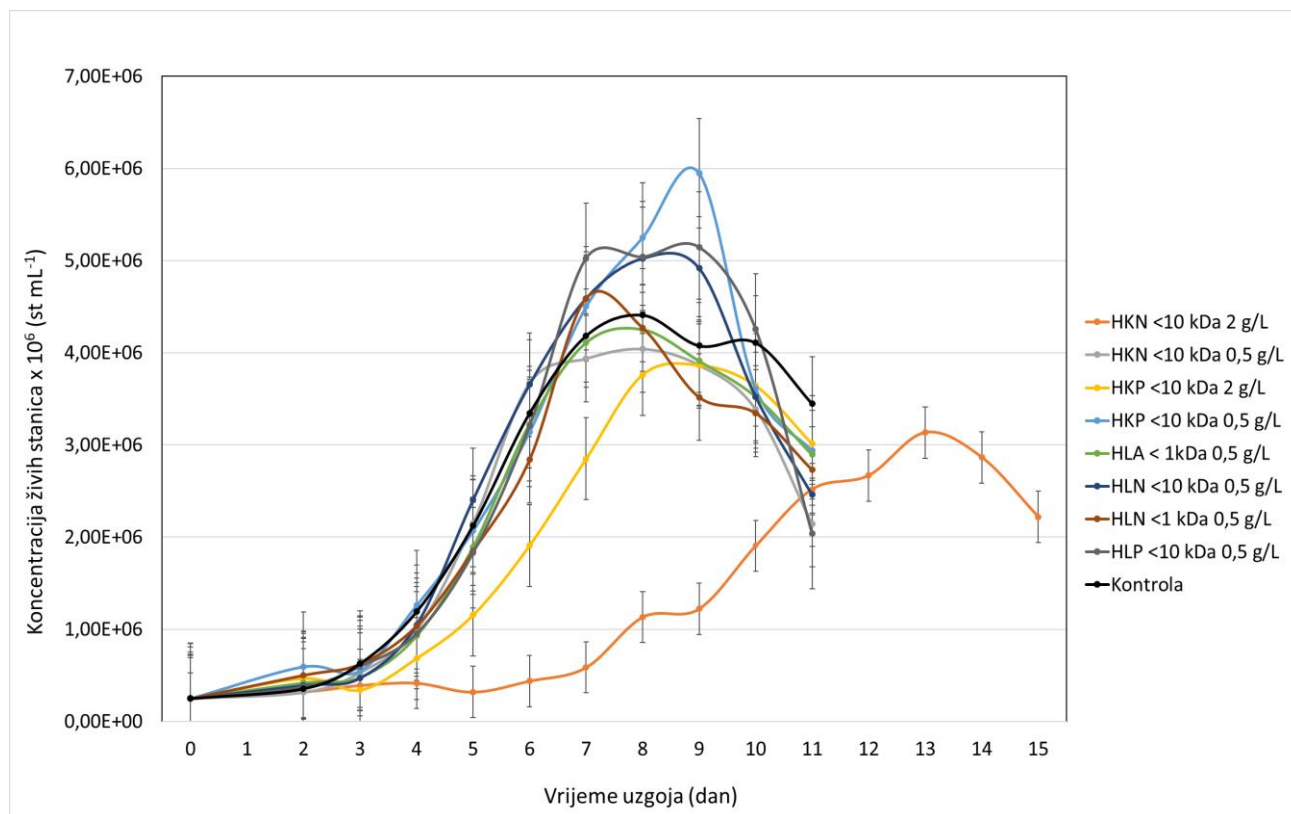
Hidrolizati proteina konoplje i lana, kao i njihove peptidne frakcije, pripremljeni su u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu iz brašna uljne pogače konoplje odnosno lana. Isti su pripremljeni uporabom komercijalnih mikrobnih proteolitičkih enzima *Alcalase*TM, *Neutrase*TM i *Protamex*TM, pri čemu su uvjeti hidrolize prethodno optimirani za svaki od navedenih enzima.

Ovaj diplomski rad dio je projekta Hrvatske zaklade za znanost „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj“. U ranijim istraživanjima već su ispitivani pripremljeni hidrolizati i njihove peptidne frakcije u različitim koncentracijama, te je na temelju dosadašnjih rezultata za ovaj rad odabrano 8 različitih frakcija hidrolizata konoplje i lana (tablica 3), koje su, u odnosu na druge frakcije, pokazale bolje učinke na rast i/ili produktivnost CHO DP-12 stanične linije, u smislu poticanja rasta odnosno produktivnosti.

Učinak korištenih frakcija hidrolizata na rast i vijabilnost ispitan je na način da je proveden suspenzijski uzgoj CHO DP-12 stanica u *serum-free* hranjivom mediju, pri čemu su iste stanice prethodno u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije prilagođene na uzgoj u takvom mediju. Stanice su uzgajane tijekom 11 dana (odnosno 15 za uzorak 1) u 9 različitih tikvica, od kojih su u njih 8 dodane frakcije hidrolizata proteina konoplje i lana različitih molarnih masa i koncentracija (tablica 3), a deveta tikvica poslužila je kao kontrola, u kojoj su se uzgajale stanice u *serum-free* mediju bez dodatka hidrolizata. Dinamika rasta prikazana je pomoću krivulje rasta (slika 8), koja prikazuje ovisnost koncentracije živih CHO DP-12 stanica o vremenu trajanja uzgoja, odnosno djelovanje frakcija hidrolizata proteina konoplje i lana na rast CHO DP-12 stanica.

Prema krivulji rasta (slika 8) vidljivo je da je kod većine uzoraka faza prilagodbe (lag faza) trajala 3 dana, nakon čega su stanice ušle u eksponencijalnu (log) fazu rasta, s izuzetkom uzorka 1 (HKN <10 kDa 2 g L⁻¹), u kojem su stanice ušle u log fazu rasta tek 7. dan uzgoja. Log faza rasta za većinu uzoraka završava između 7. i 9. dana uzgoja, dok za uzorak 1 traje do 13. dana, odnosno trajanje log faze za svaki uzorak je između 4 i 6 dana, nakon čega su stanice ušle u stacionarnu fazu te ubrzo nakon i fazu odumiranja. Na krivulji rasta također je vidljivo da su od 3. do 6. dana uzgoja svi uzorci koji sadrže hidrolizate konoplje ili lana u koncentraciji od 0,5 g L⁻¹ rasli vrlo slično kao i kontrolni uzorak, a vrlo očiti izuzetak su uzorci koji sadrže hidrolizate

konoplje u koncentraciji od 2 g L^{-1} . Prema tome se može zaključiti da je koncentracija hidrolizata konoplje od 2 g L^{-1} previsoka, odnosno negativno djeluje na rast CHO DP-12 stanica, s obzirom da su stanice u tim uzorcima tijekom cijelog uzgoja rasle slabije u odnosu na kontrolni uzorak. Pritom je uzorak 1 (HKN $< 10 \text{ kDa } 2 \text{ g L}^{-1}$) imao i najmanju maksimalnu specifičnu brzinu rasta u odnosu na kontrolu i ostale uzorke (tablica 5), što potvrđuje da navedena frakcija hidrolizata proteina konoplje u dodanoj koncentraciji inhibitorno djeluje na rast stanica.



Slika 8. Krivulja rasta CHO DP-12 stanica tijekom uzgoja u *serum-free* hranjivom mediju za kontrolni uzorak ("Kontrola") i 8 ispitivanih uzoraka, u koje su dodane frakcije hidrolizata proteina konoplje i lana različitih molarnih masa ($<10 \text{ kDa}$; $<1 \text{ kDa}$) i koncentracija (2 g L^{-1} ; $0,5 \text{ g L}^{-1}$)

Kratice: *HK-hidrolizat konoplje; HL-hidrolizat lana; zadnje slovo označava proteolitičke enzime kojima su hidrolizati dobiveni: N-NeutraseTM; P-ProtamexTM; A-AlcalaseTM

Nakon 6. dana uzgoja, uzorak 5 (HLA $<1 \text{ kDa } 0,5 \text{ g L}^{-1}$) je najsličnije rastao kao kontrolni uzorak, pri čemu je imao i malo manji broj stanica te strmiji pad u broju stanica tijekom faze odumiranja u odnosu na kontrolni uzorak. S druge strane, uzorci 4 (HKP $<10 \text{ kDa } 0,5 \text{ g L}^{-1}$), 6 (HLN $<10 \text{ kDa } 0,5 \text{ g L}^{-1}$), 7 (HLN $<1 \text{ kDa } 0,5 \text{ g L}^{-1}$) i 8 (HLP $<10 \text{ kDa } 0,5 \text{ g L}^{-1}$) su nakon 6. dana uzgoja imali nagli skok u broju stanica u odnosu na kontrolni uzorak, pri čemu je najveći skok imao uzorak 4, u kojem su stanice 9. dan uzgoja dosegle najveći broj u odnosu na

kontrolu i druge uzorke, no nakon naglog skoka u broju stanica, uslijedio je i najbrži pad u broju stanica. Kod uzorka 4 također je zanimljivo da je to jedini uzorak koji je sadržavao frakciju hidrolizata proteina konoplje, a koji je bolje rastao, odnosno dosegao veću koncentraciju stanica u odnosu na kontrolni uzorak. Posebno je zanimljiv uzorak 1, u kojem su stanice uzgajane uz dodatak frakcije hidrolizata proteina konoplje dobivene pomoću enzima *Neutrase*, u kojoj je molarna masa proteina manja od 10 kDa, a koncentracija dodanog hidrolizata je 2 g L^{-1} , jer je taj uzorak puno kasnije ušao u eksponencijalnu fazu rasta, zbog čega je i njegov uzgoj trajao 4 dana dulje u odnosu na sve ostale uzorke. Osim toga, stanice su u ovom uzorku tokom cijelog uzgoja bile u znatno manjem broju u odnosu na kontrolu i ostale uzorke, što znači da navedena frakcija hidrolizata proteina konoplje usporava rast stanica te odgađa početak eksponencijalne faze rasta.

Tablica 5. Vrijednosti najvećih specifičnih brzina rasta ($\mu_{\max}$) CHO DP-12 stanica u uzorcima

Uzorak	$\mu_{\max} \text{ (dan}^{-1}\text{)}$
HKN <10 kDa 2 g L^{-1}	0,28
HKN <10 kDa $0,5 \text{ g L}^{-1}$	0,61
HKP <10 kDa 2 g L^{-1}	0,48
HKP <10 kDa $0,5 \text{ g L}^{-1}$	0,40
HLA < 1kDa $0,5 \text{ g L}^{-1}$	0,54
HLN <10 kDa $0,5 \text{ g L}^{-1}$	0,47
HLN <1 kDa $0,5 \text{ g L}^{-1}$	0,50
HLP <10 kDa $0,5 \text{ g L}^{-1}$	0,52
Kontrola	0,49

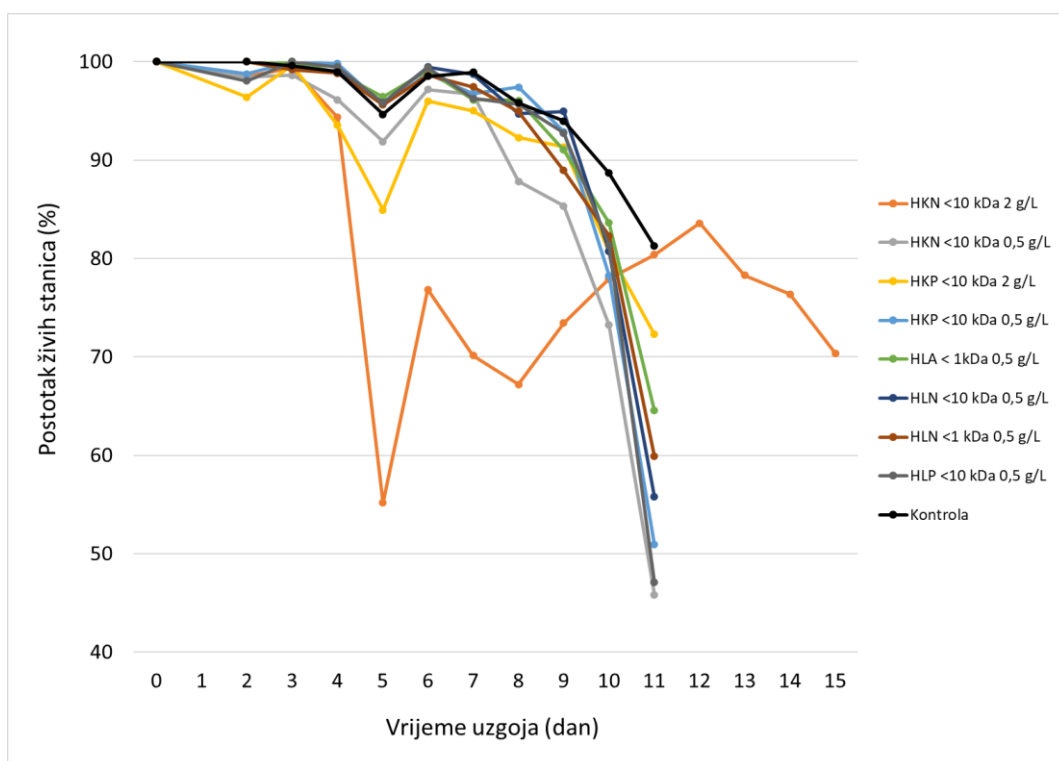
*HK-hidrolizat konoplje; HL-hidrolizat lana; zadnje slovo označava proteolitičke enzime kojima su hidrolizati dobiveni: N-*Neutrase*TM; P-*Protamex*TM; A-*Alcalase*TM

Gledajući eksponencijalnu fazu rasta za svaki uzorak, iz tablice 5 vidljivo je da uzorci 3, 6, 7 i 8 imaju maksimalnu specifičnu brzinu rasta najbližnju kontroli. Pritom je uzorak 3 (HKP <10 kDa 2 g L^{-1}), iako je rastao istom brzinom kao i stanice u kontrolnom uzorku, tijekom cijelog uzgoja imao manji broj vijabilnih stanica od kontrole. Naime, takvo ponašanje stanica može značiti da su u uzorku 3 stanice kontinuirano tijekom eksponencijalne i stacionarne faze rasta, u usporedbi s kontrolom, veći dio energije tokom rasta trošile na proizvodnju protutijela IgG. Takvo obrazloženje slaže se s dobivenim rezultatima za produktivnost (slika 13). S druge strane, uzorak 6 (HLN <10 kDa $0,5 \text{ g L}^{-1}$) je do 4. dana uzgoja imao manji broj stanica od kontrolnog uzorka, nakon čega su stanice u njemu počele brže rasti, a uzorci 7 (HLN <1 kDa $0,5 \text{ g L}^{-1}$) i 8 (HLP <10 kDa $0,5 \text{ g L}^{-1}$) su brže od kontrole počeli rasti tek nakon 6. dana uzgoja,

odnosno na samom kraju eksponencijalne faze. Takve nagle promjene u broju stanica mogu se također objasniti metaboličkim promjenama stanica, pri čemu se stanična energija više troši na rast ili na proizvodnju protutijela. Izuzev uzorka 1, za koji je već navedeno da znatno negativno odskaače po maksimalnoj specifičnoj brzini rasta od kontrole i ostalih uzoraka, u ovu kategoriju izuzetaka, samo u pozitivnom smjeru, može se smjestiti i uzorak 2 (HKN <10 kDa 0,5 g L⁻¹). Stanice u uzorku 2 imaju uočljivo veću maksimalnu specifičnu brzinu rasta u odnosu na ostale uzorke i kontrolu, te im eksponencijalna faza traje samo 4 dana, odnosno završava već 6. dan, najranije u odnosu na sve uzorke. S obzirom da su stanice u tom uzorku imale i daleko najbolju produktivnost (slika 13), pretpostavka je da predugo trajanje eksponencijalne faze rasta uzrokuje znatno trošenje stanične energije na rast stanica, pri čemu ne ostaje dovoljno energije za dobivanje velikih prinosa proizvoda. Naime, vrijedni proizvodi stanica, produkti sekundarnog metabolizma, uglavnom se najviše proizvode u stacionarnoj fazi rasta, jer je stanični metabolizam tada usmjeren na proizvodnju više nego na rast i dijeljenje stanica.

Prema krivulji koja pokazuje vijabilnost stanica tokom uzgoja (slika 9), vidljivo je da većini uzoraka vijabilnost počinje opadati 8. ili 9. dan, na kraju eksponencijalne faze, a nagli pad vijabilnosti u većini uzoraka događa se između 9. i 11. dana, kada vijabilnost u gotovo svim uzorcima pada ispod 70 %, čime je završen uzgoj CHO DP-12 stanica. Nagli pad u vijabilnosti uzoraka 5. dan uzgoja pripisuje se pogrešci u brojanju stanica. U već spomenutom zanimljivom uzorku 1, vidljivo je da do 8. dana uzgoja stanice odumiru, nakon čega slijedi nagli porast u postotku živih stanica ulaskom u eksponencijalnu fazu rasta, a 15. dan vijabilnost se spustila na 70 %, čime je uzgoj uzorka 1 završen.

Prema grafu ovisnosti vijabilnosti stanica o vremenu uzgoja, od 7. dana do kraja uzgoja uočljiva je manja vijabilnost stanica u uzorcima u koje su dodane frakcije hidrolizata u odnosu na kontrolni uzorak, a pad u vijabilnosti uzoraka nakon 9. dana znatno je i strmiji u odnosu na kontrolni uzorak. To znači da su stanice koje su uzgajane u prisustvu frakcija hidrolizata proteina konoplje i lana nakon eksponencijalne faze rasta brže odumirale no što su se dijelile, no to može upućivati na to da su stanice iz uzoraka s hidrolizatima u tom vremenu više energije trošile na proizvodnju IgG-a nego na dijeljenje, o čemu će se više reći u kasnijim poglavljima.



Slika 9. Vijabilnost stanica CHO DP-12 tijekom uzgoja

Kratice: *HK-hidrolizat konoplje; HL-hidrolizat lana; zadnje slovo označava proteolitičke enzime kojima su hidrolizati dobiveni: N-NeutraseTM; P-ProtamexTM; A-AlcalaseTM

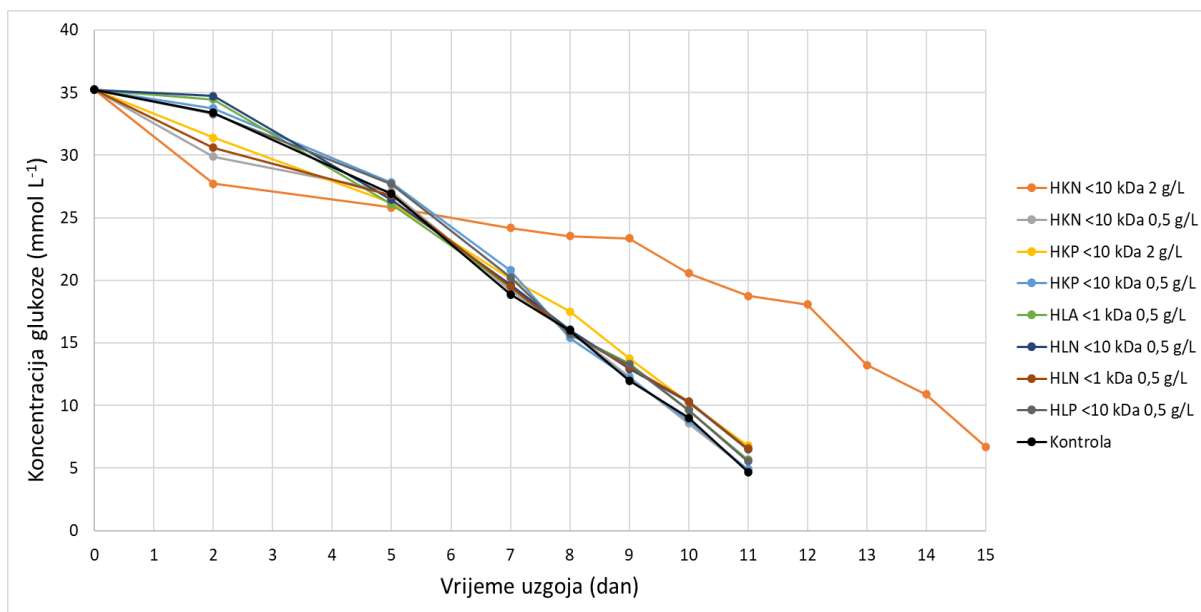
Zaključno na krivulje rasta i vijabilnosti stanica, uzorci 4, 6 i 8, koji sadrže frakcije hidrolizata proteina konoplje i lana s molarnom masom peptida <10 kDa i koji su u koncentraciji od 0,5 g L⁻¹, pokazali su bolji rast i dosegli veću maksimalnu koncentraciju stanica u odnosu na kontrolni uzorak. Nadalje, najslićnije kontrolnom uzorku rastao je uzorak 5 (HLA <1 kDa 0,5 g L⁻¹), a znatnija odstupanja od kontrolnog uzorka u negativnom smjeru imali su uzorci 1 i 3, koji sadrže frakcije hidrolizata proteina konoplje veličine proteina <10 kDa te u koncentraciji od 2 g L⁻¹. U kategoriju uzoraka koji su slabije rasli u odnosu na kontrolni uzorak može se staviti i uzorak 7 (HLN <1 kDa 0,5 g L⁻¹), jer je nakon naglog porasta u broju stanica između 6. i 7. dana uzgoja, već 8. dan koncentracija stanica u tom uzorku pala ispod koncentracije stanica u kontrolnom uzorku. Prema dobivenim podacima, u konačnici se može zaključiti da koncentracija hidrolizata proteina lana i konoplje od 0,5 g L⁻¹ djeluje puno povoljnije na rast i vijabilnost CHO DP-12 stanica u odnosu na 4 puta veću koncentraciju od 2 g L⁻¹, što je u skladu s podacima dobivenima za učinak navedenih hidrolizata konoplje i lana, gdje je zaključeno da hidrolizati dodani u većim koncentracijama imaju izraženiji, pozitivan ili negativan, učinak na rast stanica (Logarušić i sur. 2020; Logarušić i sur., 2019). Nadalje, bolji su učinak na rast stanica pokazale

frakcije hidrolizata koje imaju veličinu proteina <10 kDa, u odnosu na frakcije koje imaju veličinu proteina <1 kDa. Naime, mnogi znanstvenici u svojim radovima pretpostavljaju kako je uloga malih peptida da budu izvor nutrijenata, a veći peptidi imaju ulogu faktora rasta, zbog čega je nekoliko studija predložilo kako bi se kombiniranjem više proteinskih frakcija različitih molekulskih masa potencijalno postigao kumulativni efekt pozitivnih učinaka različitih veličina peptida (Farges-Haddani i sur., 2006).

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

U ovom diplomskom radu istražen je i utjecaj dodataka proteinskih hidrolizata konoplje i lana u hranjivi medij na metabolizam stanične linije. Naime, kod razvoja neke stanične linije u obzir se mora uzeti mnoštvo intrinzičnih (genetičkih), kao i ekstrinzičnih (okolišnih) faktora, koji promoviraju dobar stanični rast, produljuju staničnu vijabilnost te povećavaju specifičnu produktivnost stanica, a koji istovremeno moraju održavati stanični metabolizam učinkovitim. U kontekstu razvoja staničnih linija, metaboličke potrebe CHO stanične linije već su zadnja 3 desetljeća predmet istraživanja, s ciljem poboljšanja njihove učinkovitosti u proizvodnji rekombinantnih terapijskih proteina visoke kvalitete. Ta su istraživanja pokazala da je uzgoj CHO stanične linije karakteriziran brзом konzumacijom primarnih izvora ugljika i energije, prvenstveno glukoze i glutamina, pri čemu dolazi do akumulacije laktata i amonijaka, inhibitornih metaboličkih nusprodukata. U kontekstu biotehnoški važnih fenotipova CHO stanica, istraživanjima je dokazano da glikolitički metabolizam prevladava tijekom eksponencijalne faze rasta, tijekom koje se u životinjskim stanicama 60-80 % piruvata nastalog iz glukoze u anaerobnim uvjetima prevodi u laktat pomoću enzima laktat dehidrogenaze, dok se ostatak glukoze u ciklusu limunske kiseline razgrađuje do CO_2 i H_2O , što povećava specifičnu produktivnost stanica (Kelly i sur., 2018; Tayi i Butler, 2014). Istraživanja su pokazala da laktat negativno utječe na rast i produktivnost stanica u koncentracijama iznad 20 mmol L^{-1} (Tayi i Butler, 2014), dok amonijak već u koncentracijama $2\text{-}10 \text{ mmol L}^{-1}$ može imati negativan učinak na rast i produktivnost stanica, kao i na glikozilaciju te potencijalno na biološku aktivnost, stabilnost i/ili imunogeničnost pojedinih rekombinantnih glikoproteina (Freund i Croughan, 2018). Upravo zbog utjecaja navedenih metabolita na sastav medija i ponašanje stanične kulture u tim uvjetima, tijekom uzgoja je praćena potrošnja glukoze (slika 10) te nakupljanje laktata (slika 11) i amonijaka (slika 12).

Prema slici 10 vidljivo je da je većina uzoraka imala podjednaku potrošnju glukoze kao i kontrolni uzorak tijekom cijelog vremena trajanja uzgoja, izuzev uzoraka 2, 3 i 7, koji su od početka do 2. dana uzgoja imali veću potrošnju glukoze u odnosu na kontrolni uzorak, te uzorka 1, koji je, u odnosu na kontrolu i ostale uzorke, kasnije započeo eksponencijalnu fazu rasta te sukladno tome i kasnije krenuo intenzivnije trošiti glukozu. Naime, povećana potrošnja glukoze u odnosu na kontrolu kod uzoraka 3 i 7 tijekom prva dva dana može se objasniti znatno većim porastom u koncentraciji stanica u tim uzorcima u odnosu na kontrolni uzorak. Nadalje, uzorak 2 je u prva dva dana imao manji porast u broju stanica u odnosu na kontrolu, no kod ovog uzorka je zanimljivo što je, od svih uzoraka i kontrole, imao najvišu relativnu specifičnu produktivnost (157, 67 % kontrole), pa bi se veća potrošnja glukoze u prvim danima uzgoja eventualno mogla pripisati ranom početku proizvodnje IgG-a, no produktivnost stanica tema je tek sljedećeg poglavlja. S druge strane, već istaknuti uzorak 1, koji sadrži frakciju hidrolizata proteina konoplje u koncentraciji od 2 g L^{-1} te s proteinima molarne mase $<10 \text{ kDa}$, ima znatno različitu krivulju potrošnje glukoze od svih ostalih uzoraka. Naime, kod uzorka 1 također je, kao i kod uzorka 2, vidljiva veća potrošnja glukoze u prva dva dana unatoč manjem porastu u broju stanica u odnosu na kontrolu, te je također imao visoku relativnu specifičnu produktivnost (133, 96 % kontrole). Kao i kod uzorka 2, visoka specifična produktivnost uzorka 1 mogla bi upućivati na to da su stanice uzorka 1 počele proizvoditi IgG već tijekom prvih dana uzgoja. Nadalje, prema krivulji rasta stanica (slika 8) vidljivo je da se najintenzivniji rast stanica u uzorku 1 događa između 9. i 13. dana, što se poklapa s intenzivnijom potrošnjom glukoze tijekom tih dana. Također, ako se povuče paralela između krivulje rasta (slika 8) i krivulje koja pokazuje potrošnju glukoze tijekom uzgoja (slika 10), vidljivo je da kontrola ima najveću krajnju potrošnju glukoze, to jest najnižu koncentraciju glukoze na kraju uzgoja ($4,69 \text{ mmol L}^{-1}$), što se poklapa s najvišom koncentracijom stanica u kontrolnom uzorku na kraju uzgoja ($3,45 \times 10^6 \text{ st mL}^{-1}$). Zaključno, smanjivanje koncentracije glukoze tijekom uzgoja potvrđuje očekivanja, s obzirom da je glukoza glavni izvor ugljika i energije, potrebne za rast i proliferaciju stanica te proizvodnju staničnih produkata.

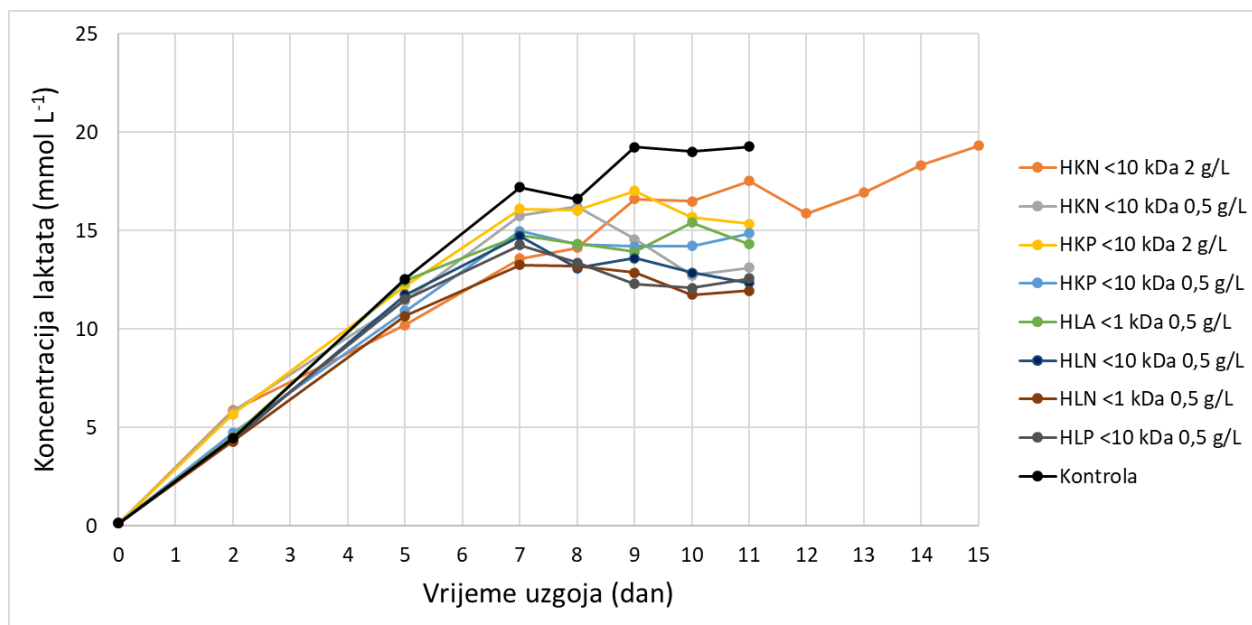


Slika 10. Prikaz promjene koncentracije glukoze u hranjivom mediju tijekom uzgoja

Kratice: *HK-hidrolizat konoplje; HL-hidrolizat lana; zadnje slovo označava proteolitičke enzime kojima su hidrolizati dobiveni: N-*Neutrase*TM; P-*Protamex*TM; A-*Alcalase*TM

Kao nusprodukt metabolizma glukoze u hranjivom mediju nakuplja se laktat. Naime, brzina glikolize je 10-100 puta veća od brzine potpune oksidacije glukoze u mitohondrijima u ciklusu limunske kiseline, zbog čega dolazi do akumulacije laktata tijekom glikolize u aerobnim uvjetima (uvjeti eksperimenta su aerobni, tj. atmosfera u kojima se stanice održavaju sadrži 95 % zraka i 5% CO₂), iako do nakupljanja laktata dolazi u uvjetima manjka kisika. Taj fenomen naziva se i *Warburg-ov efekt* (engl. *The Warburg effect*) (Kelly i sur., 2018). Laktat u mediju tijekom uzgoja može usporiti rast stanica, zbog čega je tijekom uzgoja praćena promjena njegove koncentracije u uzorcima, kao što je prikazano na slici 11.

Na slici 11 vidljivo je da koncentracija laktata u svim uzorcima konstantno raste do 7., odnosno 8. dana uzgoja, što se poklapa s intenzivnom potrošnjom glukoze u eksponencijalnoj fazi rasta uzoraka. Nešto veća koncentracija laktata u odnosu na kontrolu i ostale uzorke izmjerena je u mediju tijekom prva dva dana uzgoja u uzorcima 1 (HKN < 10 kDa 2 g L⁻¹), 2 (HKN <10 kDa 0,5 g L⁻¹) i 3 (HKP <10 kDa 2 g L⁻¹), što se također poklapa s povećanom potrošnjom glukoze u tim uzorcima u tom periodu (slika 10).



Slika 11. Prikaz promjene koncentracije laktata u hranjivom mediju tijekom uzgoja

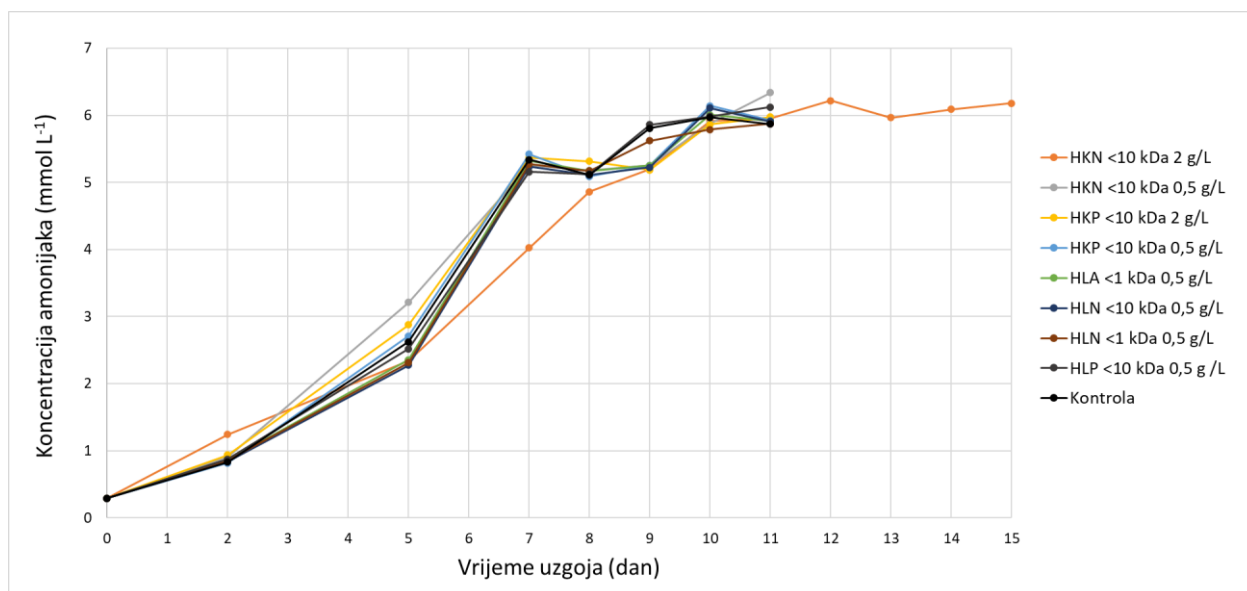
Kratice: *HK-hidrolizat konoplje; HL-hidrolizat lana; zadnje slovo označava proteolitičke enzime kojima su hidrolizati dobiveni: N-*Neutrase*TM; P-*Protamex*TM; A-*Alcalase*TM

Nadalje, nakon dugotrajnog porasta u koncentraciji laktata u uzorcima, od 7. do 8., odnosno 9. dana svim uzorcima i kontroli, izuzev uzorka 1, koncentracija laktata opada, nakon čega ponovno raste i u nekim uzorcima 2-3 dana kasnije dolazi do ponovnog pada u koncentraciji. U uzorku 1 koncentracija laktata počinje znatnije rasti nakon 8. dana, kada se stanice u tom uzorku nalaze na početku eksponencijalne faze, te koncentracija nastavlja rasti do kraja uzgoja, izuzev pada u koncentraciji između 11. i 12. dana. Takav iznenadan pad u koncentraciji laktata u svim uzorcima i kontroli može biti posljedica promjene u metabolizmu laktata, pri čemu stanice mijenjaju svoj metabolizam iz proizvodnje u konzumaciju laktata, što se obično događa kada je koncentracija glukoze u hranjivom mediju relativno niska, a laktata relativno visoka, iako to ne mora biti slučaj. Naime, istraživanja provedena na CHO stanicama pokazala su da se laktat uglavnom proizvodi u eksponencijalnoj fazi rasta, kad se i glukoza intenzivnije troši, a određene stanične linije i subklonovi proizvedeni laktat počinju konzumirati ulaskom u stacionarnu fazu rasta. Takav metabolički prijelaz iz proizvodnje u konzumaciju laktata može produljiti životni vijek te povećati produktivnost uzgajanih stanica, jer se na taj način smanjuje koncentracija ovog toksičnog nusprodukta u hranjivom mediju (Kelly i sur., 2018).

Osim promjene koncentracije laktata, tijekom uzgoja praćena je i promjena koncentracije amonijaka, nusprodukta metabolizma aminokiselina. Međutim, u usporedbi s laktatom, utjecaj amonijaka na stanice znatno je jači, odnosno niža koncentracija amonijaka u odnosu na koncentraciju laktata uzrokuje istu razinu inhibicije rasta (Li i sur., 2011). Amonijak kao nusprodukt nastaje u procesu razgradnje L-glutamina, esencijalne aminokiseline koja je uz glukozu najvažniji izvor ugljika i energije u hranjivom mediju, te su potrebe stanica u kulturi za ovom aminokiselinom 3 - 40 puta veće u odnosu na druge aminokiseline. Naime, L-glutamin je esencijalna aminokiselina jer je izvor dušika potrebnog za sintezu NADH, NADPH i nukleotida, no ona je nestabilna te se spontano tijekom uzgoja razgrađuje na glutamat i nusprodukt amonijak (Yao i Asayama, 2017; Arora, 2013). Kod CHO stanica u kulturi amonijevi ioni se spontanom difuzijom izlučuju iz stanica u hranjivi medij, zbog čega u mediju tijekom uzgoja raste koncentracija istih, čime dolazi do postupne inhibicije rasta stanica. Stoga je tijekom uzgoja mjerena koncentracija amonijaka u hranjivom mediju za sve uzorke i kontrolu, a dobiveni podaci prikazani su na slici 12.

Na slici 12 vidljivo je da je koncentracija amonijaka u svim uzorcima medija rasla tijekom cijelog uzgoja, a usporavanje u rastu koncentracije amonijaka slijedi oko 7., odnosno 8. dana uzgoja, kada većina uzoraka prestaje intenzivno rasti, odnosno kada stanice u uzorcima izlaze iz eksponencijalne faze rasta. Padovi u koncentraciji 8. i 11. dana, odnosno 13. dana za uzorak 1, nisu u skladu s literaturnim navodima. Stoga oni mogu biti rezultat nepreciznog mjerenja, grešaka u pipetiranju, starosti uzorka, kvalitete kit-a za mjerenje koncentracije, kao i malog broja napravljenih paralela.

Količina amonijaka raste sve brže porastom broja stanica u kulturi i dostiže koncentraciju od 6 mmol L⁻¹ 8. ili 9. dan uzgoja. U tom vremenu stanice su započele fazu odumiranja, odnosno naglo im je počela padati vijabilnost, što je vidljivo na slikama 8 i 9. Ti podaci u skladu su s literaturnim navodima, koji nalažu da koncentracije amonijaka od samo 2 – 10 mmol L⁻¹ mogu utjecati negativno na rast, ali i produktivnost stanica u kulturi (Freund i Croughan, 2018). Osim toga, nagli pad u vijabilnosti stanica te ponovni rast koncentracije amonijaka u fazi odumiranja stanica posljedica je narušenog integriteta stanične membrane, uslijed čega se još više amonijaka otpušta u hranjivi medij.

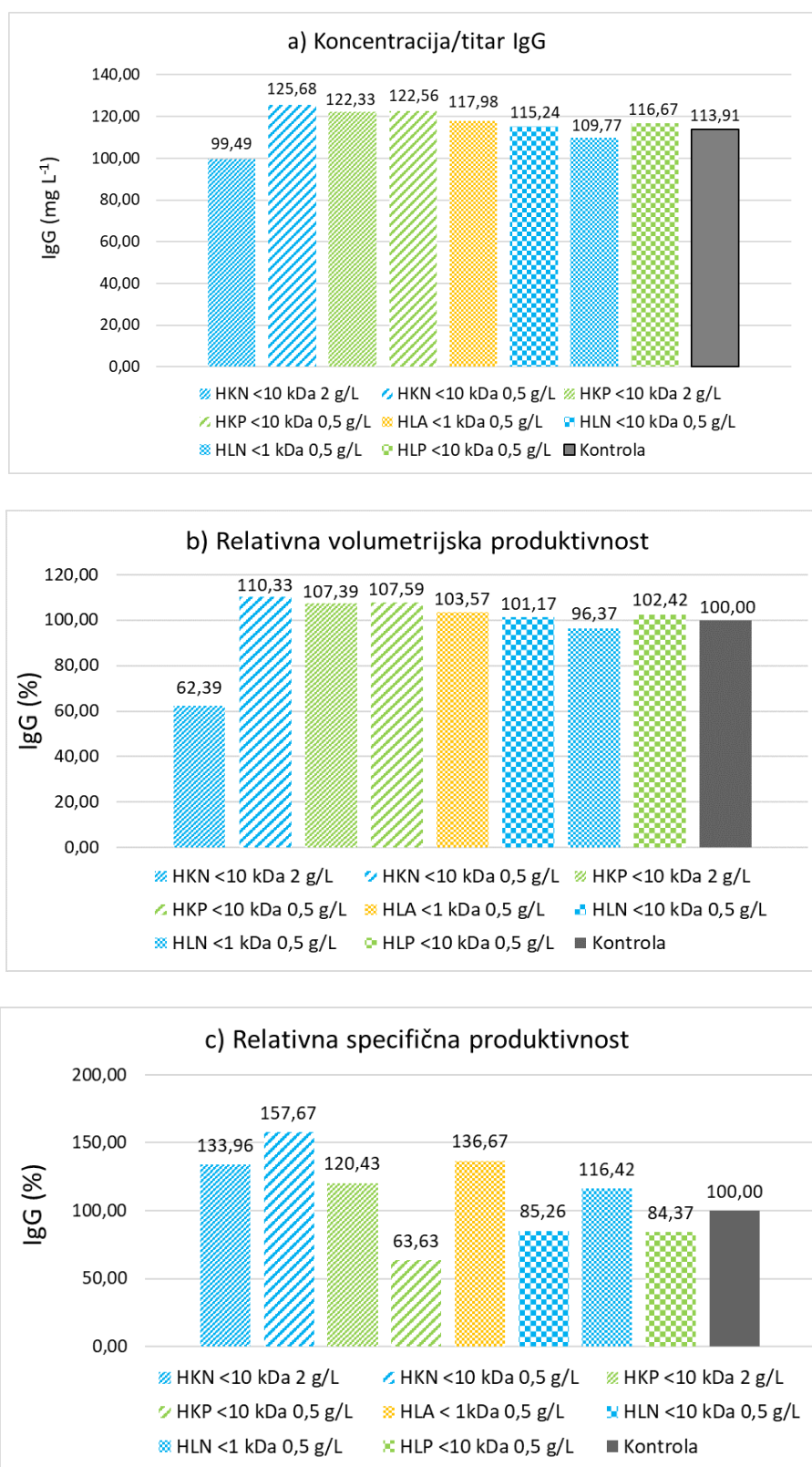


Slika 12. Prikaz promjene koncentracije amonijaka u hranjivom mediju tijekom uzgoja

Kratice: *HK-hidrolizat konoplje; HL-hidrolizat lana; zadnje slovo označava proteolitičke enzime kojima su hidrolizati dobiveni: N-*Neutrase*TM; P-*Protamex*TM; A-*Alcalase*TM

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

U ovom diplomskom radu korištena je CHO DP-12 stanična linija, koja proizvodi rekombinantno humano monoklonsko protutijelo anti-IL-8, izotip IgG1. Produktivnost korištene stanične linije u kontroli te uzorcima u koje su dodani hidrolizati proteina konoplje i lana određena je mjerenjem koncentracije navedenog protutijela predzadnjeg, tj. 10. dana uzgoja (odnosno 14. dana u slučaju uzorka 1). Dobiveni rezultati prikazani su grafičkim prikazima ukupnog titra IgG-a (slika 13a) te relativne volumetrijske (slika 13b) i relativne specifične produktivnosti (slika 13c), pri čemu relativne vrijednosti pokazuju produktivnosti u uzorcima koji sadrže hidrolizate u odnosu na kontrolni uzorak, koji ne sadrži.



Slika 13. Prikaz koncentracije proizvedenog protutijela (a), relativne volumetrijske produktivnosti (b) i relativne specifične produktivnosti (c) CHO DP-12 stanične linije u uzorcima hranjivog medija s dodatkom peptidnih frakcija hidrolizata konoplje i lana

Kratice: *HK-hidrolizat konoplje; HL-hidrolizat lana; zadnje slovo označava proteolitičke enzime kojima su hidrolizati dobiveni: N-*Neutrase*TM; P-*Protamex*TM; A-*Alcalase*TM

Prema slici 13a vidljivo je da je najveća koncentracija ($125,68 \text{ mg L}^{-1}$) protutijela IgG predzadnjeg dana uzgoja izmjerena u uzorku 2 (HKN $<10 \text{ kDa}$ $0,5 \text{ g L}^{-1}$), iako je taj uzorak gotovo tijekom cijelog uzgoja slabije rastao od kontrole (slika 8). S druge strane, najmanja koncentracija ($99,49 \text{ mg L}^{-1}$), manja i od kontrole, izmjerena je u uzorku 1 (HKN $<10 \text{ kDa}$ 2 g L^{-1}), koji je dosta kasno u odnosu na kontrolu i druge uzorke započeo eksponencijalnu fazu rasta, te mu se općenito profil rasta i promjene koncentracije metabolita razlikuju od drugih uzoraka. Upravo zbog takvih razlika, osobito u slučaju uzorka 1, relevantniji su podaci koji prikazuju relativne vrijednosti produktivnosti u odnosu na kontrolu (slike 13b i 13c). Nadalje, na slici 13a vidljivo je da su u uzorcima hranjivog medija s dodanim hidrolizatima konoplje (izuzev uzorka 1) izmjerene više koncentracije dobivenog IgG-a na kraju uzgoja u odnosu na one uzorke u koje su dodani hidrolizati proteina lana. Dobivene koncentracije IgG-a na kraju uzgoja u uzorcima s hidrolizatima proteina lana (uzorci 5 – 8) sličnije su koncentracijama dobivenima u kontrolnom uzorku, a međusobno uspoređujući te uzorke, najniža koncentracija IgG-a postignuta u uzorcima s hidrolizatima lana ($109,77 \text{ mg L}^{-1}$), ujedno i jedina vrijednost niža od kontrole, dobivena je u uzorku 7 (HLN $<1 \text{ kDa}$ $0,5 \text{ g L}^{-1}$). Nadalje, uspoređujući ovisnost koncentracije hidrolizata konoplje o dobivenoj koncentraciji IgG-a, na slici 13a vidljivo je da su uzorci u kojima su hidrolizati konoplje bili prisutni u koncentraciji od $0,5 \text{ g L}^{-1}$ proizveli veće koncentracije IgG-a ($125,68 \text{ mg L}^{-1}$ i $122,56 \text{ mg L}^{-1}$) u odnosu na uzorke u kojima su hidrolizati konoplje bili prisutni u 4 puta većoj koncentraciji ($99,49 \text{ mg L}^{-1}$ i $122,33 \text{ mg L}^{-1}$). S druge strane, uspoređujući ovisnost veličine proteina u frakcijama hidrolizata lana o dobivenoj koncentraciji IgG-a, može se napraviti usporedba uzoraka 6 (HLN $<10 \text{ kDa}$ $0,5 \text{ g L}^{-1}$) i 7 (HLN $<1 \text{ kDa}$ $0,5 \text{ g L}^{-1}$), jer su navedeni hidrolizati lana dobiveni pomoću istog enzima (*Neutrase*).

Na datom primjeru veću koncentraciju IgG-a proizveo je uzorak 6 ($115,24 \text{ mg L}^{-1}$), koji je sadržavao frakciju hidrolizata s proteinima veće molarne mase, u odnosu na uzorak 7 ($109,77 \text{ mg L}^{-1}$), koji je sadržavao frakciju hidrolizata s proteinima manje molarne mase. Naime, prema već dobivenim i raspravljenim podacima o rastu uzoraka s dodanim različitim frakcijama hidrolizata, zaključeno je da frakcije koje sadrže proteine veće molarne mase povoljnije utječu na rast, a prema ovim podacima i na produktivnost stanične kulture. Također, uspoređujući dobivene koncentracije IgG-a u uzorcima koji su sadržavali hidrolizate proteina lana o enzimu koji je korišten u pripremi hidrolizata, najveću koncentraciju protutijela ($117,98 \text{ mg L}^{-1}$) proizveo je uzorak 5, koji je sadržavao frakciju hidrolizata dobivenog mikrobnom proteazom *Alcalase*. Daljnjom usporedbom enzima koji su proveli hidrolizu proteinskog hidrolizata uljne pogače lana, poslije hidrolizata pripremljenih enzimom *Alcalase*, najbolju produktivnost imali su

uzorci s hidrolizatima lana pripravljenima enzimom *Protamex*, te u konačnici uzorci s hidrolizatima lana pripravljenima enzimom *Neutrase*. Naime, dosadašnja istraživanja (Logarušić i sur., 2020) na projektu u sklopu kojeg je napravljen ovaj diplomski rad, pokazuju da enzim *Alcalase* ima najviši stupanj hidrolize, zatim *Protamex* pa tek onda *Neutrase*. Prema tome se može zaključiti da manji peptidi dobiveni hidrolizom višeg stupnja imaju bolji učinak na produktivnost stanične linije u odnosu na veće peptide, koji su dobiveni hidrolizom nekog nižeg stupnja.

Volumetrijska produktivnost prikaz je produktivnosti uzgajanih CHO DP-12 stanica po danu uzgoja, a relativna volumetrijska produktivnost pokazuje postotak volumetrijske produktivnosti svakog pojedinog uzorka u odnosu na volumetrijsku produktivnost kontrole. Prema slici 13b vidljivo je da su svi uzorci, izuzev uzoraka 1 (HKN <10 kDa 2 g L⁻¹) i 7 (HLN <1 kDa 0,5 g L⁻¹), imali bolju volumetrijsku produktivnost u odnosu na kontrolu. Pritom uzorak 2 (HKN <10 kDa 0,5 g L⁻¹) i dalje ima najbolju volumetrijsku produktivnost, te općenito uzorci u kojima su prisutni hidrolizati konoplje (izuzev uzorka 1) pokazuju bolju volumetrijsku produktivnost u odnosu na uzorke u kojima su prisutni hidrolizati proteina lana. Volumetrijska produktivnost uzoraka koji sadrže hidrolizate lana vrlo je slična kontrolnom uzorku.

Količina proizvoda u ovisnosti o broju stanica i trajanju proizvodne faze naziva se specifična produktivnost. Relativne vrijednosti specifične produktivnosti stanica u kulturama s dodanim hidrolizatima, u odnosu na kontrolu, prikazane su na slici 13c. U ovom istraživanju podaci o specifičnoj produktivnosti potencijalno su i najvažniji upravo zbog toga što daju informaciju o prosječnoj proizvodnji IgG-a po stanici u nekom uzorku po danu, te u usporedbi s krivuljom rasta mogu se dobiti podaci o tome koje su frakcije hidrolizata proteina najbolje utjecale na produktivnost uzgajanih stanica. Prema grafičkom prikazu relativnih specifičnih produktivnosti uzoraka (slika 13c) vidljivo je da uzorak 2 (HKN <10 kDa 0,5 g L⁻¹) znatno iskače od kontrole (157,67 %), kao i od ostalih uzoraka. Naime, zanimljivo je to da je uzorak 2 slabije rastao od kontrole gotovo cijelo vrijeme uzgoja, a nakon 7. dana uzgoja, kada se uzorak 2 nalazio u stacionarnoj fazi rasta, njegova vijabilnost počinje padati brže od svih ostalih uzoraka, uključujući i kontrolu (slika 9), dok ne dostigne najnižu vijabilnost na kraju uzgoja (45,83 %). Takav nagli pad u vijabilnosti stanica tijekom i nakon stacionarne faze rasta, uzevši u obzir i maksimalnu dobivenu koncentraciju IgG-a, kao i najveću volumetrijsku i specifičnu produktivnost u ovom uzorku, može upućivati na to da se u tom periodu uzgoja velika količina stanične energije trošila na proizvodnju protutijela, a mala količina na daljnje dijeljenje stanica i njihovo održavanje na životu. Također, pretpostavka je i da se IgG u uzorku 2 proizvodio i

tijekom eksponencijalne faze rasta u većoj količini u odnosu na kontrolu, što podupire činjenica da je uzorak 2 slabije rastao nego kontrolni uzorak. Nadalje, prema slici 13c, vidljivo je da su svi uzorci, izuzev uzoraka 4 (HKP <10 kDa 0,5 g L⁻¹), 6 (HLN <10 kDa 0,5 g L⁻¹) i 8 (HLP <10 kDa 0,5 g L⁻¹) imali veću specifičnu produktivnost od kontrolnog uzorka. Gledajući krivulju rasta stanica (slika 8), vidljivo je da su upravo ovi uzorci postigli veće koncentracije stanica od kontrolnog uzorka, a tek 9. dana, dan prije mjerenja koncentracije IgG-a, im je naglo počela padati vijabilnost stanica. Prema navedenim podacima može se zaključiti da navedene frakcije hidrolizata proteina lana i konoplje pozitivno utječu na rast i proliferaciju CHO DP-12 stanične linije, no imaju slabiji učinak na njezinu produktivnost. Naime, iako su u tim uzorcima u odnosu na kontrolu dobivene veće koncentracije IgG-a na kraju uzgoja (slika 13a), s obzirom na vrijednosti specifične produktivnosti stanica u tim uzorcima, može se zaključiti da je dobivena koncentracija IgG-a posljedica velike gustoće stanica, no ne i veće produktivnosti pojedinih stanica u kulturi. Vrlo zanimljiv podatak sa slike 13c je vrlo visoka vrijednost specifične produktivnosti (133,96 % Kontole) uzorka 1 (HKN <10 kDa 2 g L⁻¹), s obzirom na to da su vrijednosti ukupnog titra IgG-a (slika 13a) i volumetrijske produktivnosti (slika 13b) za taj uzorak uočljivo najniže u odnosu na kontrolu i ostale uzorke. Naime, navedeni uzorak najslabije je rastao tijekom cijelog vremena uzgoja (slika 7), te je isto tako imao i najniže vrijednosti vijabilnosti stanica (slika 9), no unatoč tome njegova specifična produktivnost relativno je visoka u odnosu na kontrolu. Stoga se može zaključiti da navedena frakcija hidrolizata konoplje u koncentraciji od 2 g L⁻¹ negativno utječe na rast stanica, odgađa početak eksponencijalne faze rasta, no pozitivno utječe na produktivnost stanica, odnosno ovi podaci govore da pojedina stanica u uzorku 1 po danu proizvede više protutijela, nego što je to slučaj s kontrolnim uzorkom. Prema slici 13c, također je vidljivo da uzorci 5 i 7, koji sadrže frakcije hidrolizata lana s veličinom proteina <1 kDa, imaju znatno veću relativnu specifičnu produktivnost u odnosu na uzorke 6 i 8, koji sadrže frakcije hidrolizata lana s veličinom proteina <10 kDa, kojima je specifična produktivnost manja i od kontrole. Pritom je važno napomenuti i činjenicu da su uzorci 5 i 7 slabije rasli u odnosu na kontrolu, dok su uzorci 6 i 8 bolje rasli od kontrole. Ovi podaci upućuju na to da frakcije hidrolizata proteina lana veličine proteina <1 kDa vrlo slabo, gotovo neznatno utječu na rast i proliferaciju stanica, no pozitivno utječu na produktivnost stanica u kulturi. S druge strane, frakcije hidrolizata proteina lana veličine proteina <10 kDa pozitivno utječu na rast i proliferaciju stanica, no isto tako negativno utječu na produktivnost CHO DP-12 stanica. Također, napravljena je i usporedba koncentracije dodanih frakcija hidrolizata konoplje sa enzimima pomoću kojih su ti hidrolizati pripremljeni. Pritom je uočeno da je u uzorcima koji sadrže frakcije hidrolizata konoplje pripremljenog enzimom *Neutrase* (uzorci 1

i 2) veća specifična produktivnost postignuta u uzorku koji je sadržavao 2 g L^{-1} , u odnosu na uzorak koji je sadržavao $0,5 \text{ g L}^{-1}$ hidrolizata. S druge strane, kod uzoraka koji sadrže frakcije hidrolizata konoplje pripravljenog pomoću enzima *Protamex* (uzorci 3 i 4), situacija je obrnuta. Ovi podaci također se mogu povezati s visinom stupnja hidrolize koji su ovi enzimi postigli tijekom pripreme hidrolizata. Naime, u slučaju enzima *Neutrase*, koji ima najniži stupanj hidrolize, odnosno produkt njegove hidrolize je manji broj većih peptida, logično je da je stanicama potrebna veća koncentracija tih peptida kako bi zadovoljile svoje metaboličke potrebe. S druge strane, u slučaju enzima *Protamex*, koji hidrolizom daje veći broj manjih peptida, logično je da je stanicama potrebna manja koncentracija takvog hidrolizata za zadovoljenje svojih metaboličkih potreba.

Zaključno na dobivene podatke o produktivnosti CHO DP-12 stanične linije, frakcije hidrolizata konoplje dodane uzorcima 1 (HKN $<10 \text{ kDa } 2 \text{ g L}^{-1}$), 2 (HKN $<10 \text{ kDa } 0,5 \text{ g L}^{-1}$) i 3 (HKP $<10 \text{ kDa } 2 \text{ g L}^{-1}$), negativno su utjecale na rast i proliferaciju stanica, dok su istovremeno pozitivno utjecale na produktivnost pojedinih stanica u kulturi. Međutim, frakcija hidrolizata proteina konoplje HKN $<10 \text{ kDa}$ u koncentraciji od 2 g L^{-1} u konačnici daje najmanji titar IgG-a iako je uzgoj tog uzorka najdulje trajao, upravo zbog znatno niže postignute koncentracije stanica u odnosu na kontrolu i ostale uzorke. Iz toga se može zaključiti da, upravo zbog visoke citotoksičnosti navedenog hidrolizata konoplje u koncentraciji od 2 g L^{-1} , visoka specifična produktivnost postignuta u tom uzorku i dalje ne nadvladava malu koncentraciju IgG-a dobivenu na kraju uzgoja, zbog čega se u konačnici može reći da frakcija hidrolizata HKN $<10 \text{ kDa}$ u koncentraciji 2 g L^{-1} sveukupno negativno utječe na rast i produktivnost CHO DP-12 stanica. Nadalje, uspoređujući uzorke s dodanim frakcijama hidrolizata konoplje, jedino je uzorak 4 (HKP $<10 \text{ kDa } 0,5 \text{ g L}^{-1}$) imao specifičnu produktivnost manju od kontrole, a istovremeno je bolje rastao od kontrole. Zaključno, navedena frakcija hidrolizata konoplje pozitivno utječe na rast i proliferaciju CHO DP-12 stanica, dok istovremeno negativno utječe na produktivnost istih, no u ovom slučaju veliki broj stanica kompenzira njihovu manju produktivnost, zbog čega je u konačnici dobivena viša koncentracija protutijela u odnosu na kontrolu. Isti primjer kao i kod uzorka 4, pokazale su frakcije hidrolizata lana dodane uzorcima 6 (HLN $<10 \text{ kDa } 0,5 \text{ g L}^{-1}$) i 8 (HLP $<10 \text{ kDa } 0,5 \text{ g L}^{-1}$). Navedeni hidrolizati pokazali su znatan pozitivan učinak na rast i proliferaciju stanica, a istovremeno negativan učinak na specifičnu produktivnost, no u konačnici su proizveli veću koncentraciju IgG-a u odnosu na kontrolni uzorak. Iz navedenih podataka koji govore da frakcije hidrolizata konoplje i lana prisutne u uzorcima 4, 6 i 8 imaju znatan pozitivan učinak na rast i proliferaciju stanica, može se zaključiti da su za bolji rast odgovorni proteini

većih molarnih masa (frakcije <10 kDa), što se slaže s literaturnim podacima, koji govore da veći peptidi imaju ulogu faktora rasta (Farges-Haddani i sur., 2006). Preostali uzorci koji su sadržavali frakcije hidrolizata lana, uzorci 5 (HLA <1 kDa $0,5 \text{ g L}^{-1}$) i 7 (HLN <1 kDa $0,5 \text{ g L}^{-1}$) su, kao i uzorci 1, 2 i 3, pozitivno utjecali na specifičnu produktivnost stanica, iako su slabije rasli od kontrole. Naime, u uzorcima koji sadrže hidrolizate s takvim učinkom na stanice, najviše se ističu uzorci 1 i 7, jer su oni u konačnici proizveli manju koncentraciju IgG-a u odnosu na kontrolu, odnosno bez obzira na njihove visoke vrijednosti specifične produktivnosti, one nisu bile dovoljno visoke da kompenziraju slabiji rast u odnosu na kontrolu. Stoga se za frakciju hidrolizata HLN <1 kDa dodanu u koncentraciji od $0,5 \text{ g L}^{-1}$ može povući paralela s frakcijom HLN <10 kDa 2 g L^{-1} , odnosno reći da ona sveukupno negativno utječe na rast i produktivnost CHO DP-12 stanica.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Ispitane peptidne frakcije <10 kDa hidroliziranih proteina konoplje pripremljenih enzimima *Neutrase* i *Protamex*, dodane u koncentraciji od 2 g L^{-1} negativno utječu na rast CHO DP-12 stanica, dok iste te frakcije dodane u koncentraciji od $0,5 \text{ g L}^{-1}$ nemaju učinak na rast stanica ili ga blago potiču.
2. Peptidna frakcija iz hidrolizata proteina konoplje <10 kDa, pripravljena pomoću enzima *Neutrase* te dodana u medij u koncentraciji od 2 g L^{-1} znatno usporava rast stanica te odgađa početak eksponencijalne faze rasta, no pozitivno utječe na specifičnu produktivnost. S obzirom na jaki citotoksični učinak ovog hidrolizata u navedenoj koncentraciji, ne dolazi do kompenzacije slabog rasta stanica visokom vrijednošću specifične produktivnosti, zbog čega je konačna koncentracija proizvedenog IgG u ovom uzorku bila najniža.
3. Peptidne frakcije hidroliziranih proteina konoplje (HKP) i lana (HLN i HLP) <10 kDa, pripravljene pomoću enzima *Neutrase* i *Protamex*, te dodane u koncentraciji od $0,5 \text{ g L}^{-1}$, pokazale su znatan pozitivan učinak na rast CHO DP-12 stanične linije, no negativan utjecaj na specifičnu produktivnost. Unatoč smanjenoj produktivnosti, stanice u mediju s navedenim hidrolizatima brže su rasle te su u konačnici proizvele veću koncentraciju IgG nego stanice u kontrolnim uvjetima.
4. Peptidne frakcije hidroliziranih proteina lana <1 kDa neznatno utječu na rast stanica, no pozitivno utječu na produktivnost stanica u kulturi, dok peptidi <10 kDa pozitivno utječu na rast stanica, ali negativno utječu na produktivnost CHO DP-12 stanica.
5. Peptidne frakcije hidrolizata proteina konoplje sveukupno su pokazale bolji učinak na produktivnost CHO DP-12 stanične linije u odnosu na peptidne frakcije hidrolizata proteina lana.

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**(5), 598-609. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.07.002>
- Akbar S (2020) *Linum usitatissimum* L. (Linaceae). U: *Handbook of 200 medicinal plants*, Springer, Cham, Švicarska, str. 1101-1121.
- Aliferis KA, Bernard-Perron D (2020) Cannabinomics: Application of metabolomics in *Cannabis* (*Cannabis sativa* L.) research and development. *Front Plant Sci* **11**, 554. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00554>.
- Anonymous 1 (2021) Krivulja rasta, https://handling-solutions.eppendorf.com/fileadmin/_processed_/csm_Cell-growth-curve_white_web_d163926212.jpg. Pristupljeno 11. listopada 2021.
- Anonymous 2 (2021) Lan (*Linum usitatissimum* L), <https://static.fanpage.it/wp-content/uploads/sites/22/2019/05/flaxseed.jpg>. Pristupljeno 5. listopada 2021.
- Anonymous 3 (2021) Neubauerova komorica, [Neubauer Counting Chamber - Bing images](#). Pristupljeno 19. srpnja 2021.
- Anonymous 4 (2021) Mreža Neubauerove komorice, <https://shop.brand.de/en/p949>. Pristupljeno 23. srpnja 2021.
- Arora M (2013) Cell culture media: A review. *Mater Methods* **3**(175), 1-29.
- ATCC (2021) CHO DP-12, [CHO DP-12 clone#1934 \[CHO DP-12, clone#1934 aIL8.92 NB 28605/14\] | ATCC](#). Pristupljeno 10. kolovoza 2021.
- Berljavac S (2019) Djelovanje proteinskog hidrolizata uljne pogače sjemenki lana na rast i produktivnost CHO DP-12 stanica (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- BIOLABO (2014) *Protokol za određivanje koncentracije glukoze*. BIOLABO SA, Maizy, Francuska, [87409 AT GLUCOSE GOD PAP \(biolabo.fr\)](#). Pristupljeno 26. srpnja 2021.
- Butler M (2013) Serum-free media: standardizing cell culture system. *Pharm Bioprocess* **1**(4), 315-318. <http://dx.doi.org/10.4155/pbp.13.45>

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

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. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_3

Chelladurai KS, Christyraj JDS, Rajagopalan K, Yesudhason BV, Venkatachalam S, Mohan M, i sur. (2021) Alternative to FBS in animal cell culture – An overview and future perspective. *Heliyon* **7(8)**, e07686. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07686>

Clarke S, Dillon J (2011) The cell culture laboratory. U: Davis JM (ured.) *Animal Cell Culture: Essential Methods*, 1. izd., John Wiley & Sons, New York, SAD. <https://doi.org/10.1002/9780470669815.ch1>

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.

Du C, Webb C (2011) 2.03 - Cellular systems. U: Murray M (ured.) *Comprehensive Biotechnology*, 2. izd., Academic Press, Cambridge, str. 11-23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00080-5>

ElSohly MA, Radwan MM, Gul W, Chandra S, Galal A (2017) Phytochemistry of *Cannabis sativa* L.. U: Kinghorn A, Falk H, Gibbons S, Kobayashi J (ured.) *Phytocannabinoids. Progress in the chemistry of organic natural products*, vol 103, Springer, Cham, Švicarska, str. 1-36. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_1

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

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

- Frassinetti S, Moccia E, Caltavuturo L, Gabrielle M, Longo V, Bellani L, i sur. (2018) Nutraceutical potential of hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds and sprouts. *Food Chem* **262**, 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.078>
- Freund NW, Croughan MS (2018) A simple method to reduce both lactic acid and ammonium production in industrial animal cell culture. *Int J Mol Sci* **19(2)**, 385. <https://doi.org/10.3390/ijms19020385>
- Ivanić A (2020) Stanični ciklus i smrt stanice u proizvodnoj staničnoj liniji (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Jelić A (2020) Rast i produktivnost CHO DP-12 stanica u kemijski definiranim hranjivim medijima (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2018.08.009>
- Kim JY, Kim YG, Lee GM (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**, 917-930. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3758-5>
- Lan Y, Ohm JB, Chen B, Rao J (2020) Physicochemical properties and aroma profiles of flaxseed proteins extracted from whole flaxseed and flaxseed meal. *Food Hydrocolloid* **104**, 105731. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105731>.
- Li J, Wong CL, Vijayasankaran N, Hudson T, Amanullah A (2011) Feeding lactate for CHO cell culture processes: Impact on culture metabolism and performance. *Biotechnol Bioeng* **109(5)**, 1173-1186. <https://doi.org/10.1002/bit.24389>
- Logarušić M, Radošević K, Bis A, Panić M, Slivac I, Srček VG (2020) Biological potential of flaxseed protein hydrolysates obtained by different proteases. *Plant Food Hum Nutr* **75**, 518-524. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00841-z>
- Logarušić M, Slivac I, Radošević K, Bagović M, Redovniković IR, Srček VG (2019) Hempseed protein hydrolysates' effects on the proliferation and induced oxidative stress in normal and cancer cell lines. *Mol Biol Rep* **46**, 6079-6085. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05043-8>

- 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>
- Megazyme (2018a) *L-Lactic Acid (L-Lactate) Assay Procedure*. Megazyme, Bray, Irska, [K-LATE_DATA.pdf \(megazyme.com\)](https://www.megazyme.com/l-lactate-data.pdf). Pristupljeno 26. srpnja 2021.
- Megazyme (2018b) *L-Glutamine/Ammonia (Rapid) Assay Procedure*. Megazyme, Bray, Irska, [K-GLNAM_DATA.pdf \(megazyme.com\)](https://www.megazyme.com/k-gltnam-data.pdf). Pristupljeno 26. srpnja 2021.
- Parikh M, Netticadan T, Pierce GN (2018) Flaxseed: its bioactive components and their cardiovascular benefits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **314**(2), 146-159. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00400.2017>
- Pasupuleti VK, Holmes C, Demain AL (2010) Applications of protein hydrolysates in biotechnology. U: Pasupuleti V, Demain A (ured.) *Protein Hydrolysates in biotechnology*. Springer, Dordrecht, Nizozemska, str. 1-9. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6674-0_1
- 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/BIOREACTORS_AND_CULTIVATION_SYSTEMS_FOR_CELL_AND_TISSUE_CULTURE). Pristupljeno 3. kolovoza 2021.
- Ritacco FV, Wu Y, Khetan A (2018) Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies. *Biotechnol Progr* **34**(6), 1407-1426. <https://doi.org/10.1002/btpr.2706>
- Ryan JA (2008) Introduction to animal cell culture, Corning Incorporated Life Sciences, Lowell, Massachusetts, SAD, [CLS-AN-042.pdf \(corning.com\)](https://www.corning.com/CLS-AN-042.pdf). Pristupljeno 3. kolovoza 2021.
- Tang Z, Ying RF, Lv BF, Yang LH, Xu Z, Yan LQ, i sur. (2021) Flaxseed oil: Extraction, health benefits and products. *Qual Assur Saf Crop* **13**(1), 1-19. <https://doi.org/10.15586/qas.v13i1.783>
- Tayi V, Butler M (2014) Physiology and metabolism of animal cells for production. U: Hansjörg H, Wagner R (ured.) *Animal cell biotechnology: In Biologics production*, De Gruyter, Berlin, Njemačka, str. 301-325. <https://doi.org/10.1515/9783110278965.301>
- Teparić R (2017) Interna skripta iz predmeta Biokemija 2 (nastavni materijali), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

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

Yao T, Asayama Y (2017) Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Medicine and Biology* **16**(2), 99-117. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (PATRICIA ĐURĐEVIĆ) izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis