

Vijabilnost, stanični ciklus i stanična smrt CHO DP-12 stanica tijekom uzgoja uz dodatak hidrolizata lana i konoplje

Inkret, Paula

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:159:002672>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 22. srpnja, 2021.

Paula Inkret

1484/BPI

**VIJABILNOST, STANIČNI
CIKLUS I STANIČNA SMRT
CHO DP-12 STANICA TIJEKOM
UZGOJA UZ DODATAK
HIDROLIZATA KONOPLJE I
LANA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Zavoda za biokemijsko inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u sklopu HRZZ projekta IP-2016-06-3848: „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Kristine Radošević te uz pomoć Marijana Logarušića mag. ing.

Zahvaljujem se od srca mentorici izv. prof. dr. sc. Kristini Radošević i Marijanu Logarušiću, mag. ing. na uloženom vremenu, trudu, svim savjetima i svojoj pomoći koje su mi pružili za vrijeme izrade ovog diplomskog rada.

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

VIJABILNOST, STANIČNI CIKLUS I STANIČNA SMRT CHO DP-12 STANICA TIJEKOM UZGOJA UZ DODATAK HIDROLIZATA LANA I KONOPLJE

Paula Inkret, 1484/BPI

Sažetak: Biljni hidrolizati se zadnjih desetljeća istražuju kao potencijalna zamjena za životinjski serum, nepoželjan dodatak mediju za uzgoj proizvodnih staničnih linija. Cilj ovoga rada je istražiti *in vitro* utjecaj proteinskih hidrolizata lanene i konopljne pogače na rast i vijabilnost CHO DP-12 stanične linije u suspenzijskom uzgoju. Prati se utjecaj 7 hidrolizata različitih koncentracija i frakcija tijekom suspenzijskog uzgoja i mehanizam njihovog citotoksičnog djelovanja. Hidrolizati nisu značajno utjecali na CHO DP-12 staničnu liniju, osim dva ispitana hidrolizata konoplje u koncentraciji od 2 g L⁻¹. Nefrakcionirani hidrolizat konoplje pripremljen alkalazom ima snažan citotoksičan utjecaj na stanice, dok frakcija hidrolizata konoplje pripremljenog neutrazom manja od 1 kDa usporava rast stanične kulture i značajno odgađa početak log faze rasta. Praćenjem parametara uzgoja (koncentracije stanica, vijabilnosti, koncentracije metabolita) i analizom stanične smrti i staničnog ciklusa, zaključeno je da konopljini hidrolizati djeluju jače citotoksično na proizvodnu staničnu liniju od lanenih hidrolizata, pri čemu dolazi do aktivacije mehanizma stanične smrti.

Ključne riječi: *hidrolizati lana i konoplje, proizvodna stanična linija, stanični ciklus, stanična smrt, vijabilnost*

Rad sadrži: 47 stranica, 17 slika, 4 tablice, 31 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. Kristina Radošević*

Pomoć pri izradi: *Marijan Logarušić, mag. ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc. dr. sc. *Andreja Leboš Pavunc*
2. Izv. prof. dr. sc. *Kristina Radošević*
3. Prof. dr. sc. *Višnja Gaurina Srček*
4. Prof. dr. sc. *Jasna Novak* (zamjena)

Datum obrane: 22. srpnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

CELL VIABILITY, CELL CYCLE AND CELL DEATH IN CHO DP-12 CELLS CULTIVATED IN MEDIA WITH ADDITION OF FLAX AND HEMP HYDROLYSATES

Paula Inkret, 1484/BPI

Abstract: Plant hydrolysates have been investigated as a potential substitute for animal serum, an undesirable supplement of the medium for cultivation of production cell lines. The aim of this study was to investigate the *in vitro* effect of flax and hemp cake hydrolysates on the growth and viability of CHO DP-12 cell line in suspension culture. Except for cultivation parameters (cell concentration, viability, metabolite concentrations), the mechanism of cytotoxic action of hydrolysates on CHO DP-12 cells had been assessed. No significant effect on the CHO DP-12 cell line was observed, except for two hemp hydrolysates at a concentration of 2 g L⁻¹. Unfractionated hemp hydrolyzate prepared by Alkalase has a strong cytotoxic effect, whereas fraction of hemp hydrolyzate prepared by Neutrase smaller than 1 kDa slows down cell growth and significantly delays the beginning of the log phase. Therefore, it was concluded that hemp hydrolysates have a stronger cytotoxic effect on the production cell line CHO DP-12 than flax hydrolysates, whereby the mechanisms of cell death are activated.

Keywords: *flax and hemp hydrolysates, production cell line, cell cycle, cell death, viability*

Thesis contains: 47 pages, 17 figures, 4 tables, 31 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD Kristina Radošević, Associate professor*

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

Reviewers:

1. PhD. *Andreja Leboš Pavunc*, Assistant professor
2. PhD. *Kristina Radošević*, Associate professor
3. PhD. *Višnja Gaurina Srček*, Full professor
4. PhD. *Jasna Novak*, Full professor (substitute)

Thesis defended: the 22nd of July 2021

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. LAN (<i>Linum usitatissimum L.</i>).....	3
2.2. KONOPLJA (<i>Cannabis sativa L.</i>).....	5
2.3. CHO STANIČNA LINIJA	7
2.4. BILJNI HIDROLIZATI U STANIČNIM KULTURAMA.....	10
2.5. STANIČNA SMRT	12
2.6. STANIČNI CIKLUS	15
3. MATERIJALI I METODE.....	18
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. Hidrolizati uljnih pogača lana i konoplje	18
3.1.2. Kemikalije	19
3.1.3. Otopine i puferi	19
3.1.4. Uređaji i oprema.....	20
3.1.5. Stanična linija CHO DP-12	20
3.2. METODE.....	21
3.2.1. Uzgoj CHO DP-12 stanica u suspenzijskoj kulturi	21
3.2.2. Određivanje broja CHO DP-12 stanica metodom tripan-plavo	22
3.2.3. Mjerenje koncentracije metabolita za vrijeme uzgoja CHO DP-12 stanica.....	23
3.2.3.1. Glukoza	23
3.2.3.2. Laktat	24
3.2.3.3. Amonijak	25
3.2.4. Protočna citometrija	27
3.2.4.1. Određivanje tipa stanične smrti primjenom Muse™ analizatora	28
3.2.4.2. Određivanje zastoja u staničnom ciklusu primjenom Muse™ analizatora	29
3.2.5. Statistička obrada rezultata.....	30
4. REZULTATI I RASPRAVA	31
4.1. UTJECAJ HIDROLIZATA LANA I KONOPLJE NA PROLIFERACIJU CHO DP-12 STANIČNE LINIJE	32
4.2. UTJECAJ HIDROLIZATA LANA I KONOPLJE NA SASTAV MEDIJA ZA UZGOJ.....	35
4.3. UTJECAJ HIDROLIZATA LANA I KONOPLJE NA STANIČNU SMRT	38

4.4. UTJECAJ HIDROLIZATA LANA I KONOPLJE NA STANIČNI CIKLUS	41
5. ZAKLJUČCI.....	44
6. LITERATURA.....	45

1. UVOD

Velik broj farmaceutika i novijih lijekova, kao što su cjepiva, monoklonska protutijela i rekombinantni proteini proizvode se pomoću kultura životinjskih stanica, što je grana biotehnološke industrije koja se intenzivno razvija. Zahtjevi za proizvodnjom navedenih lijekova su sve veći, a cijena im je relativno visoka, pa se mnogo napora i financija ulaže u istraživanje i razvoj načina kako smanjiti njihovu cijenu i/ili povećati prinos tih proizvoda. Znanstvena istraživanja u području primjene staničnih kultura za tu namjenu usmjerena su na tehnike poboljšanja uzgoja. Jedan od pristupa je poboljšanje sastava medija koji se koristi za uzgoj proizvodnih staničnih linija te sadrži sve potrebne hranjive tvari za njihov rast. Životinjski serum, kao najskuplja i najmanje pouzdana i sigurna komponenta (neujednačen sastav, mogućnost kontaminacije) koja se dodaje u medij za uzgoj je u fokusu mnogih istraživanja, kojima se nastoji izbjeći njegovo korištenje ili naći mu zadovoljavajuću zamjenu. Stoga se istražuju nove, jeftinije, pristupačnije ili sigurnije tvari ne-životinjskog podrijetla koje se mogu dodati u medij, pri čemu bi bilo poželjno da proliferacija stanica i produktivnost procesa bude jednaka ili čak i bolja u usporedbi s uzgojem tih istih stanica u mediju sa životinjskim serumom.

Biljni hidrolizati se u tom smislu izučavaju već neko vrijeme, jer su dosadašnja istraživanja pokazala da potencijalno mogu biti dobra zamjena za životinjski serum kao dodatak medijima za uzgoj staničnih linija. Najviše istraživanja je do sada provedeno na proteinskim hidrolizatima soje, pamuka i pšenice. Projekt Hrvatske zaklade za znanost „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj“ u sklopu kojega je izrađen ovaj diplomski rad, istražuje proteinske hidrolizate pripravljene iz uljnih pogača lana i konoplje. Iz lana i konoplje se proizvodi ulje, nakon čije proizvodnje ostaje uljna pogača. To je jeftin nusproizvod prehrambene industrije, koji mahom ostaje neiskorišten, iz kojeg se hidrolizom pomoću raznih komercijalnih proteolitičkih enzima mogu proizvesti proteinski hidrolizati različitog sastava. Inače, konoplja i lan su biljke koje se godinama istražuju zbog njihovog poznatog pozitivnog djelovanja na ljudsko zdravlje te sadržaja velikog broja spojeva koji potencijalno mogu imati pozitivno djelovanje na stanice i ljudski organizam u cjelini.

Iz svega gore navedenog, proizlazi cilj ovog rada - proučiti djelovanje određenih proteinskih hidrolizata lana i konoplje na rast suspenzijske CHO DP-12 stanične linije, pri čemu je praćena vijabilnost stanica te koncentracija metabolita tijekom uzgoja. Vijabilnost je praćena brojanjem stanica u Neubaureovoj komorici metodom tripan-plavo. Nadalje, vijabilnost stanica i eventualne razlike u odnosu na kontrolni uzgoj u mediju bez dodatka seruma, pokušale su se povezati s osnovnim stanićnim procesima: stanićna dioba i stanićna smrt. Saznanja o stanićnom ciklusu, odnosno u kojoj fazi ciklusa se stanice nalaze i/ili postotku stanica koje su ušle u proces stanićne smrti daju dodatne informacije o utjecaju hidrolizata na stanice, stoga su također ispitane u ovom radu. Za praćenje stanićnog ciklusa i stanićne smrti korišćeni su komercijalni kitovi i Muse™ analizator stanićnog zdravlja koji radi na principu protoćnog citometra. Oćekivani znanstveni doprinos ovog istraćivanja bio bi povezivanje zapaćenog ućinka hidrolizata na vijabilnost proizvodne CHO DP-12 stanićne linije s osnovnim stanićnim procesima, stanićnim ciklusom i stanićnom smrti u kulturi tijekom suspenzijskog uzgoja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LAN (*Linum usitatissimum* L.)

Lan (*Linum usitatissimum* L.) je jednogodišnja biljka koja pripada obitelji lanovica (*Linaceae*) i rodu *Linum* (slika 1). Lan je porijeklom s obala Bliskog Istoka i Mediterana. Široko je rasprostranjen po cijelome svijetu, a najveću poljoprivrednu površinu zauzima u Aziji i Europi. Sadržaj ulja u sjemenkama lana je općenito iznad 50 %. Sjemenke sadrže α -linolensku kiselinu (engl. *α -linolenic acid*, ALA), razne aminokiseline, vitamine, elemente u tragovima, prehrambena vlakna, lignan itd. što pokazuje dobar potencijal za njihovo korištenje u dijetoterapijske i zdravstvene svrhe. U tom smislu posebno je zanimljiva ALA, koju ljudi ne mogu sintetizirati, a spada u esencijalne polinezasićene masne kiseline. ALA je međuprodukt u biosintezi određenih molekula koje reguliraju upale te imaju imunološke funkcije. Ta činjenica pozitivno pridonosi dobrim zdravstvenim učincima lanenog ulja (Shim i sur., 2014). Osim što iz lanenih sjemenki nastaje ulje koje se koristi u ljudskoj prehrani, ono se koristi i u medicini, aditivima za hranu, kozmetičkim pripravcima, bojama, tiskarstvu te u razne druge svrhe. Lan nije zahtjevna biljka za uzgoj. Najbolje uspijeva na pjeskovitom tlu, s rastresitom zemljom, uz prikladnu drenažu i navodnjavanje te na tlu koje dobro zadržava vodu, blago je kiselo do blago alkalno. Biljci lana je za optimalan rast i razvoj potrebno 14 sati sunčevog svjetla dnevno, a pogodna temperatura za rast je 17 – 22 °C (Gao, 2020).



Slika 1. Prikaz cvijeta biljke lan - *Linum usitatissimum* L. (Anonymous 1, 2021)

Lan se upotrebljava u prehrani, proizvodnji ulja te za proizvodnju tekstilnog vlakna. Laneno ulje se dobiva hladnim prešanjem lanenih sjemenki i služi kao dodatak jelima. Žute je boje i pomalo neugodnog okusa, pa se miješa s drugim namirnicama radi lakše konzumacije.

Lanene sjemenke su zdrave, posebno ako se samelju čime se postiže njihova puna nutritivna vrijednost. Pozitivno djeluju na smirivanje upale želučane sluznice, kod upale ždrijela i usne šupljine te za čišćenje crijeva. Povrh toga, temeljem brojnih istraživanja, laneno sjeme je prihvaćeno kao zdrava hrana s antikancerogenim djelovanjem.

Većina bioloških i kliničkih studija o lanenim sjemenkama usredotočila se na ekstrakte koji sadrže ALA ili lignan. Analiza smeđeg kanadskog lanenog sjemena pokazala je da prosječni sastav komercijalnog sjemena sadrži 41 % masti, 20 % proteina, 28 % ukupnih dijetalnih vlakana, 7,7 % vlage i 3,4 % pepela. Uključene su i manje komponente: cijanogeni glikozidi, fitinska kiselina, fenoli, linatin, lignani (fitoestrogeni), minerali, vitamini, kadmij, selen i ciklolinopeptidi. Eksperimentalno kontrolirane dijete su pokazale brojne blagotvorne učinke konzumacije lanenog sjemena. Otkriveno je da laneno brašno smanjuje proliferaciju epitelnih stanica i kromosomske nepravilnosti u mliječnim žlijezdama ženki štakora. Ovo otkriće ukazuje da laneno sjeme može smanjiti stopu rasta raka dojke. Pored toga, utvrđeno je da lignan, iz lanenog sjemena, smanjuje rast tumora dojke u kasnijim fazama karcinogeneze. Dodaci prehrani čiji sastav sadrži 14 % lanenog ulja i 20 % lanenog brašna smanjuju učestalost formiranja abnormalnih tvorbi izazvanih azoksimetanom (kancerogeni, neurotoksični spoj) kod mužjaka štakora. Slično tome, dokazano je da zamjena kukuruznog brašna s lanenim ili kukuruznog ulja s lanenim, u prehrani štakora, značajno smanjuje veličinu i umnožavanje tumora tankog i debelog crijeva. Također, otkriveno je da je dodatak lanenih proizvoda u prehranu štakora povezan s poboljšanjem koncentracije lipida u krvi. Dodatak od 20 % lana u prehrani štakora smanjio je ukupni kolesterol u krvnoj plazmi (za 21 %), trigliceride (za 34 %) i lipoproteine niske gustoće (za 23 %). Dodatak od 30 % lana u prehranu je imao još bolji učinak, smanjujući iste čimbenike za 33, 67 i 23 %. U istraživanjima na ljudima, primjena 15 g lana dnevno tijekom tri mjeseca povezana je sa smanjenjem triglicerida i lipoproteina niske gustoće (engl. *low density lipoproteins*, LDL) u krvnom serumu. Na lipoproteine visoke gustoće (engl. *high density lipoproteins*, HDL) nije bilo utjecaja što je također pozitivan efekt jer visoke razine LDL i niske razine HDL predstavljaju vodeće čimbenike rizika za razvoj ateroskleroze (Shim i sur., 2014). Još jedno slično istraživanje dokazalo je da je potrošnja od 50 g lana na dan tijekom četiri tjedna smanjila LDL u plazmi za 8 % kod mladih zdravih odraslih osoba (Cunnane i sur., 1995). Ovi

eksperimentalni nalazi podržavaju hipotezu da konzumacija lanenih sjemenki pozitivno utječe na suzbijanje razvoja ateroskleroze, no potrebno je još mnogo istraživanja kako bi se utvrdilo koja konkretno komponenta (ili više njih) doprinosi pozitivnim biološkim učincima.

Sadržaj proteina u lanenom sjemenu varira od 10 do 31 % (Shim i sur., 2014). Proteini iz lana su bogati argininom, aminokiselinom koja ako je prisutna u endotelu krvožilnog sustava i koja može smanjiti krvni tlak. Hranjenje štakora koji su imali povišeni tlak s lanenim proteinskim izolatima (200 mg kg⁻¹ tjelesne težine) utjecalo je na sniženje krvnog tlaka već četiri sata nakon primjene. Enzimskom hidrolizom proteina izoliranih iz lana proteazama nastaju bioaktivne peptidne frakcije. Biološki učinak proteinskih i peptidnih frakcija iz lana, predmet su istraživanja mnogih studija. Na primjer, laneni proteini hidrolizirani s *Flavourzyme*[®] inhibiraju enzim koji proizvodi angiotenzin (uzrokuje sužavanje krvnih žila i porast arterijskog krvnog tlaka). Također, spoznalo se da je ista proteinska frakcija učinkovita u uklanjanju hidroksilnih radikala, odnosno da ima antioksidativno djelovanje. Peptidi iz lana, proizvedeni hidrolizom pomoću enzima termolizina, pronaze i alkalaze, pokazali su biološke aktivnosti u mnogim istraživanjima te se smatraju vrlo zanimljivom skupinom spojeva za proučavanje (Shim i sur., 2014).

2.2. KONOPLJA (*Cannabis sativa* L.)

Cannabis sativa se koristi tisućljećima, prvenstveno kao izvor biljnog vlakna iz stabljike (podvrsta "konoplja"), kao opojno sredstvo (podvrsta "marihuana") i kao izvor jestivih sjemenki (slika 2). *C. sativa* se uglavnom dijeli na tri fenotipa: fenotip I (vrsta droge), sa sadržajem glavnog psihoaktivnog spoja, kanabionoida, Δ^9 -Tetrahidrokanabinola (THC-a) iznad 0,5 % i kanabidiola (CBD) ispod 0,5 %; fenotip II (srednji tip), s CBD-om kao glavnim kanabinoidom, ali i s THC-om prisutnim u raznim koncentracijama; i fenotip III (konoplja), s posebno niskim sadržaja THC-a. Iako se "konoplja" i "marihuana" povremeno tumače kao sinonimi, industrije koje se bave uporabom konopljinih vlakana i konopljinim uljem ulažu napore da se njihovi proizvodi razlikuju od opojnih sredstava. Izrazi koji se koriste kako bi se konoplja razlikovala od marihuane su „industrijska konoplja“ (za proizvodnju vlakna) te „uljana konoplja“ (za proizvodnju ulja). *C. sativa* se smatra autohtonom biljkom zapadne ili središnje Azije, no postoje i neke naznake da potječe iz istočne Azije. Osim sojeva marihuane,

koji obično potječu iz polu-tropskih i vrlo suhih regija, većina biotipova konoplje bolje je prilagođena umjerenim, blagim, relativno hladnim i vlažnim uvjetima (Chandra i sur., 2017).



Slika 2. (a) Podvrsta *Cannabis sativa* koja se naziva marihuana; (b) Podvrsta *Cannabis sativa* koja se naziva konoplja (Chandra i sur., 2017)

C. sativa proizvodi jedinstvenu klasu terpenofenolnih spojeva koji se zovu kanabinoidi. Ukupno je 565 spojeva do sada izolirano iz ove biljke, od čega 120 spojeva pripada fitokanabinoidima. *C. sativa* je stekla veliku popularnost u posljednjih nekoliko desetljeća zbog svojih ljekovitih svojstava koja su poznata od davnina te zato što se smatra potencijalnim izvorom modernih lijekova. Farmaceutska i terapijska svojstva pripravaka nastalih od *C. sativa* i Δ^9 -THC-a su opsežno istražena. Osim Δ^9 -THC-a, postoji još jedan farmaceutski važan kanabinoid iz kanabisa koji se zove kanabidiol (CBD). CBD je postao interesantan znanstvenicima zbog otkrića da djeluje kao antiepileptik što bi moglo biti posebno korisno za liječenje dječje epilepsije.

Ulje konoplje posljednjih je godina sve traženije među potrošačima zdrave hrane zbog idealnog omjera omega-6 i omega-3 masnih kiselina (3 : 1) što ga čini izvrsnim prehranbenim dodatkom ljudskoj prehrani. U zapadnjačkoj prehrani nedostaje omega-3 masnih kiselina, a ima i prekomjerne količine omega-6 masnih kiselina (omjer ω -6: ω -3 iznosi 16 i više) što potiče patogenezu mnogih bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, tumore te upalne i autoimune bolesti. Nadalje, konoplja sadrži do 2 % stearidonske kiseline koja je važan metabolički međuprodukt u biosintetskom putu esencijalnih masnih kiselina. Dobro

uravnotežena mješavina omega-6 linolne i omega-3 linolne kiseline ima važne prehrambene blagodati: proizvodi niži omjer ukupnog i HDL kolesterola (ovaj omjer je prediktor koronarne bolesti srca). Rezultati nedavnih *in vivo* studija pokazuju korelaciju između sadržaja masnih kiselina u konopljinom ulju i pokazatelja kardiovaskularnog zdravlja. Diskretna količina γ -linolenske kiseline u konopljinom ulju dodatno jača njegove zdravstvene dobrobiti jer ona djeluje protuupalno i može se biokemijski prevesti u prostaglandine serije-1, spojeve s potencijalnim protuupalnim i imunoregulacijskim učincima.

Kada se govori o proteinskom sastavu ove biljke, najzastupljeniji su proteini albumin i edestin u omjeru 1 : 2. Ti proteini sadrže esencijalne aminokiseline, uključujući metionin koji sadrži sumpor. Obzirom da sumpor nedostaje u većini ostalih biljnih proteina, ta činjenica predstavlja još jednu zdravstvenu prednost konoplje. Konoplja, kao i lan, ima visoku razinu arginina u svom proteinskom sastavu što je posebno poželjno u farmaceutskoj industriji koja to može iskoristiti kao prehrambeni pripravak za održavanje kardiovaskularnog zdravlja. Konopljini proteini su predmet sve većeg zanimanja akademske zajednice i industrije u pogledu njihove bioaktivnosti. Konoplja u svom sastavu sadrži 25 – 30 % proteina. Pored proteina i lipida konoplja sadrži i tokoferole (uglavnom γ -tokoferol), spojeve s antioksidacijskim djelovanjem. Ostali antioksidanti identificirani u sjemenkama konoplje su polifenoli i lignanamidi. Lignanamidi pokazuju i značajna anti-neuroinflamatorna djelovanja u istraživanjima *in vitro* što upućuje na njihov doprinos u ukupnim zdravstvenim dobrobitima konoplje (Bakowska-Barczak i sur., 2020).

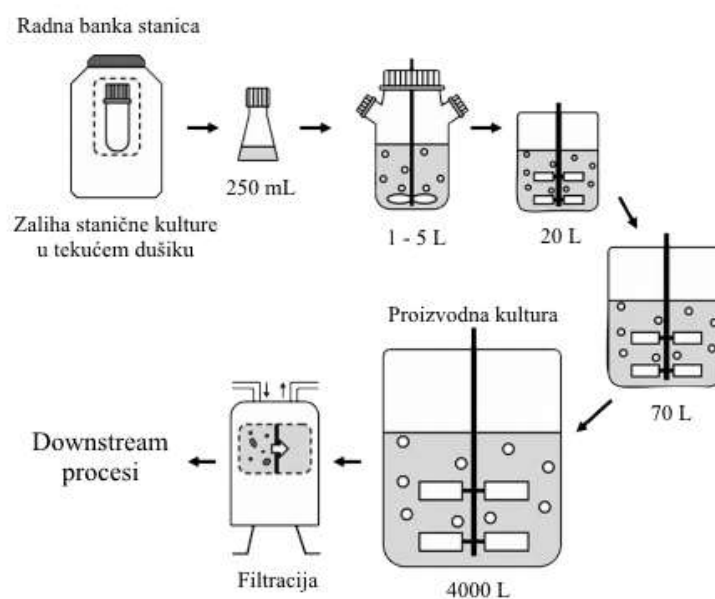
2.3. CHO STANIČNA LINIJA

„Kultura tkiva“ je opći naziv koji se koristi za uklanjanje stanica, tkiva ili organa iz životinje te smještaje takvih stanica, tkiva i organa u umjetno okruženje tj. u medij koji podržava rast u *in vitro* uvjetima jer sadrži mješavinu hranjivih sastojaka. Kada govorimo o uzgoju pojedinačnih stanica koje se razvijaju izvan organizma domaćina, takvu kulturu obično nazivamo „stanična kultura“. Stanična linija je trajna stanična kultura sa svojstvom neograničenog dijeljenja u *in vitro* uvjetima. Dobiva se u laboratoriju spontanom transformacijom stanice ili određenim postupkom imortalizacije čime poprima svojstvo "besmrtnosti", a zadržava karakteristike specifične za samu stanicu. Stanične linije imaju važnu ulogu u znanosti i industriji. Eksperimenti na staničnim linijama uvelike su pridonijeli

razumijevanju različitih područja znanosti kao što su fiziologija stanica, biokemija, genetika, imunologija, virologija, onkologija, toksikologija i dr. Trenutno su životinjske i ljudske stanične linije veoma značajan i raznovrstan alat koji se primjenjuje u znanstvenim istraživanjima (biologije matičnih stanica, biologije tumorskih stanica itd.), ali i u konkretnoj industrijskoj proizvodnji za dobivanje visokovrijednih proizvoda (cjepiva, monoklonska protutijela, rekombinantni proteini) te u farmaceutici i biomedicini (genska terapija, odabir i poboljšanje novih lijekova itd.). Stanične linije prema načinu *in vitro* rasta i uzgoja mogu biti adherentne (prilijepljene za čvrstu podlogu i stjenke) i suspenzijske (stanice nisu pričvršćene za stjenke). Brzina rasta staničnih linija je relativno brza, a vrijeme udvostručavanja je 12 - 24 sata (Nema i Khare, 2012).

CHO (engl. *Chinese hamster ovary*) je stanična linija uspostavljena 1957. godine iz ovarija odrasle ženke kineskog hrčka. To je najbolje okarakterizirana životinjska stanična linija i najčešće korištena u biotehnološkoj industriji što nam potvrđuje podatak iz 2014. godine koji kaže da je preko dvije trećine biofarmaceutika prisutnih na tržištu dobivenih kulturom životinjskih stanica, proizvedeno primjenom suspenzijskih CHO stanica (Kuystermans i Al-Rubeai, 2015). S obzirom na učestalost primjene CHO staničnih linija u industriji i znanosti, ona je jako dobro istražena, a osim toga ova stanična linija ima još nekoliko važnih prednosti. Jednostavne su za uzgoj i sposobne su rasti u suspenzijskoj kulturi pri velikoj gustoći stanica ($> 2 \times 10^7$ stanica mL^{-1}). Zbog toga se CHO stanične linije uzgajaju u šaržnim bioreaktorima s miješalima u volumenima do 20 000 L (slika 3). CHO stanice mogu postići specifičnu produktivnost iznad 50 pg po stanici po danu izlučenih rekombinantnih proteina. Također, postoje već poznati amplifikacijski i selekcijski markeri za CHO stanice: dihidrofolat reduktaza i glutamin sintetaza čija primjena utječe na veći prinos rekombinantnih proteina (više od 1 g L^{-1} za neke proteine). Nadalje, relativno ih je lako transfektirati s plazmidnom DNA koristeći kemijske ili fizikalne metode. Također, rizik od onečišćenja rekombinantnog produkta neželjenim virusima je nizak, jer CHO stanice ne proizvode infektivne endogene retrovire i nisu domaćini za većinu patogenih ljudskih virusa. Mogu se prilagoditi na rast u kemijski definiranom mediju bez dodatka seruma, što je u biotehnološkom procesu poželjno među ostalim iz ekonomskih razloga, budući je serum najskuplja komponenta medija. Nadalje, serum životinjskog podrijetla se nastoji ne koristiti za rast proizvodnih staničnih linija, jer proteini iz seruma otežavaju izolaciju i pročišćavanje konačnog proizvoda, izvor je moguće kontaminacije patogenima iz životinjskih izvora te zbog njegovog neujednačenog i nedefiniranog sastava može rezultirati neujednačenom kakvoćom

proizvoda. Još neke bitne prednosti ove stanične linije su njena neznatna osjetljivost na promjene pH, koncentracije kisika, tlaka i temperature tijekom proizvodnje te sposobnost provođenja posttranslacijskih modifikacija sličnih kao u ljudskim stanicama. Jedna od mana CHO staničnih linija je ta što pri proizvodnji rekombinantnih proteina ne mogu provoditi određene humane posttranslacijske modifikacije glikozilacijom, dok s druge strane proizvode neke glikane koji se ne eksprimiraju u ljudskim stanicama (npr. galaktoza- α -1,3-galaktoza, N-glikolilneuraminska kiselina). Za te glikane se nalaze protutijela u ljudskoj krvi što teoretski može pridonijeti povećanom imunom odgovoru, iako to još uvijek nije jasno dokazano. Takva potencijalna nuspojava se može izbjeći proizvodnjom proteina koji nisu glikozilirani. S obzirom da je prvi bioterapeutik tkivni plazminogeni aktivator (tPA) proizveden pomoću CHO stanica odobren još 1986. godine od čega je prošlo više od 30 godina, CHO stanice se mogu smatrati sigurnim stanicama domaćinima za biotehnološku proizvodnju proizvoda za ljudsku upotrebu (Ivanić, 2020).



Slika 3. Prikaz tipičnog prijenosa procesa u veće mjerilo prilikom korištenja kulture životinjskih stanica kao proizvodne stanične linije (prilagođeno prema Omasa i sur., 2010)

Kako bi se poboljšao prinos i kvaliteta rekombinantnih proteina proizvedenih pomoću CHO stanica, znanstvenici ulažu napore u razne načine njihove genetske modifikacije. Glavna mjesta primjene genetičkog inženjerstva u stanicama su vezana za: biokemijski put nastajanja laktata, glikozilaciju, izlučivanje proteina te proces stanične smrti apoptozom. Dvije glavne

strategije za postizanje tih ciljeva su prekomjerna ekspresija egzogenih gena te smanjenje ili potpuno utišavanje ekspresije endogenih gena. Mutageniza jednog ili oba alela endogenog gena zahtjevan je zadatak u CHO stanicama zbog relativno visoke razine genetskih varijacija, pa se u posljednje vrijeme koriste neke novije metode poput *antisense* RNA, malih interferirajućih RNA i mikroRNA, koje negativno utječu na mRNA ciljanog proteina. Na primjer, takav pristup se koristi za protein kaspazu 3 (glavni regulacijski protein koji potiče apoptozu). On se može ukloniti primjenom *antisense* RNA koja utječe na smanjene ekspresije tog gena. Međutim, tako modificirane stanične linije nisu pokazale značajno povećanje stanične vijabilnosti i produktivnosti u odnosu na roditeljsku staničnu liniju. Za razliku od navedenog pristupa smanjenja ekspresije endogenih gena, prekomjerna ekspresija egzogenog gena za transkripcijski faktor Xbp-1 (engl. *X-box binding protein-1*) rezultirala je poboljšanom produktivnošću u CHO stanicama. Regulatorni proteini koji inhibiraju apoptozu, Bcl-2 i Bcl-xL, također se mogu stabilno i prekomjerno eksprimirati u CHO stanicama (Hacker i Wurm, 2017). Nadalje, moguća je i istovremena primjena obje strategije genetičkog inženjerstva u poboljšanju svojstava proizvodnih staničnih linija, pa je tako na primjer, kombinacijom oba pristupa smanjena nepoželjna proizvodnja mliječne kiseline u CHO stanicama. To se postiglo ciljanjem mRNA koja nosi informaciju za A podjedinicu laktat dehidrogenaze pomoću *antisense* RNA ili siRNA te prekomjernom ekspresijom piruvat karboksilaze, kako bi se povećala konverzija piruvata u oksaloacetat, a smanjila konverzija piruvata u laktat. Ovdje su navedeni samo neki od raznih primjera poboljšanja CHO staničnih linija metodama genetičkog inženjerstva, a svakodnevno se razvijaju nove metode i novi načini povećanja produktivnosti CHO stanica, koje su jedan od trenutno najvažnijih biotehnoloških alata.

2.4. BILJNI HIDROLIZATI U STANIČNIM KULTURAMA

Još je pedesetih godina prošlog stoljeća utvrđeno da je mješavina aminokiselina, vitamina, kofaktora, ugljikohidrata i soli neophodna za *in vitro* stanični rast. Danas je dobro poznato da su za optimalnu kontrolu i regulaciju rasta stanica potrebni i dodatni čimbenici rasta (hormoni, faktori rasta, faktori prihvatanja i razni drugi biokemijski spojevi). Tradicionalno se ti dodatni čimbenici rasta dodaju u obliku životinjskog seruma (npr. fetalnog goveđeg seruma, engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS-a) u koncentraciji od 5 – 20 %. Serumi pružaju mnoštvo važnih faktora rasta, ali su nedefiniranog kemijskog sastava, tj. često im sastav varira od serije do serije, otežavaju izolaciju produkta zbog visokog sadržaja proteina te su izuzetno

skupi. Upotreba seruma za proizvodnju terapeutskih proteina, protutijela i virusnih cjepiva nije poželjna prvenstveno zbog sigurnosnih razloga. Životinjski serum može sadržavati neželjene kontaminante: prione odgovorne za transmisivnu spongiformnu encefalopatiju, razne viruse (nedavno istraživanje pokazalo je da je 20 – 50 % komercijalnih FBS-a pozitivno na viruse) te bakterije (nepoželjni bakterijski endotoksini su pronađeni nakon lize stanica). Navedeni nedostaci su potaknule znanstvenike i biotehnologe da prilagode rast proizvodnih staničnih linija na uzgoj u mediju bez seruma, što nije lako i često rezultira sporijom brzinom rasta stanica, nižom vijabilnošću i produktivnošću. Stoga se istražuju sigurnije i bolje alternative kao zamjena za serum životinjskog podrijetla. Idealan zamjenski medij za staničnu kulturu omogućio bi životinjskim stanicama rast istom brzinom kao i uz primjenu seruma bez ikakvog gubitka u produktivnosti. Mediji bez seruma razvijaju se od kasnih 1970-ih. Prvi korak prema korištenju medija bez seruma (engl. *serum-free media*, SFM) bio je upotreba proteinskih hidrolizata životinjskog podrijetla, proizvedenih s enzimima životinjskog podrijetla i/ili pročišćenim proteinima iz životinjskih ili ljudskih izvora. Jedno od mogućih rješenja je uporaba kemijski definiranih medija za rast (engl. *chemically defined growth media*, CDM) koji pokušavaju optimizirati biokemijski sastav medija tako da nema potrebe za dodavanjem drugih komponenata. Iako su CDM imali uspješne primjene, vrijeme razvoja i optimizacije takvih medija je jako dugo, sam postupak je zahtjevan i skup, a produktivnost procesa s CDM najčešće je smanjena zbog gubitka stanične vijabilnosti i smanjenog prinosa proizvodnje. Unatoč napretku u razvoju SFM i CDM, čini se da je za industrijski važne proizvodne životinjske stanične linije nužan dodatak proteinskih i/ili peptidnih komponenti kako bi se postigla zadovoljavajuća i željena produktivnost.

U potrazi za idealnom zamjenom za serum koja bi u najvećoj mjeri osigurala blagodatni serum životinjskog podrijetla, bez pratećih rizika biološke sigurnosti, raste interes za upotrebu biljnih hidrolizata poput onih dobivenih iz soje, pšenice i pamuka (Babcock i sur., 2007). Istražuju se razni biljni hidrolizati kao dodatak medijima za uzgoj stanica, ne samo kao potpune nego i djelomične zamijene za životinjski serum, čime bi se barem djelomično smanjila uporaba seruma. Posljednjih godina izrazito su zanimljivi biljni hidrolizati koji se proizvode iz industrijskih ostataka (npr. uljnih pogača), jer imaju potencijal pretvoriti nusprodukte u vrijedan proizvod i tako pridonijeti održivosti cjelokupnog procesa. Razni eksperimentalni rezultati pokazuju da su biljni proteinski hidrolizati prikladna alternativa za uzgoj većine staničnih linija (npr. hibridoma, BHK, CHO, Vero, MDCK). Prvi bioterapeutici proizvedeni dodatkom hidrolizata biljnih proteina već su prisutni na tržištu, a mnogi drugi su

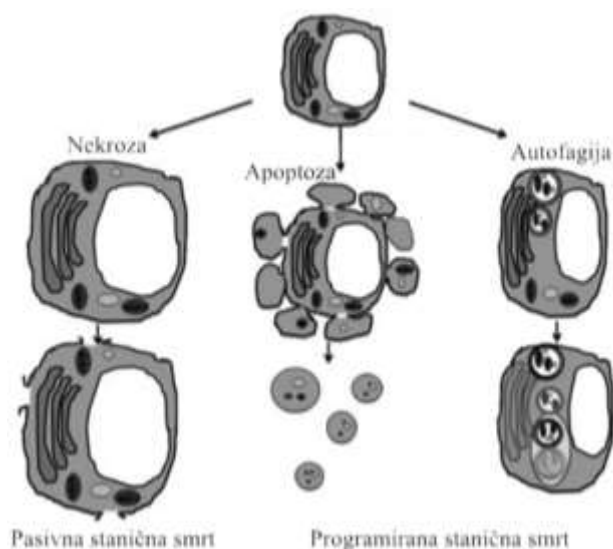
u različitim fazama razvoja (Babcock i sur., 2007). Unatoč tome, biljni hidrolizati imaju svoje nedostatke, slično samom životinjskom serumu, nedefiniranost i varijabilnost sastojaka od šarže do šarže. Iako većina smatra da takva varijabilnost proizlazi iz ključnih koraka obrade tijekom hidrolize i pročišćavanja, sama početna sirovina također može pridonijeti navedenim razlikama u sastavu.

Biljni hidrolizati se najčešće proučavaju i proizvode iz: soje, pšenice, pamuka, riže, uljane repice i slanutka. Eksperimentalni podaci su raznoliki, ovisno o načinu pripreme biljnih hidrolizata i tipu stanične kulture na kojoj se pripremljeni hidrolizati ispituju. Komercijalni pripravci hidrolizata soje na CHO-K1 staničnoj liniji su pokazali četiri značajna pozitivna efekta: povećanje gustoće stanica, produljenje vijabilnosti, povećanje proizvodnje ciljanih proteina u usporedbi s kontrolom te veću dosljednost među serijama (Babcock i sur., 2007). Istraživanje, koje su proveli Girón-Calle i sur. 2008. godine na humanim staničnim linijama THP-1 i Caco-2, je otkrilo da je hidrolizat slanutka bio dobra zamjena za serum kod suspenzijskih THP-1 stanica, ali nije dopuštao rast adherentnim Caco-2 stanicama. To dokazuje da učinci biljnih hidrolizata ovise o stanicama na kojima se primjenjuju, pa su stoga uvijek potrebni preliminarni testovi na željenoj staničnoj liniji. Utjecaj hidrolizata ovisi i o proteazama korištenim za hidrolizu, što se vidi iz istraživanja Logarušić i sur. (2021) gdje je prikazano kako tri različite proteaze daju tri lanena hidrolizata različitih sastava. Primjenom tih lanenih hidrolizata na CHO stanice poboljšao je rast samih stanica što je posljedično rezultiralo i porastom titra IgG (Logarušić i sur., 2021).

2.5. STANIČNA SMRT

Stanična smrt predstavlja veliki problem pri uzgoju proizvodnih staničnih linija koje se koriste u biotehnološkoj i biofarmaceutskoj industriji. Okolišni stres, koji može biti posljedica potrošnje hranjivih sastojaka, nakupljanja nusproizvoda metabolizma ili promjene okolišnih uvjeta (pH, temperature, koncentracije kisika, osmotskog tlaka itd.), aktivira stanične signalne koji potiču staničnu smrt. Najčešće su prvi znakovi staničnog stresa produljenje staničnog ciklusa, aktivacija transkripcijskih faktora za NF- κ B i Bcl-2 porodice proteina te pokretanje receptora smrti koji igraju važnu ulogu u prijenosu signala za apoptozu, koja je prema Odboru za nomenklaturu stanične smrti jedan od tipova tipične stanične smrti (Galuzzi i sur., 2018). Tijekom značajnog i dugotrajnog stresa, stanice su „vođene“ do smrti jednim od dva, najviše

izučavana, tipa stanične smrti (slika 4): pasivne ili slučajne stanične smrti (nekroze) ili programirane ili kontrolirane stanične smrti (apoptoze i autofagije). Navedeni mehanizmi stanične smrti su najviše izučeni i za biotehnološki proces najznačajniji i najzanimljiviji s aspekta preživljavanja i produktivnosti korištenih staničnih linija. Do nekroze dolazi kada su stanice podvrgnute trenutnom i izrazito štetnom okolišnom stresu. To je nekontrolirana stanična smrt koja rezultira pucanjem stanice i izlivanjem citoplazmatskog sadržaja izvan stanice, tj. u njen okoliš, što dovodi do upale i oštećenja okolnog tkiva (Ivanić, 2020). Morfološke značajke nekroznih stanica su: bubrenje, hidroliza kromatina, pucanje plazmatske membrane, potrošnja svog ATP-a, hidroliza DNA, vakuolizacija endoplazmatskog retikuluma, razgradnja organela te liza cijele stanice. Apoptoza, kao vrsta stanične smrti je definirana i imenovana 1972. godine. Ovaj oblik stanične smrti se detaljno istražuje i povezuje s istraživanjima tumora i raznih drugih bolesti, ali i s preživljavanjem staničnih kultura u biotehnološkim proizvodnim procesima. Za razliku od nekroze, to je strogo kontroliran proces koji rezultira smrću stanice uz nikakvu ili minimalnu štetu za okolno tkivo (Ivanić, 2020). Rane morfološke karakteristike apoptoze uključuju: „skupljanje“ stanice i gubitak površinskih mikroresica, kondenzacija kromatina, depolarizacija mitohondrija i pojava mjehurića u membrani. Među biokemijskim promjenama su povećane citosolne koncentracije Ca^{2+} iona, zakiseljavanje stanica i fragmentacija DNA (nastaju fragmenti od 180 - 200 parova baza). Energetski zahtjevan proces apoptoze može biti potaknut izvan- ili unutarstaničnim podražajima koji aktiviraju razne stanične signalne kaskade. Još jedan od ranih znakova apoptoze je porast ekspresije pro-apoptotskih proteina. Treće spomenuti tip stanične smrti, autofagija, istražuje se već više od 40 godina, ali taj je proces u posljednje vrijeme dobio veću pozornost zbog novostečenih znanja u područjima genomike, proteomike i metabolomike. Autofagija načelno potiče preživljavanje, jer je to katabolički proces (proces razgradnje staničnih sastojaka), ali kod dugotrajnih nepovoljnih podražaja i stresa nastalim npr. zbog nedostatka hranjivih tvari rezultirat će staničnom smrću. Karakteristična značajka autofagije je pojava dvostrukog ili višemembranskog citosolnog vezikula koji okružuje mitohondrije, endoplazmatski retikulum i ribosome. Taj vezikul zatim organele isporučuje lizosomima koji ih degradiraju. Razgrađeni stanični organeli se recikliraju, tj. ponovno koriste za makromolekularnu sintezu i stvaranje ATP-a te zbog toga autofagija u uvjetima blažeg, kratkotrajnog stresa potiče preživljavanje.



Slika 4. Prikaz morfoloških promjena u stanicama koje su zahvaćene nekrozom, apoptozom ili autofagijom (prilagođeno prema Krampe i Al-Rubeai, 2010)

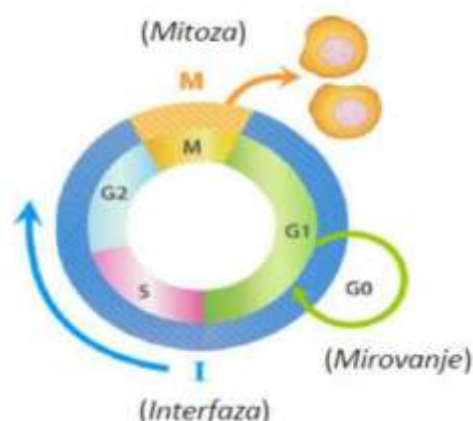
Pri kraju šaržnog uzgoja staničnih kultura, stanice često odumiru procesom apoptoze zbog manjka hranjivih sastojaka: glukoze, glutamina i faktora rasta ili zbog prisutnosti toksičnih metabolita poput amonijaka i laktata. U šaržnim procesima s pritokom, perfuzijskim i kemostatskim kulturama situacija je složenija, jer se hranjivi sastojci stalno nadopunjuju, a toksični metaboliti uklanjaju. Stanice i u takvim sustavima mogu aktivirati proces apoptoze, ako su hranjive tvari u izrazito niskoj koncentraciji ili kao odgovor na razne druge stresne čimbenike kao što su: visoka osmolalnost, promjene pH medija, prejake sile smicanja, manjak nutrijenata zbog nedovoljnog miješanja te nastajanje reaktivnih kisikovih vrsta. Stoga pri uzgoju stanica u kulturi povećanje razine apoptoze može dovesti do smanjenja rasta i vijabilnosti stanica te posljedično smanjenja produktivnosti i kvalitete proizvoda. Iako se apoptoza smatra najprisutnijim tipom stanične smrti prilikom uzgoja staničnih linija u proizvodne svrhe te čini preko 80 % smrti CHO stanica (Ivanić, 2020), u novije vrijeme istraživanja ukazuju na to da programirana stanična smrt autofagijom također igra značajnu ulogu u staničnim kulturama. Otkriveno je da su CHO stanice u šaržnoj kulturi pokazivale obilježja i apoptoze i autofagije zbog iscrpljivanja hranjivih tvari, no autofagija se može inhibirati ili umanjiti, ako se proces vodi šaržno s pritokom (Krampe i Al-Rubeai, 2010).

S obzirom da su to sve nepoželjne pojave za vrijeme uzgoja staničnih kultura, ulažu se veliki naponi u razvijanju metoda za njihovo sprječavanje. U početku se krenulo s prihranjivanjem hranjivim sastojcima tijekom uzgoja i to je bio relativno učinkovit pristup za

prevladavanje stanične smrti. Zatim se krenulo s primjenom genetskog inženjerstva u proizvodnim staničnim linijama kako bi se regulirali geni koji kodiraju za antiapoptotske proteine. Taj pristup se također pokazao uspješnim u odgađanju početka stanične smrti, a glavni fokus istraživanja u tom smjeru je bio na genima bcl-2 i bcl-xL, koji kodiraju za proteine inhibitore apoptoze. U stanicama koje prekomjerno ekspimiraju gen bcl-2, zapažen je značajan porast u vijabilnosti, ali nažalost samo blago ili nikakvo povećanje produktivnosti. Također, zapažen je značajni porast sinteze makromolekula i proizvodnje ATP-a te produljenje staničnog ciklusa (Ivanić, 2020). Daljnji razvoj i proučavanje stanične smrti sigurno će pomoći u otkrivanju novih ciljanih gena za primjenu genetičkog inženjerstva te tako poboljšati produktivnost biotehnoloških procesa u kojima se kao stanice domaćini koriste životinjske stanične linije.

2.6. STANIČNI CIKLUS

Stanični ciklus ili ciklus stanične diobe je skup pažljivo orkestriranih koraka pomoću kojih se stanice dijele, odnosno proizvode kopije same sebe. To je visoko regulirani unutarstanični proces koji se sastoji od niza vremenski odvojenih događaja koji rezultiraju udvostručenjem kromosoma i drugih staničnih dijelova koji se ravnomjerno raspoređuju u dvije stanice kćeri. Tri su faze staničnog ciklusa koje sve eukariotske stanice moraju proći kako bi provele staničnu diobu do kraja: interfaza, duplikacija staničnog sadržaja; mitoza, odvajanje dupliciranih elemenata; i citokineza, fizičko dijeljenje stanice (slika 5).



Slika 5. Prikaz faza staničnog ciklusa (Ivanić, 2020)

Interfaza vremenski zauzima većinu staničnog ciklusa. U većini stanica mitozu traje manje od 10 % vremena, a citokineza još kraće. Najviše istraživani dio staničnog ciklusa je replikacija DNA koja se odvija tijekom ograničenog dijela interfaze koji se naziva S (sintetička) faza. Razdoblja prije (G1) i nakon (G2) S faze su zvane faze "praznine" (engl. *gap*) jer u prvim istraživanjima nisu zamijećene nikakve promjene koje se događaju tijekom tih razdoblja staničnog ciklusa. Danas je poznato da se mnogo toga događa za vrijeme G1 i G2 faze te da one koordiniraju uspješnu diobu preko kontrolnih točaka. Prva kontrolna točka se nalazi na kraju G1 faze, prije ulaza u S fazu. Ovdje stanica objedinjuje mitogene signale i inhibitore rasta te prema tome odlučuje hoće li nastaviti sa staničnim ciklusom ili ga završiti. Ako se stanica nalazi u nepovoljnim uvjetima za diobu, ulazi u fazu smanjenje metaboličke aktivnosti, tj. G0 fazu u kojoj ostaje sve dok se ne pojave povoljni uvjeti za staničnu diobu (Ivanić, 2020). Za vrijeme S faze dolazi do duplikacije svih kromosoma. Mnoge polimeraze kopiraju svaki kromosom i strogo su regulirane kako ne bi kopirale onaj segment DNA koji je već kopiran. Uz kromosome, većina stanica sadrži i jedan centrosom, centar za organizaciju mikrotubula, koji također mora biti precizno dupliciran samo jednom u staničnom ciklusu. Umnožavanje ostalih komponenata stanice ne mora biti toliko precizno kao što to mora biti za DNA i centrosome, što sugerira da je dupliciranje ostalih komponenata više-manje automatsko, a zahtijeva manje sofisticirane mehanizme koordinacije (Lew, 2013).

Nakon što se sastojci stanice dupliciraju, moraju se razdvojiti u dva nasuprotna dijela stanice koji će postati stanice kćeri nakon diobe. Mitoza se obično dijeli na četiri zasebne faze: profazu, metafazu, anafazu i telofazu. Segregaciju kromosoma provodi mitotsko vreteno koje hvata i poravnava kromosome, a zatim ih odvaja. Centrosomi, duplicirani tijekom interfaze, se odmaknu jedan od drugog malo prije početka mitoze te tako organiziraju mikrotubule u bipolarni niz u kojem se vlakna sa svakog pola šire u unutrašnjost stanice. U životinjskim i biljnim stanicama dolazi do pucanja jezgrine ovojnice što omogućava mikrotubulama pristup kromosomima. Tijekom mitoze, kromosomi se jako kondenziraju, a svaki je sastavljen od sestrinskih kromatida. Svaka kromatida je preko posebne nakupine proteina, kinetohore, povezana mikrotubulima s drugim centrosomom, tj. s drugim polom stanice. Kada svi kromosomi postignu bipolarno vezanje za diobeno vreteno, otapa se kohezija između sestrinskih kromatida, a kromatide se vuku prema suprotnim polovima stanice. Kada se centrosomi i pripadajući skupovi kromosoma odvoje na suprotne polove, dolazi do odvajanja kinetohora i mikrotubula, formiranja jezgrine ovojnice oko kromosoma te dekonenzacije kromosoma. Mitotske pogreške su relativno rijetke jer stanice imaju kontrolne

točke u kojima nadgledaju sve korake diobe. Recimo, stanica ne započinje odvajanje sestrinskih kromatida dok se sve kromatide pravilno ne poravnaju i ne vežu na diobeno vreteno (Lew, 2013).

Citokineza je fizička podjela jedne roditeljske stanice na dvije kćeri, a započinje tijekom ili nakon segregacije kromosoma. Čini se da su mehanizmi citokineze prilično promjenjivi ovisno o tipu stanice. Većina životinjskih stanica ima fleksibilnu plazmatsku membranu koja se dijeli promjenom oblika stanice, stežući prsten aktinskih i miozinskih niti izvana prema središtu te tako stvarajući diobenu brazdu koja dijeli stanicu. Presudno je da ravnina diobe stanica bude okomita na osi mitotskog vretena, tako da jedan cjeloviti skup odvojenih kromosoma završi sa svake strane tijekom diobe. Pokusi, u kojima je diobeno vreteno bilo fizički premješteno, su otkrili da septum slijedi vreteno i dijeli stanicu uvijek na način da presiječe vreteno između odvojenih skupova kromosoma. To znači da je mjesto diobe stanice fleksibilno te da se događa u blizini središta diobenog vretena bez obzira gdje se to vreteno nalazi. Iznimka su stanice kvasca koje se uvijek dijele na vratu između stanice majke i pupoljka - stanice kćeri (Lew, 2013).

Kod jednostaničnih organizama stanična dioba znači tvorbu cijelog novog organizma, a kod višestaničnih organizama, bezbrojne diobe početne stanice (zigote) rezultiraju tvorbom niza različitih vrsta stanica koje tvore tkiva i organe, a u konačnici i cijeli organizam. Također, dioba stanica kod odraslih višestaničnih organizama omogućuje zamjenu oštećenih ili starih stanica. Trajanje staničnog ciklusa varira od organizma do organizma, čak i od tkiva do tkiva. Za životinjske i ljudske stanice ono je u prosjeku 24 h. Zadnjih godina se povećao interes za istraživanjem povezanosti između specifične brzine sinteze rekombinantnog proteina i faze staničnog ciklusa u kojem se stanica nalazi kako bi se pomoću tih saznanja optimizirali procesi proizvodnje. Za sad istraživanja daju raznovrsne rezultate, jer se provode na različitim proizvodnim linijama i pri različitim uvjetima uzgoja, pa su stoga potrebna daljnja istraživanja na tom području (Ivanić, 2020).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Hidrolizati uljnih pogača lana i konoplje

U diplomskom radu su korišteni već pripremljeni proteinski hidrolizati uljnih pogača lana i konoplje te njihove frakcije određenih molekularnih masa (tablica 1). Pripremljeni su u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, a čuvani su na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do upotrebe u pojedinačnim eksperimentima. Detaljan opis pripreme lanenih hidrolizata je opisan u radu Logarušić i sur. iz 2021. godine. Koraci pripreme hidroliziranih proteina konoplje bit će opisani u diplomskom radu u izradi kolegice Anje Damjanović. Hidroliza je provedena pomoću tri komercijalne endopeptidaze: *Alcalase*TM, *Neutrased*TM i *Protamex*TM. Postupak dobivanja frakcija $<1\text{ kDa}$ bit će opisani u diplomskom radu u izradi kolegice Marije Cavrić.

Tablica 1. Prikaz korištenih hidrolizata konoplje (HK) i lana (HL) proizvedenih pomoću enzima *Alcalase*TM (A), *Neutrased*TM (N) i *Protamex*TM (P) u određenim koncentracijama kao dodatak mediju bez seruma tijekom suspenzijskog uzgoja CHO DP-12 stanične linije

Uzorak	Opis uzorka	Kratice uzorka
Uzorak 1	Nefrakcionirani hidrolizat konoplje pripremljen alkalazom u koncentraciji od 2 g L^{-1}	HKA UK* 2 g L^{-1}
Uzorak 2	Nefrakcionirani hidrolizat konoplje pripremljen alkalazom u koncentraciji od $0,5\text{ g L}^{-1}$	HKA UK* $0,5\text{ g L}^{-1}$
Uzorak 3	Frakcija hidrolizata konoplje pripremljenog neutrazom manja od 1 kDa u koncentraciji od 2 g L^{-1}	HKN $< 1\text{ kDa}$ 2 g L^{-1}
Uzorak 4	Frakcija hidrolizata konoplje pripremljenog protamexom manja od 1 kDa u koncentraciji od 2 g L^{-1}	HKP $< 1\text{ kDa}$ 2 g L^{-1}
Uzorak 5	Frakcija hidrolizata lana pripremljenog alkalazom manja od 1 kDa u koncentraciji od $0,5\text{ g L}^{-1}$	HLA $< 1\text{ kDa}$ $0,5\text{ g L}^{-1}$
Uzorak 6	Frakcija hidrolizata lana pripremljenog neutrazom manja od 1 kDa u koncentraciji od 2 g L^{-1}	HLN $< 1\text{ kDa}$ 2 g L^{-1}

Uzorak 7	Nefrakcionirani hidrolizat lana pripravljen protamexom u koncentraciji od 0,5 g L ⁻¹	HLP UK* 0,5 g L ⁻¹
----------	--	-------------------------------

* Oznaka „UK“ označava ukupne hidrolizate, bez razdvajanja na manje frakcije filtriranjem.

3.1.2. Kemikalije

- Destilirana voda, PBF
- Etanol, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- PowerCHO[®]-2 CD, Lonza, Belgija
- Rh-Insulin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Metotreksat (MTX), Cerilliant, SAD
- Antibiotik/Antimikotik otopina (100x), Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka
- Ala-Gln (200 mM Alanin-Glutamin otopina), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Anti-Clumping Agent, Gibco, SAD
- Tripan plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glucoce GOD-PAP, BIOLABO SAS, Maizy, Francuska
- L-Lactic Acid (L-Lactate) Assay Kit, Megazyme, Bray, Irska
- Ammonia Assay Kit, Megazyme, Bray, Irska
- Muse[™] Annexin V & Dead Cell Kit, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka
- Muse[™] Cell Cycle Kit, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka
- Muse[™] System Check Kit, EMD Millipore Do., MA, SAD

3.1.3. Otopine i puferi

- PBS pufer (pH=7,4):

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44 g
Kalijev hidrogenfosfat	0,24 g
Destilirana voda	do 1000 mL

- 0,4 %-tna otopina tripan plavo:

Boja tripan plavo	0,04 g
PBS pufer	10 mL

- Kontrolni test za Muse™ analizator:

System Check reagens	380 µL
Kuglice	20 µL

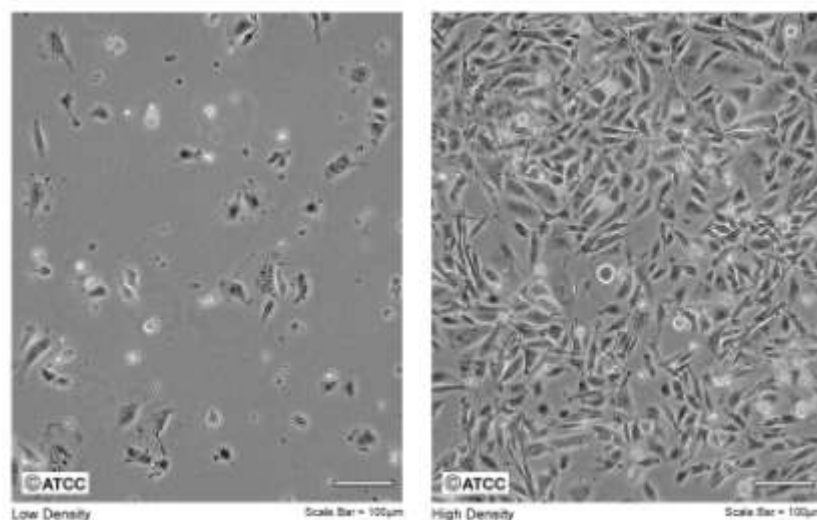
3.1.4. Uređaji i oprema

- Komora za sterilni rad (laminar), Kambič, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija
- Kružna tresilica PSU-10i, Biosan, Riga, Latvija
- Svjetlosni mikroskop Axiostar 1122-100, Carl Zeiss, Njemačka
- Hladnjak (4 °C i -20°C), Gorenje, Slovenija
- Hladnjak (-80 °C), TT 80 FRYKA, Njemačka
- Neubauer komorica za brojanje stanica, Reichart Bright-line, Buffalo, NY, SAD
- Muse™ Cell Analyzer (analizator staničnog zdravlja), EMD Millipore Corporation, Massachusetts, SAD
- Centrifuga, Hettich Zentrifugen ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka
- Spektrofotometar, Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD
- Plastične, sterilne Erlenmeyer tikvice za uzgoj staničnih kultura, Corning, Arizona, SAD
- Vrtložna miješalica, IKA, Njemačka
- Laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, kivete, epruvete, itd.)

3.1.5. Stanična linija CHO DP-12

CHO (engl. *Chinese hamster ovary*) je stanična linija uspostavljena je 1957. godine iz ovarija odrasle ženke kineskog hrčka (slika 6). Za potrebe diplomskoga rada, adherentna linija CHO DP-12 je nabavljena iz radne banke stanica *American Type Culture Collection* (ATCC).

Detaljnije je opisana u poglavlju 2.3. Navedena stanična linija potom je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica prilagođena na suspenzijski rast u mediju bez seruma.



Slika 6. Prikaz CHO DP-12 stanične linije (ATCC, 2021)

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj CHO DP-12 stanica u suspenzijskoj kulturi

Uzgoj stanica započinje njihovim odmrzavanjem jer su čuvane u mediju za zamrzavanje na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u ampulama od 1 mL (koncentracija stanica 1×10^7 stanica mL^{-1}). Ampula sa stanicama se stavlja u vodenu kupelj zagrijanu na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ dok se njen sadržaj ne otopi. Sadržaj ampule se zatim prenosi u sterilnu epruvetu i dodaje se 5 - 10 mL medija za uzgoj. Stanice se odvajaju centrifugiranjem tijekom 5 minuta na 1000 okretaja min^{-1} . Supernatant se potom uklanja, a talog stanica se resuspendira u mediju za uzgoj. 100 mL kompletnog medija za uzgoj sastoji se od: 94,75 mL PowerCHO[®]-2 CD, 4 mL Ala-Gln otopine, 1 mL Antibiotik/Antimikotik otopine, 250 μL Anti-Clumping otopine, 20 μL rh-Insulina i 9 μL MTX-a i kao takav optimiran je za uzgoj bez dodatka seruma.

Odmrznute CHO stanice se nakon tri pasaže naciepljuju u sterilne Erlenmeyerove tikvice u početnoj koncentraciji od $2,5 \times 10^5$ stanica mL^{-1} . Naciepljene stanice su uzgajane u kompletnom PowerCHO mediju s dodatkom proteinskih hidrolizata lana ili konoplje u različitim koncentracijama (tablica 1). Ukupni volumen medija u svakoj od osam tikvica u kojima je proveden uzgoj iznosio je 22 mL, a kontrolni uzorak (Kontrola) je bio bez dodatka

hidrolizata, odnosno stanice su naciepljene samo u potpunom PowerCHO mediju. Nakon naciepljivanja, tikvice su stavljene na kružnu tresilicu (160 RPM) u inkubator te je svaki dan kontrolirana koncentracija stanica, vijabilnost te moguća pojava kontaminacija. Cilj ovog istraživanja je pronaći biljne proteinske hidrolizate koji dobro oponašaju djelovanje seruma, pa se životinjski serum ne koristi. Stanice se prilagođavaju na rast bez seruma pomoću PowerCHO medija koji ga ne sadrži. Stanice se za vrijeme uzgoja drže u inkubatoru u kojem su uvjeti: atmosferski tlak, atmosferski zrak (atmosfera: 95 % zraka i 5 % CO₂) i temperatura 37 °C.

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

CHO DP-12 stanice su uzgajane i rastu u suspenziji u 8 tikvica na tresilici u inkubatoru kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.1. Dinamika rasta praćena je svakodnevno kroz 11 dana pomoću metode bojanja stanica otopinom tripan-plavo. Plavo se oboje samo mrtve stanice, jer im je membrana propusna za boju, pa se pomoću svjetlosnog mikroskopa u Neubaureovoj komorici (slika 7) prebroje i žive i mrtve stanice u uzorku. Uzorak je uziman iz svake tikvice pojedinačno u laminaru kako ne bi došlo do kontaminacije CHO stanične linije te se uzeti alikvot stavlja u Eppendorf epruvetu. Zatim se iz epruvete izuzima 10 µL uzorka, pomiješa s 10 µL otopine tripan-plavo boje, prenese u Neubaureovu komoricu i prebroji. Prebroje se sve stanice u 4 velika kvadrata Neubaureove komorice te se koncentracija stanica u uzorku izračuna prema formuli [1]:

$$\text{broj stanica / mL uzorka} = \text{zbroj stanica izbrojenih u 4 kvadratića} \times 5 \times 10^3 \quad [1]$$



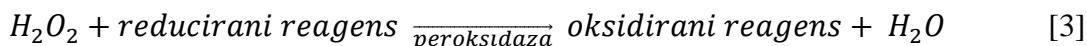
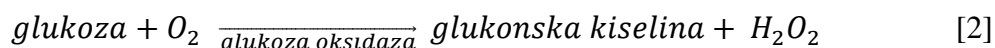
Slika 7. Prikaz Neubaureove komorice (lijevo) i kvadrata za brojanje stanica (desno)
(Anonymous 2, 2021)

3.2.3. Mjerenje koncentracije metabolita za vrijeme uzgoja CHO DP-12 stanica

U određene dane uzgoja uzeti su uzorci medija iz svake tikvice kako bi se izmjerile koncentracije prisutnih metabolita. Uzorci su uzeti sterilno, unutar laminara i stavljeni u Eppendorf epruvete te se potom centrifugiraju 5 min pri 3000 rpm radi uklanjanja stanica. Nakon centrifugiranja, medij se odvoji u nove Eppendorf epruvete koje su spremljene u zamrzivač na -20 °C. Prije mjerenja metabolita (glukoze, laktata i amonijka), uzorci su izvađeni iz zamrzivača i ostavljeni 10 min na sobnoj temperaturi da se otope.

3.2.3.1. Glukoza

Koncentracija glukoze se određuje pomoću Glucose-GOD-PAP testa koji se zasniva na Trinderovoj metodi. To je dijagnostički test koji se koristi u medicini za utvrđivanje prisutnosti glukoze ili enzima glukoza oksidaze. U ovome testu dolazi do kolorimetrijske reakcije (takozvana Trinderova reakcija) u kojoj se koristi Trinderov reagens. Trinderov reagens sadrži 4-amino-antipirin (PAP) i fenol (p-hidroksibenzen). Trinderova reakcija je reakcija između vodikovog peroksida, fenola i PAP-a u kojoj nastaje kinon, spoj crveno-ljubičaste boje. Reakcija je katalizirana od strane enzima peroksidaze [3]. Vodikov peroksid se proizvodi u prvoj reakciji u kojoj se glukoza oksidira pomoću glukoza oksidaze (GOD) u H_2O_2 i glukonsku kiselinu [2]. Intenzitet nastale boje (nastalog kinona) je proporcionalan koncentraciji glukoze (Anonymous 3, 2021).

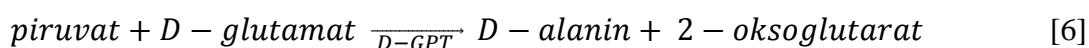
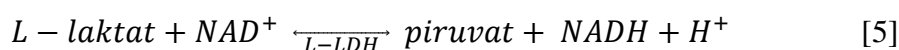


Mjerenja se provode tako da se pomiješa 500 μ L Glucose-GOD-PAP reagensa i 5 μ L uzorka ili standardne otopine glukoze, pričekava 10 min na 37 °C (uzorci se stave u inkubator), pa mjeri apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 500 nm. Za svaki uzorak se provode dva paralelna mjerenja, uz dvije slijepe probe u koje se umjesto 5 μ L uzorka dodaje 5 μ L destilirane vode. Standardna otopina glukoze ima poznatu koncentraciju od 5,55 mmol L⁻¹. Koncentracija glukoze se izračuna prema formuli [4]:

$$\text{Konc. glukoze u uzorku} = \frac{A_{\text{uzorka}}}{A_{\text{glu. standarda}}} * \text{konc. standarda} \quad [4]$$

3.2.3.2. Laktat

Koncentracija laktata se određuje pomoću Megazyme L-Lactic Acid (L-Lactate) Assay Kit-a. Ovaj kit za ispitivanje L-mliječne kiseline i L-laktata se koristi za specifična mjerenja i analize u napitcima, mesu, mliječnim i prehrambenim proizvodima te u znanstvene svrhe. Radi na principu dvije enzimске reakcije: oksidacije L-mliječne kiseline/L-laktata u piruvat [5] i konverzije piruvata u D-alanin i 2-oksoglutarat [6].



Oksidaciju L-laktata u piruvat katalizira enzim L-laktat dehidrogenaza (L-LDH). To je povratna reakcija čija ravnoteža prevladava na stranu L-laktata i NAD^+ , pa je potrebna sljedeća reakcija [6] konverzije piruvata, kako bi ravnoteža reakcije [5] bila na strani nastajanja NADH koji se spektrofotometrijski mjeri. Intenzitet apsorbancije nastalog NADH je proporcionalan koncentraciji L-laktata. Konverziju piruvata u D-alanin i 2-oksoglutarat katalizira enzim D-glutamat-piruvat transaminaza (D-GPT) uz veliki suvišak D-glutamata, pa je ravnoteža reakcije na strani nastajanja D-alanina i 2-oksoglutarata što osigurava da se sav piruvat konvertira.

Mjerenje se provodi pomoću Megazyme mjernog kita koji sadrži 4 potrebne otopine:

- Otopina 1 (pufer + D-glutamat)
- Otopina 2 (NAD^+)
- Otopina 3 (D-GPT)
- Otopina 4 (L-LDH)

Otopine se dodaju po redu 1-4 prema uputama proizvođača (tablica 2). Apsorbancija se mjeri na valnoj duljini od 340 nm. Nakon mjerenja apsorbancije, koncentracija L-laktata se izračuna prema formuli [7].

Tablica 2. Protokol za provedbu mjerenja koncentracije L-laktata u uzorcima i slijepoj probi

Otopine	Slijepa proba	Uzorak
Destilirana voda	400 μL	375 μL
Uzorak	/	25 μL
Otopina 1	125 μL	125 μL
Otopina 2	25 μL	25 μL
Otopina 3	5 μL	5 μL
Promiješati, pričekati oko 3 min, pa očitati apsorbanciju (A_1), zatim se dodaje:		
Otopina 4	5 μL	5 μL
Promiješati, pričekati oko 10 min, pa očitati apsorbanciju (A_2).		

$$c = \frac{V \cdot M_r}{\varepsilon \cdot d \cdot v} * \Delta A_{L-laktat} \quad [7]$$

V – konačan volumen (mL)

M_r – molarna masa L-laktata (g mol^{-1})

ε - koeficijent ekstinkcije NADH na 340 nm = 6300 ($\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

d – put svjetla (1 cm)

v – volumen uzorka (mL)

$\Delta A = A_2 - A_1$

3.2.3.3. Amonijak

Koncentracija amonijaka nastalog u mediju za vrijeme uzgoja mjeri se pomoću Megazyme Ammonia Assay Kit-a. Ovaj kit se koristi za brzo mjerenje i analizu amonijaka u svim uzorcima poput sokova, vina, raznih pića, hrane i u znanstvene svrhe. Funkcionira tako da se uzorcima dodaje enzim glutamat dehidrogenaza (GIDH) koji, uz prisutnost NADPH i 2-oksoglutarata, prevodi amonijak do L-glutamata i NADP^+ [8]. Na spektrofotometru se u uzorcima mjeri apsorbancija NADPH, tj. smanjenje apsorbancije nakon reakcije u kojoj se NADPH oksidira u NADP^+ . Smanjenje intenziteta apsorbancije je proporcionalno koncentraciji amonijaka.



Mjerenje se provodi pomoću Megazyme mjernog kita koji sadrži 3 potrebne otopine:

- Otopina 2 (pufer)
- Otopina 3 (NADPH)
- Otopina 5 (GIDH)

Otopine se dodaju po redu 2-5 prema uputama proizvođača (tablica 3). Apsorbancija se mjeri na valnoj duljini od 340 nm te se nakon mjerenja apsorbancije, koncentracija amonijaka izračuna prema formuli [9].

Tablica 3. Protokol za provedbu mjerenja koncentracije amonijaka u uzorcima i slijepoj probi

Otopine	Slijepa proba	Uzorak
Destilirana voda	455 µL	430 µL
Uzorak	/	25 µL
Otopina 2	75 µL	75 µL
Otopina 3	50 µL	50 µL
Promiješati, pričekati oko 4 min, pa očitati apsorbanciju (A_1), zatim se dodaje:		
Otopina 5	5 µL	5 µL
Promiješati, pričekati oko 5 min, pa očitati apsorbanciju (A_2).		

$$c = \frac{V * Mr}{\epsilon * d * v} * \Delta A_{amonijak} \quad [9]$$

V – konačan volumen (mL)

Mr – molarna masa amonijaka (g mol^{-1})

ϵ - koeficijent ekstinkcije NADH na 340 nm = $6300 (\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1})$

d – put svjetla (1 cm)

v – volumen uzorka (mL)

$\Delta A = A_1 - A_2$

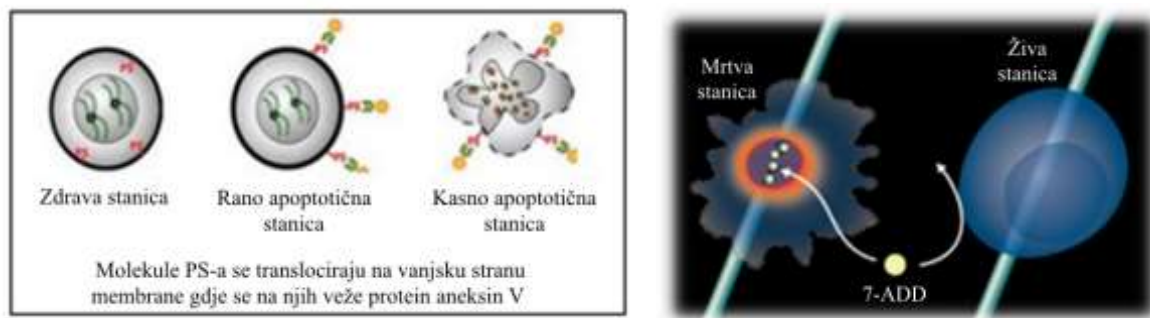
3.2.4. Protočna citometrija

Protočni citometri su sofisticirani instrumenti sposobni za mjerenje više fizičkih karakteristika stanica istodobno dok prolaze u suspenziji kroz mjerni uređaj jedna po jedna. Omogućavaju analizu velikog broja stanica u vrlo kratkom vremenu (do tisuću stanica u sekundi) stoga je to vrlo dobra i relativno brza analiza. Protočna citometrija se koristi pretežito u biološkim znanstvenim poljima, kao i u kliničkoj dijagnozi za karakterizaciju i analizu stanica. Analiza pojedinačnih stanica od velike je važnosti za provođenje bioloških ispitivanja heterogenih staničnih populacija poput ljudske krvi. Citometri se ne koriste samo za istraživanje cijelih stanica, već i staničnih komponentata: organela, jezgre, DNA, RNA, kromosoma, citokina, hormona i proteina. Kao rezultat toga, oni igraju presudnu ulogu u mnogim biološkim i medicinskim primjenama. Tradicionalni citometri rade na principu raspršivanja i/ili intenziteta fluorescencije. Oni su često glomazni i mehanički složeni te je za njihovo rukovanje potrebno biti kvalificirani stručnjak. U zadnjim desetljećima, s brzim napretkom tehnologije, pojavili su se mikrofluidni čipovi, tj. „Lab-on-a-Chip“ uređaji kao moćna tehnika za brzu *in situ* detekciju malih količina uzoraka. Mikrofluidni citometri imaju znatno smanjenu zapreminu uzorka i zbog toga je daleko niži trošak takve analize. Tipični volumen uzorka je u rasponu od 10^{-9} do 10^{-18} L, pa se znatno smanjuje količina skupih reagensa potrebnih za analizu. U tradicionalnim protočnim citometrima, stanice se suspendiraju u otopini i ubrizgavaju u fluidni sustav. Ondje su hidrodinamički fokusirane u središte fluidnog kanala gdje putuju ujednačenom brzinom. U zoni ispitivanja, stanice se pojedinačno analiziraju fokusiranim laserskim snopom zraka koji prolazi okomito na fluidni kanal. Za svaku stanicu citometrijski sustav prikuplja informacije o intenzitetu raspršenja, tj. reflektiranoj prednjoj i bočnoj svjetlosti. Prednja reflektirana svjetlost daje podatke za karakterizaciju veličina čestica i indeks loma, dok se podaci o bočnoj reflektiranoj svjetlosti koriste za ispitivanje unutarnjih struktura stanice (Yang, 2018).

Također, pomoću citometara se može proučavati mehanizam djelovanja tvari na različite stanične procese: stanični ciklus, staničnu smrt, aktivaciju/inhibiciju gena i proteina. Muse™ analizator staničnog zdravlja radi na principu „mini“ protočnog citometra i omogućuje praćenje broja stanica, stanične vijabilnosti, proliferacije, diobe, apoptoze i oksidativnog stresa. Brzo i jednostavno mjerenje uređaja temelji se na analizi 3 parametra uz primjenu optimiranih kitova te omogućuje kvantifikaciju podataka na razini pojedinačne stanice (Kolak, 2019).

3.2.4.1. Određivanje tipa stanične smrti primjenom Muse™ analizatora

Apoptoza, ili programirana stanična smrt, važan je stanični proces objašnjen u poglavlju 2.5. U početnoj fazi apoptoze dolazi do translokacije fosfolipida fosfatidil serina (PS) s unutrašnje na vanjsku stranu stanične membrane (slika 8). Eksternalizacija PS-a nije prisutna u svim stanicama tijekom apoptoze (samo oko 30 %) jer se javlja relativno rano nakon segmentiranja stanične jezgre. Protein aneksin V, koji je označen s fluorescentnim bojama, specifično se veže na PS na vanjskoj membrani apoptotičnih stanica te se kao takav koristi za detekciju apoptoze pomoću protočne citometrije, najčešće uz primjenu još jedne boje kao što je 7-aminoaktinomicin D (7-AAD) koji ulazi u oštećene stanice i veže se na DNA. Mogućnost ulaska 7-AAD-a u stanicu označava da je ta stanica u kasnoj apoptozi, tj. da je mrtva ili nekrozna. Njime neće biti obilježene žive i zdrave stanice te one koje se nalaze u ranoj apoptozi jer se iz živih stanica uglavnom izlučuje (slika 8).



Slika 8. Prikaz translokacije fosfatidil serina (PS) na vanjsku stranu membrane (lijevo) i ulaska 7-aminoaktinomicina (7-AAD) u mrtve stanice (desno) (prilagođeno prema Millipore, 2013)

Muse™ Annexin V & Dead Cell reagens sadrži fluorescentno obilježeni protein aneksin V i 7-AAD na temelju kojih je primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kita moguće razlikovati četiri populacije stanica unutar analiziranog uzorka:

- žive i zdrave stanice: aneksin V (-) i 7-AAD (-)
- rano apoptotične stanice: aneksin V (+) i 7-AAD (-)
- kasno apoptotične stanice i mrtve stanice: aneksin V (+) i 7-AAD (+)
- mrtve stanice i stanični ostaci: aneksin V (-) i 7-AAD (+)

Određivanje tipa stanične smrti provedeno je prema protokolu proizvođača. U određene dane uzgoja, iz svake tikvice sterilno je uzet uzorak za analizu. Svaki uzorak se centrifugirao 5 min na 1500 rpm. Uklonio bi se medij, a s istaloženim živim stanicama nastavio postupak pripreme uzorka za analizu na Muse™ analizatoru. Stanice se prvo resuspendiraju u odgovarajućem volumenu PBS-a s minimalno 1% FBS-a kako bi konačna koncentracija stanica u uzorku bila $1-5 \times 10^5$ stanica mL^{-1} . U 100 μL suspenzije stanica doda se 100 μL Muse™ Annexin V & Dead Cell reagensa te se inkubira 20 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Muse™ analizator prije rada treba isprati, a zatim kalibrirati sustav pomoću System Check Kit-a. Prije mjerenja na analizatoru, svaki uzorak je potrebno resuspendirati da nastane suspenzija neagregiranih pojedinačnih stanica. Nakon toga slijedi postavljanje parametara analize i analiza pojedinačnih uzoraka. Za svaki uzorak su izmjerene po dvije paralele (Jakopec, 2017).

3.2.4.2. *Određivanje zastoja u staničnom ciklusu primjenom Muse™ analizatora*

Stanice mogu doživjeti zastoj u različitim fazama staničnog ciklusa koji je pojašnjen u poglavlju 2.6. Podatak o zastoju stanica u određenoj fazi staničnog ciklusa može biti veoma koristan kod proučavanja djelovanja proteinskih hidrolizata na CHO DP-12 stanice. Muse™ Cell Cycle Kit omogućuje kvantitativno mjerenje postotka stanica u G0/G1, S i G2/M fazama staničnog ciklusa. Princip određivanja zastoja u staničnom ciklusu bazira se na mjerenju količine DNA u stanici. Za vizualizaciju stanica pri analizi se koristi boja propidij jodid koja interkalira u DNA i fluorescira nakon pobuđivanja laserom. Stanice u G0/G1 fazi sadrže dvije kopije svakog kromosoma. Za vrijeme S faze dolazi do sinteze kromosomske DNA, pa se intenzitet fluorescencije propidij jodida povećava. Kraj povećanja fluorescencije označava G2/M fazu u kojoj je kromosomska DNA udvostručena. U ovoj fazi, G2/M stanice fluoresciraju s dvostrukim intenzitetom od fluorescencije G0/G1 populacije (Jakopec, 2017). Prije same analize na Muse™ analizatoru, stanice je potrebno fiksirati etanolom ili nekim drugim sredstvom koje djeluje na propusnost stanične membrane kako bi propidij jodid lakše ušao u stanicu. Intenzitet fluorescencije je proporcionalan količini DNA u stanici što omogućuje klasificiranje stanica u G0/G1, S i G2/M fazi.

Priprema stanica za analizu provedena je prema protokolu proizvođača. U određene dane uzgoja je iz svake tikvice sterilno uzet uzorak. Svaki uzorak je centrifugiran 5 min na

1500 rpm. Uklonjen je medij, a s istaloženim živim stanicama nastavljen je postupak pripreme uzorka za analizu na Muse™ analizatoru. Na talog je dodano 500 µL PBS-a te je, nakon ponovnog centrifugiranja i odvajanja supernatanta, na dnu ostavljeno otprilike 50 µL PBS-a u kojem su stanice resuspendirane. U novu Eppendorf epruvetu je stavljeno 1 mL ledeno hladnog (-20 °C) 70%-tnog EtOH u koji je dodavano kap po kap suspenzije stanica uz vorteksiranje nakon čega je epruveta zatvorena i ostavljena na fiksiranje u zamrzivaču na -20 °C, najmanje 2 sata ili preko noći. Nakon fiksacije stanica, one se odmrzavaju 10 min na sobnoj temperaturi i dalje pripremaju bojanjem za analizu na Muse™ analizatoru. 200 µL stanica fiksiranih u EtOH (koncentracije 5×10^5 - 1×10^6 stanica mL⁻¹) prebačeno je u epruvetu i centrifugirano 5 min na 3000 rpm, a nakon što je odvojen supernatant, stanice su resuspendirane u 0,25 mL PBS-a. Zatim slijedi ponovno centrifugiranje i uklanjanje supernatanta, a talog stanica se resuspendira s 200 µL reagensa. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani 30 min u mraku na sobnoj temperaturi (Kolpak, 2019). Muse™ analizator prije rada treba isprati, a zatim kalibrirati sustav pomoću System Check Kit-a. Prije mjerenja na analizatoru, svaki uzorak je potrebno resuspendirati da nastane suspenzija neagregiranih pojedinačnih stanica. Nakon toga slijedi postavljanje parametara analize i analiza pojedinačnih uzoraka. Za svaki uzorak su izmjerene po dvije paralele (Jakopec, 2017).

3.2.5. Statistička obrada rezultata

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

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [10]$$

s pripadajućim standardnim devijacijama S.D.:

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad [11]$$

gdje je n ukupan broj uzoraka u skupini, a x_i pojedinačna vrijednost uzorka.

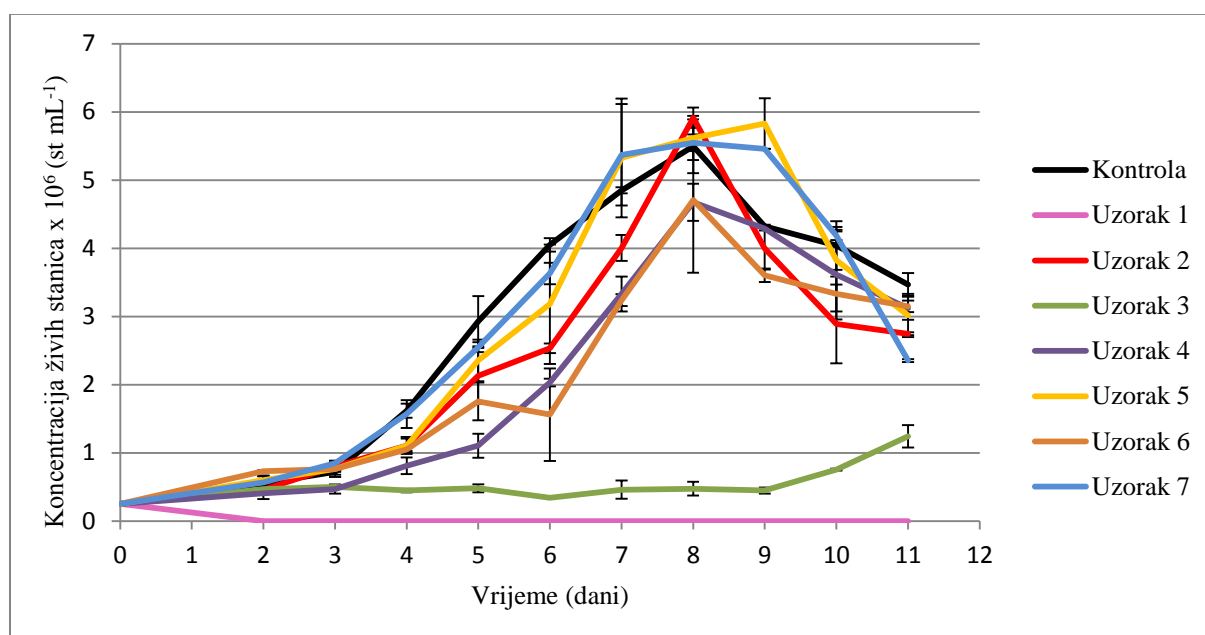
4. REZULTATI I RASPRAVA

Velik broj farmaceutika i novijih lijekova proizvode se pomoću kultura životinjskih stanica (Walsh, 2010). Zahtjevi za proizvodnjom navedenih lijekova su sve veći, a cijena im je relativno visoka, pa se mnogo napora ulaže u istraživanje i razvoj načina smanjenja njihove cijene i/ili povećanja prinosa tih proizvoda. Jedan od pristupa je poboljšanje sastava medija koji se koristi za uzgoj proizvodnih staničnih linija. Životinjski serum, kao najskuplja i najmanje sigurna komponenta koja se dodaje u medij za uzgoj je u fokusu mnogih istraživanja, kojima se nastoji izbjeći njegovo korištenje. Stoga se istražuju tvari ne-životinjskog podrijetla koje se mogu dodati u medij, pri čemu bi bilo poželjno da proliferacija stanica i produktivnost procesa bude jednaka ili čak i bolja u usporedbi s uzgojem tih istih stanica u mediju sa životinjskim serumom. Također, mnogo se truda ulaže u razvitak i optimizaciju kemijski definiranih SFM-a (engl. *serum-free media*) čime se direktno izbjegava korištenje životinjskog seruma.

Biljni hidrolizati se u tom smislu izučavaju već neko vrijeme, jer su dosadašnja istraživanja pokazala da mogu biti dobra zamjena za životinjski serum te koristan dodatak u SFM-ima (Babcock i sur., 2007). Konoplja i lan su biljke koje se godinama istražuju zbog njihovih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje te sadržaja niza spojeva koji potencijalno mogu imati pozitivno djelovanje na stanice i ljudski organizam u cjelini. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati mogu li hidrolizati lana i konoplje pozitivno djelovati na rast i vijabilnost CHO DP-12 stanica uzgajanih suspenzijski u SFM-u. Kako bi se to istražilo, praćena je vijabilnost stanica te koncentracija metabolita tijekom uzgoja. Vijabilnost je praćena brojanjem stanica u Neubaureovoj komorici metodom tripan-plavo. Eventualne razlike u odnosu na kontrolni uzgoj u kompletnom mediju, pokušale su se povezati s osnovnim staničnim procesima: staničnim ciklusom i staničnom smrću. Saznanja o staničnom ciklusu, odnosno u kojoj fazi ciklusa se stanice nalaze i/ili postotku stanica koje su ušle u proces stanične smrti daju dodatne informacije o utjecaju hidrolizata na stanice, stoga su također ispitane. Za praćenje staničnog ciklusa i stanične smrti korišteni su komercijalni kitovi i Muse™ analizator staničnog zdravlja koji radi na principu protočnog citometra.

4.1. UTJECAJ HIDROLIZATA LANA I KONOPLJE NA PROLIFERACIJU CHO DP-12 STANIČNE LINIJE

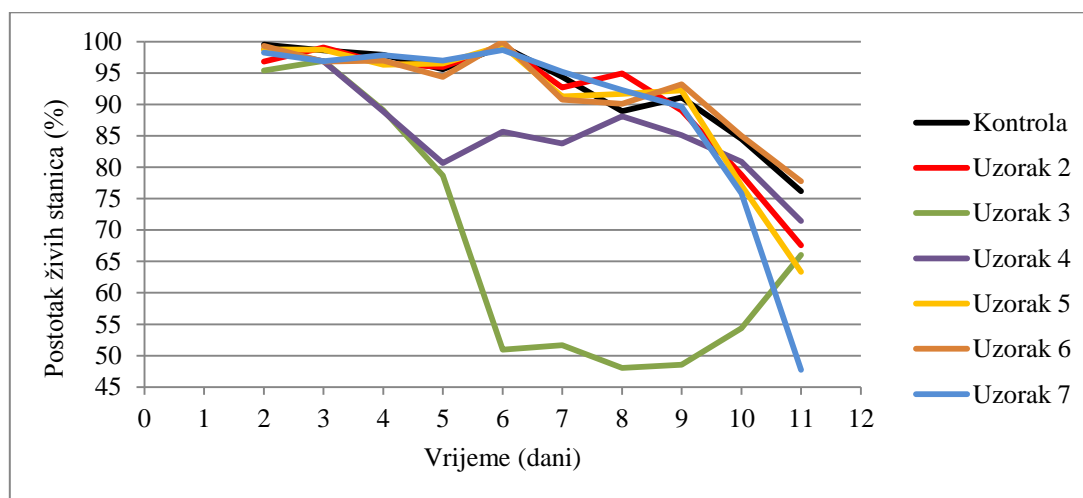
Hidrolizati lana i konoplje su pripremljeni u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Proizvedeni su pomoću tri komercijalne endopeptidaze: *Alcalase*TM, *Neutrased*TM i *Protamex*TM postupkom hidrolize, koja je prethodno optimirana za svaki enzim, obzirom na količinu enzima, pH otopine, temperaturu i druge parametre važne za uspješnost procesa. Na temelju dosadašnjih istraživanja na projektu „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj“, u kojima su ispitivani pripremljeni hidrolizati u različitim koncentracijama te njihove frakcije različitih molekularnih masa odabrano je sedam potencijalno zanimljivih hidrolizata (tablica 1) koji su nadalje istraženi u ovome radu. CHO DP-12 stanice uzgajane su tijekom 11 dana, odnosno do ulaska u fazu odumiranja. U 7 tikvica za uzgoj dodani su odabrani proteinski hidrolizati, a u kontrolnoj tikvici je uzgoj stanica proveden samo u mediju za uzgoj bez dodatka biljnog hidrolizata. Na slici 9 su prikazane krivulje rasta svih uzoraka.



Slika 9. Rast CHO DP-12 stanica tijekom 11 dana uzgoja u mediju bez dodatka seruma (Kontrola) i u mediju kojem su dodani različiti hidrolizati lana i konoplje (Uzorak 1 - Uzorak 7). Uvjeti uzgoja: atmosferski tlak, atmosferski zrak (atmosfera: 95 % zraka i 5 % CO₂) i temperatura 37 °C

U Uzorku 1, u kojem su CHO DP-12 stanice uzgajane uz dodatak HKA UK (nefrakcionirani hidrolizat konoplje proizveden pomoću alkalaze u koncentraciji od 2 g L^{-1}) je već drugi dan uzgoja primijećeno da su sve stanice mrtve. Stoga je zaključeno da je HKA UK u navedenoj koncentraciji izrazito toksičan za CHO DP-12 staničnu liniju. HKA UK u četiri puta manjoj koncentraciji od $0,5 \text{ g L}^{-1}$ (Uzorak 2) nije toliko štetan za CHO DP-12 stanice, ali također djeluje negativno na njihov rast, jer su stanice tijekom cijelog uzgoja (osim 8. dana, kada su doživjele pik sličan Kontrolni) rasle slabije nego u kontrolnom uzorku. Kod većine uzoraka faza prilagodbe (lag faza) je trajala 3 dana, nakon čega su stanice ušle u fazu eksponencijalnog rasta (log fazu). Kraj log faze je bio 7. ili 8. dana nakon čega su stanice ušle u stacionarnu fazu rasta i fazu odumiranja. Prva tri dana uzgoja (lag faza) su CHO DP-12 stanice u tikvicama s dodanim hidrolizatima lana (Uzorci 5, 6 i 7) rasle podjednako dobro kao i kontrolni uzorak, u kojem su stanice rasle samo u SFM-u. Od 3. do 6. dana uzgoja je dodatak proteinskih hidrolizata lana i konoplje navedenih u tablici 1 negativno utjecao na rast stanica, jer su kontrolne CHO DP-12 stanice imale veći broj stanica od ostalih uzoraka. Zatim su Uzorak 5 i 7 prerasli Kontrolu i imali veći broj stanica sve do 10. dana uzgoja, nakon kojega su svi uzorci počeli umirati većom brzinom od kontrolnog uzorka. Uzorci 2, 3 i 4, u kojima su stanice uzgajane uz dodatak različitih vrsta i koncentracija hidrolizata konoplje, su za vrijeme cijelog uzgoja imali manji broj stanica od Kontrole. Jedino je kod Uzorka 2 zamijećen neobičan „skok“ u rastu stanica gdje je 8. dan bilo više živih stanica nego u Kontrolni, no nakon toga su stanice i u tom uzorku odumirale brže nego u Kontrolni. Zanimljiv je Uzorak 3, u kojem su stanice uzgajane uz dodatak HKN $< 1 \text{ kDa}$, odnosno dodatak frakcije hidrolizata konoplje dobivene pomoću neutraze u kojoj je veličina proteina manja od 1 kDa . Rast stanica u tom uzorku je bio jako usporen tijekom provedenog jedanaestodnevnog uzgoja, a broj stanica je bio konstantno znatno niži od kontrolnog uzorka. Broj stanica u Uzorku 3 je do 9. dana podjednak, a tek onda je stanična kultura počela rasti. Kada se pogleda graf koji prikazuje vijabilnosti stanica (slika 10), primjećuje se da stanična kultura u Uzorku 3 prvo odumire, pa stagnira do 9. dana uzgoja, a tek onda počinje rasti. S obzirom da je rast CHO DP-12 stanica pri tom sastavu medija za uzgoj bio usporen, bilo bi zanimljivo u daljnjim istraživanjima provjeriti produktivnost stanica uz dodatak HKN $< 1 \text{ kDa}$, jer je možda metabolizam CHO DP-12 stanica bio preusmjeren na proizvodnju produkta, pa se zato stanice nisu intenzivno dijelile i rasle. Nadalje, moguće je da je uzgoj stanica u mediju uz dodatak HKN $< 1 \text{ kDa}$ rezultirao zastojem u određenoj fazi staničnog ciklusa, dok su čekale povoljnije uvjete za diobu, što je kasnije ispitano primjenom MuseTM analizatora staničnog zdravlja i kita za stanični ciklus. Osim Uzorka 3, Uzorak 4 također ima nisku staničnu vijabilnost. U 4.

tikvici su uzgajane CHO DP-12 stanice uz dodatak HKP < 1 kDa, odnosno frakcija hidrolizata konoplje dobivena protamexom s proteinima manjim od 1 kDa u koncentraciji od 2 g L⁻¹.



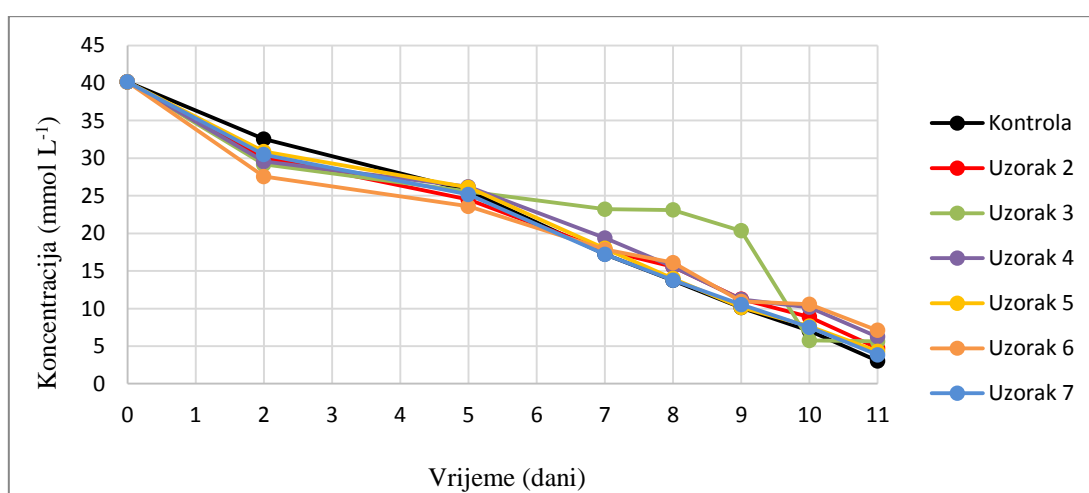
Slika 10. Vijabilnost CHO DP-12 stanica tijekom 11 dana uzgoja. Uvjeti uzgoja: atmosferski tlak, atmosferski zrak (atmosfera: 95 % zraka i 5 % CO₂) i temperatura 37 °C

U konačnici, na temelju rezultata prikazanih na grafovima uzgoja i vijabilnosti stanica (slika 9 i 10) može se zaključiti da ispitani proteinski hidrolizati konoplje djeluju negativno na rast CHO DP-12 stanične kulture. Hidrolizati lana, HLA < 1 kDa i HLP UK u koncentraciji od 0,5 g L⁻¹, djeluju na uzgoj CHO DP-12 stanica pozitivno od 7. do 10. dana uzgoja, ali nakon 10. dana uzrokuju veći pad vijabilnosti nego što je u Kontroli, dok su najbolji rezultati postignuti kod Uzoraka 5 i 7, gdje su dodani hidrolizati lana pripremljeni s alkalazom i protamexom u koncentraciji od 0,5 g L⁻¹. Objašnjenje za manji negativni učinak tih uzoraka na CHO DP-12 stanice su niže koncentracije primijenjenih hidrolizata (0,5 g L⁻¹), dok je Uzorak 6 (HLN < 1 kDa u koncentraciji od 2 g L⁻¹) tijekom cijelog uzgoja rastao slabije od Kontrole. To je u skladu s dosadašnjim istraživanjima navedenih hidrolizata lana (Logarušić i sur., 2020) i konoplje (Logarušić i sur., 2019) gdje je zapažen učinak ovisan o dozi, odnosno što je veća koncentracija dodanog hidrolizata to je učinak na rast stanica bio izraženiji. Naravno, to ovisi i o tipu hidrolizata, općenito su hidrolizati pripremljeni alkalazom imali jači negativni učinak na stanice nego oni pripremljeni neutrazom i protamexom (Logarušić i sur., 2020). Što se tiče veličine proteina u primijenjenim hidrolizatima, ne primjećuje se razlika ovisno o tome jesu li dodane frakcije hidrolizata s proteinima manjima od 1 kDa (< 1 kDa) ili

ukupni hidrolizati (UK) koji sadrže nefrakcionirane proteine svih veličina. U radu Logarušić i sur. (2021) zaključeno je da dodatak relativno niske doze (1 g L^{-1}) lanenih hidrolizata mediju za uzgoj nije rezultirao značajnim promjenama u rastu i produktivnosti kulture CHO DP-12 stanica s obzirom na kontrolu.

4.2. UTJECAJ HIDROLIZATA LANA I KONOPLJE NA SASTAV MEDIJA ZA UZGOJ

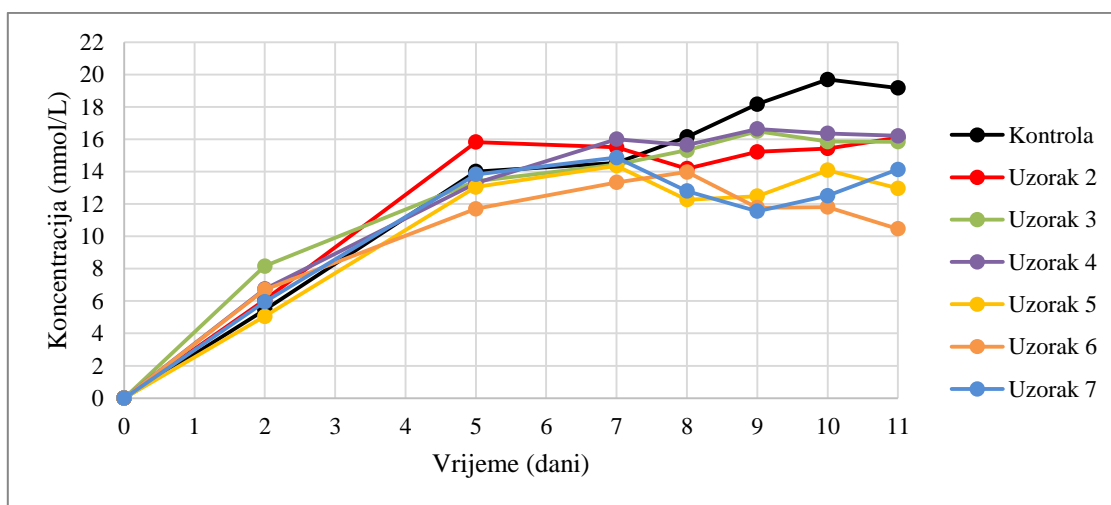
U biotehnološkoj primjeni staničnih kultura jedan od najvažnijih ciljeva je povećanje prinosa proizvoda. Strategije poboljšanja i optimizacije produktivnosti proizvodnog procesa uključuju selekciju proizvodne stanične linije, optimizaciju medija, uvjeta i načina uzgoja te primjenu genetskog inženjerstva s ciljem identifikacije aktivatora transkripcije željenih proteina ili smanjenja razine inhibitora transkripcije (Genzel i sur., 2008). U ovome radu poboljšanje vijabilnosti proizvodnih stanica nastojao se postići optimizacijom medija, odnosno dodatkom odabranih ukupnih hidrolizata lana i konoplje te njihovih frakcija u medij za uzgoj bez seruma. Za vrijeme uzgoja staničnih kultura, sastav medija se mijenja jer dolazi do iscrpljivanja hranjivih tvari (glukoze, glutamina) i nakupljanja staničnih metabolita (laktata, amonijaka). Praćenjem potrošnje glukoze (slika 11) i nakupljanja laktata i amonijaka (slike 12 i 13) može se dobiti detaljniji uvid u ponašanje određene stanične kulture tijekom uzgoja.



Slika 11. Prikaz promjene koncentracije glukoze tijekom 11 dana uzgoja. Uvjeti uzgoja: atmosferski tlak, atmosferski zrak (atmosfera: 95 % zraka i 5 % CO₂) i temperatura 37 °C

Iz slike 11 se vidi podjednaka potrošnja glukoze za vrijeme uzgoja u svim uzorcima kao i u Kontroli, osim u Uzorku 3 koji je imao odgođen početak rasta do 9. dana uzgoja. Kod Uzorka 3, kao što je ranije rečeno, 9. dana su CHO DP-12 stanice u počele rasti, što je i ovdje vidljivo po naglom padu koncentracije glukoze, koju stanice troše za rast i staničnu diobu. Iz navedenog za Uzorak 3 je jasno da je ovisnost promjene koncentracije glukoze tijekom uzgoja u skladu s ovisnošću proliferacije stanica (slika 9) što se također lijepo vidi npr. za Kontrolu kod koje je 11. dan bila najniža razina glukoze ($3,04 \text{ mmol L}^{-1}$) i najveća koncentracija živih stanica ($3,47 \times 10^6 \text{ st mL}^{-1}$).

Laktat se nakuplja kao nusprodukt metabolizma glukoze, glavnog izvora energije u mediju za uzgoj stanica. Nastaje iz piruvata reakcijom laktat dehidrogenaze u anaerobnim uvjetima. U staničnim kulturama uvijek dolazi do proizvodnje laktata, iako rastu u prisutnosti kisika (atmosferski uvjeti, 95 % zraka, 5 % CO_2), zbog deregulacije metabolizma u staničnim linijama. Također, zbog ograničenog transporta kisika do stanica dolazi do pokretanja fermentativnog metabolizma u stanicama, koje umjesto da piruvat prevode ciklusom limunske kiseline do H_2O i CO_2 , prevode ga do laktata. Još jedan od razloga nastanka laktata je aktivacija enzima glikolize i inhibicija enzima ciklusa limunske kiseline od strane amonijaka koji također nastaje za vrijeme uzgoja kao rezultat metabolizma glutamina te spontane degradacije glutamina iz medija pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (Castilho i sur., 2008). Kada je laktat prisutan u većim koncentracijama u mediju za uzgoj može usporiti rast stanica, dok su koncentracije iznad 20 mM L^{-1} toksične za stanice. Stoga je tijekom uzgoja stanica praćena u Kontroli i svim uzorcima promjena koncentracije laktata za vrijeme uzgoja što je prikazano na slici 12.



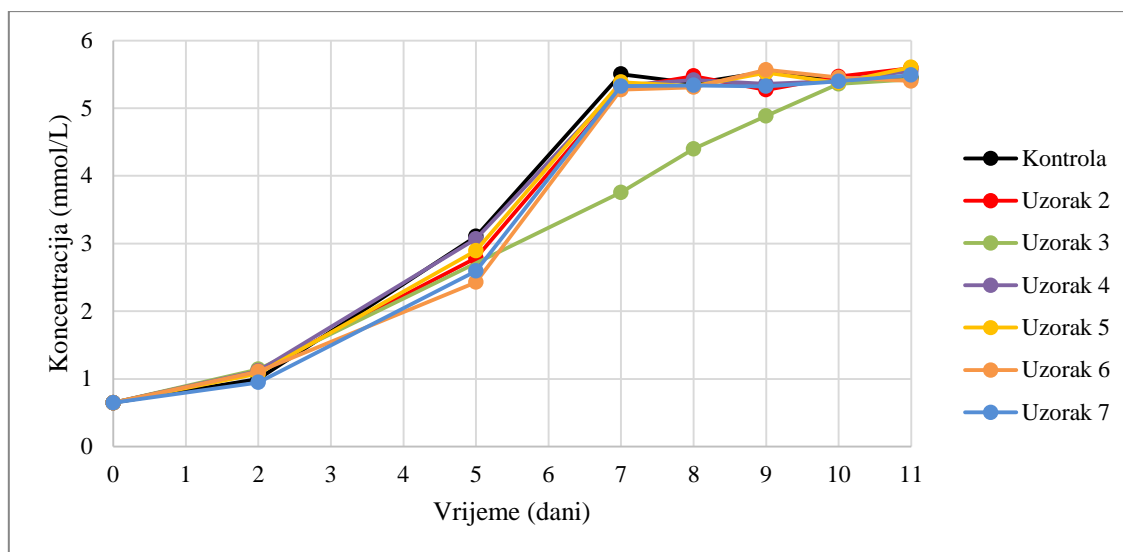
Slika 12. Promjena koncentracije laktata tijekom 11 dana uzgoja. Uvjeti uzgoja: atmosferski tlak, atmosferski zrak (atmosfera: 95 % zraka i 5 % CO_2) i temperatura $37 \text{ }^\circ\text{C}$

Koncentracija laktata s vremenom uzgoja raste, što je i očekivano, obzirom na potrošnju glukoze. Iako su stanice u Uzorcima 3 i 4 najsporije rasle, proizvele su laktata skoro kao i Kontrola. Moguće objašnjenje ovakve pojave je to da hidrolizati konoplje utječu na inhibiciju ciklusa mliječne kiseline ili aktivaciju glikolize, pa one proizvode više laktata koji inhibira rast stanica. Uzorak 2 također sadrži hidrolizat konoplje i iako nije imao usporen rast kao uzorci 3 i 4, svejedno je proizveo veću količinu laktata od Uzoraka 5, 6 i 7 u kojima su CHO DP-12 stanice uzgajane uz dodatak hidrolizata lana.

Već je jako dugo poznato da je među aminokiselinama glutamin glavni izvor energije za stanice sisavaca. Važan je i kao sastojak proteina, kao donor amino skupine i jer potiče stanični rast. Zbog toga mediji za uzgoj staničnih kultura sadrže 2 - 6 mM glutamina što su puno veće koncentracije od koncentracija ostalih aminokiselina (Genzel i sur., 2008). Metabolizmom glutamina nastaje amonijak, koji djeluje inhibitorno na rast staničnih kultura. Već niske koncentracije amonijaka u mediju (1-5 mM) mogu dramatično inhibirati stanični rast. Također, prisutnost amonijaka u mediju može negativno utjecati na kvalitetu proizvoda. Stanice amonijak ispuštaju u medij kao rezultat metabolizma glutamina i ostalih aminokiselina. Deaminacijom glutamina nastaje glutamat, a deaminacijom glutamata α -ketoglutarat koji se uključuje u reakcije ciklusa mliječne kiseline. U živom organizmu se amonijevi ioni većinom uklanjaju putem urea ciklusa u jetri, dok se kod CHO DP-12 stanica u kulturi spontanom difuzijom izlučuju iz stanica u medij. U mediju se zbog toga povećava koncentracija amonijaka što inhibira rast stanične kulture. Problem nakupljanja amonijaka u mediju, dodatno povećava činjenica da se glutamin također spontano razgrađuje na glutamat i amonijak brzinom od 0,1 mM amonijaka dnevno pri 37 °C (Castilho i sur., 2008). Stoga se u mnogim istraživanjima nastoji naći ravnoteža između toga da se osigura što veća koncentracija glutamina u mediju, koja osigurava maksimalan prinos proizvoda, a s druge strane što manjeg nastanka amonijaka, koji inhibira rast stanica i smanjuje prinos proizvoda.

Prikaz promjene koncentracije amonijaka u mediju za vrijeme uzgoja CHO DP-12 stanica ovisno o dodanim hidrolizatima konoplje i lana dan je na slici 13. Amonijak je podjednako nastajao u svim uzorcima, kao i u kontrolnom, osim u Uzorku 3 koji sadrži HKN < 1 kDa u koncentraciji od 2 g L⁻¹. CHO DP-12 stanice su najsporije rasle upravo u tom uzorku, pa je i produkcija amonijaka bila slabija. Amonijak u mediju u koncentraciji iznad 2 mM L⁻¹ inhibira stanični rast, a u koncentraciji od 5 mM L⁻¹ inhibira i proizvodnju produkta u staničnim linijama (Wagner, 1997). Koncentracija amonijaka između 5 i 6 mM L⁻¹ je inhibirala rast

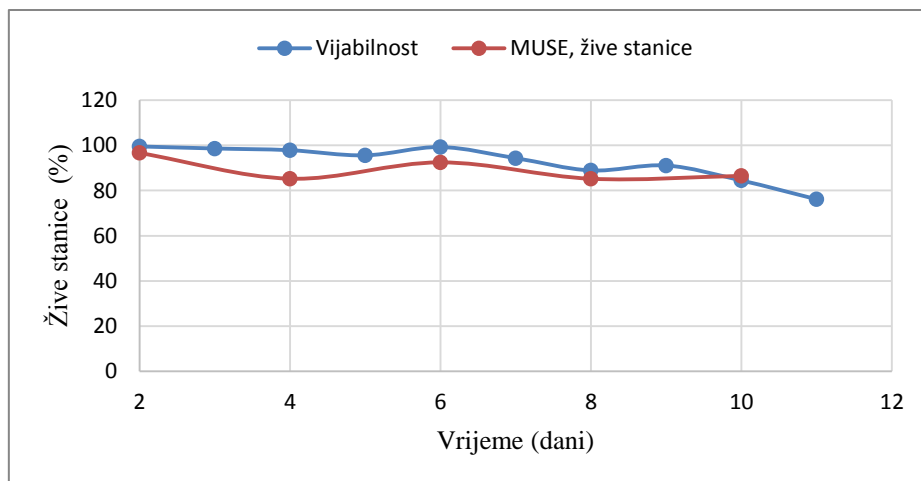
CHO DP-12 staničnih linija u svim uzorcima što se vidi po padu vijabilnosti koji je počeo nakon 6. dana uzgoja (slika 10).



Slika 13. Prikaz koncentracije amonijaka tijekom 11 dana uzgoja. Uvjeti uzgoja: atmosferski tlak, atmosferski zrak (atmosfera: 95 % zraka i 5 % CO₂) i temperatura 37 °C

4.3.UTJECAJ HIDROLIZATA LANA I KONOPLJE NA STANIČNU SMRT

Podaci o postotku stanica koje su eventualno aktivirale procese stanične smrti daju dodatan uvid u utjecaj dodatka hidrolizata lana i konoplje na CHO DP-12 staničnu kulturu. Ovisno o učinku hidrolizata na proliferaciju i vijabilnost stanica, može se očekivati da hidrolizati potiču ili inhibiraju staničnu smrt u kulturi putem procesa apoptoze ili nekroze. Da bi to odredili, nakon početne lag faze uzimani su uzorci za analizu stanične smrti (dan 2, 4, 6, 8 i 10) i analizirani odmah taj dan na Muse™ analizatoru staničnog zdravlja koji radi na principu protočnog citometra. Uzorci su pripremljeni za analizu prema protokolu proizvođača i kako je opisano u poglavlju 3.2.4.1.



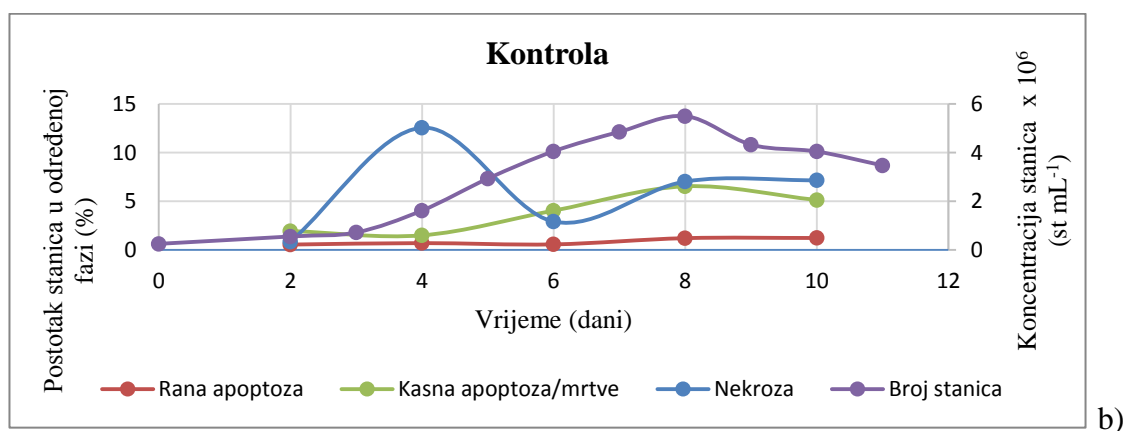
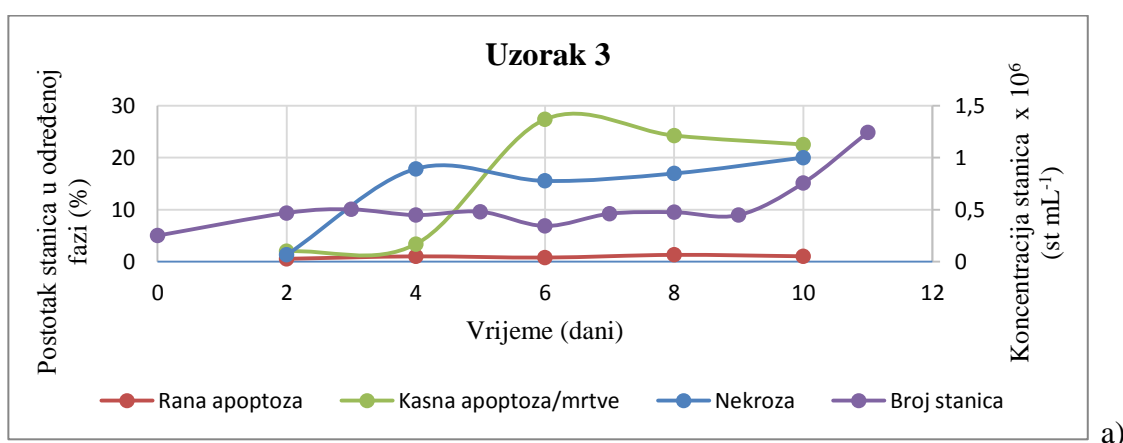
Slika 14. Usporedba postotka živih stanica, određenih metodom tripan-plavo i brojanjem u Neubaureovoj komorici (plavo) te dobivenih na Muse™ analizatoru (crveno) u kontrolnom uzorku u mediju bez seruma i bez dodatka hidrolizata

Slika 14 je zanimljiva jer prikazuje relativno dobro podudaranje određivanja vijabilnosti stanica u Kontrolni brojanjem u Neubaureovoj komorici, što je subjektivna metoda podložna greškama u brojanju onog koji broji, te rezultata dobivenih objektivnom metodom na Muse™ analizatoru staničnog zdravlja. Brojanjem stanica pomoću mikroskopa metodom tripan-plavo su pod žive stanice uvrštene i one koje se nalaze u ranoj apoptozi, pa zato vijabilnost ispada veća. Muse™ analizator razlikuje žive stanice od onih koje se nalaze u ranoj ili kasnoj apoptozi od nekroznih stanica, što se ne može razlikovati tripan-plavo bojanjem. Ova usporedba prikazana na slici 14, nam zapravo potvrđuje vjerodostojnost podataka dobivenih metodom tripan-plavo prikazanih na slici 10.

Do sada je zaključeno kako pripravljeni hidrolizati konoplje djeluju jače citotoksično od lanenih hidrolizata. Kako bi se ta činjenica potvrdila, u tablici 4 dani su rezultati analize stanične smrti izmjereni na Muse™ uređaju osmog dana uzgoja, koji je odabran za prikaz zato jer je tada većina uzoraka postigla „pik“ u rastu, odnosno imala maksimalnu koncentraciju stanica, nakon čega su stanice u svim uzorcima ušle u stacionarnu fazu rasta. Uzorci 5, 6 i 7 (hidrolizati lana) imaju puno manji postotak nekroznih stanica od Uzoraka 2, 3 i 4 (hidrolizati konoplje) što potvrđuje činjenicu da hidrolizati konoplje imaju jači citotoksični učinak na CHO DP-12 stanice. Također, i postotak kasno apoptotičnih stanica je veći u Uzorku 3, koji je uzgajan uz dodatak hidrolizata konoplje i koji je do 9. dana uzgoja znatno sporije rastao.

Tablica 4. Prikaz raspodjele faza stanične smrti za Kontrolu i uzorke s dodanim hidrolizatima konoplje i lana na 8. dan uzgoja

Faza stanične smrti	Kontrola	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5	Uzorak 6	Uzorak 7
Žive stanice (%)	85,24	82,04	57,505	80,07	86,73	83,13	86,15
Rana apoptoza (%)	1,21	1,105	1,295	1,3	1,28	1,59	1,47
Kasna apoptoza (%)	6,53	7,38	24,245	9,82	8,77	11,84	9,35
Nekroza (%)	7,02	9,475	16,955	8,81	3,22	3,44	3,03



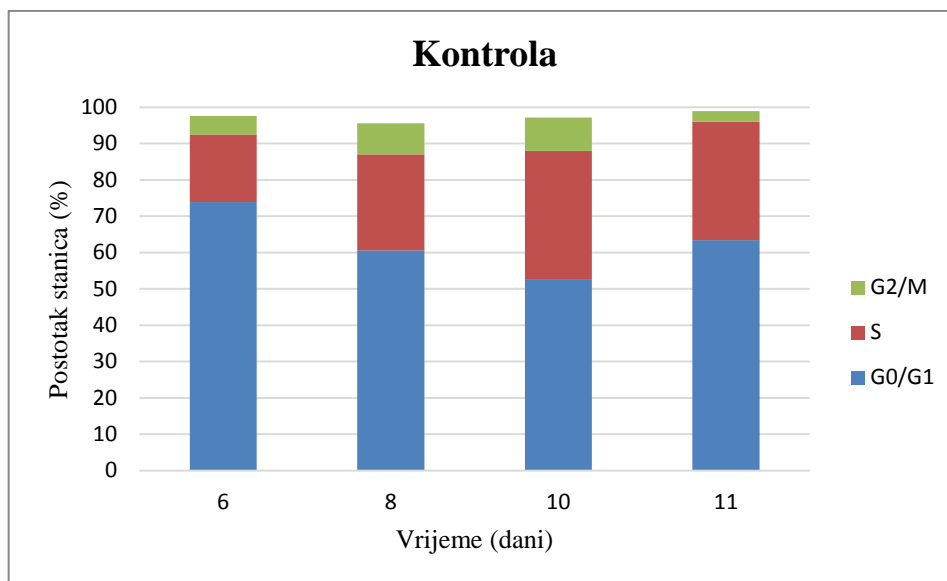
Slika 15. Usporedba Uzorka 3 (a) u odnosu na Kontrolu (b) ovisno o postotku stanica koje se nalaze u određenim fazama stanične smrti (kasna apoptoza (zeleno) i nekroza (plavo))

Na slici 15 se primjećuje kako Uzorak 3 (HKN < 1 kDa), koji raste puno sporije od Kontrole, sadržava kroz čitav uzgoj više stanica koje su nekrozne ili u fazi kasne apoptoze od stanica u kontrolnom uzorku.

4.4. UTJECAJ HIDROLIZATA LANA I KONOPLJE NA STANIČNI CIKLUS

Podaci o postotku stanica koje se nalaze u određenoj fazi staničnog ciklusa (stanične diobe) pružaju dodatno razumijevanje utjecaja hidrolizata lana i konoplje kao dodatka u medij za uzgoj CHO DP-12 stanica bez seruma. Stanice koje se nalaze u G0/G1 fazi su one koje se nalaze u zastoju stanične diobe ili početnoj pripremi za staničnu diobu. U S fazi se nalaze stanice koje vrše replikaciju kromosoma kako bi omogućile nastanak DNA za novonastalu stanicu kćer. Stanice koje se nalaze u G2/M fazi su u fazi pripreme za mitozu ili usred mitoze. Poznato je iz literature da mitozu traje manje od 10% staničnog ciklusa, pa bi bilo očekivano da je najmanji postotak stanica u G2/M fazi ciklusa.

Uzorci za analizu staničnog ciklusa uzimani su 6, 8, 10 i 11 dan uzgoja te analizirani na Muse™ analizatoru staničnog zdravlja koji radi na principu protočnog citometra. Uzorci su pripremljeni za analizu prema protokolu proizvođača i kako je opisano u poglavlju 3.2.4.2.

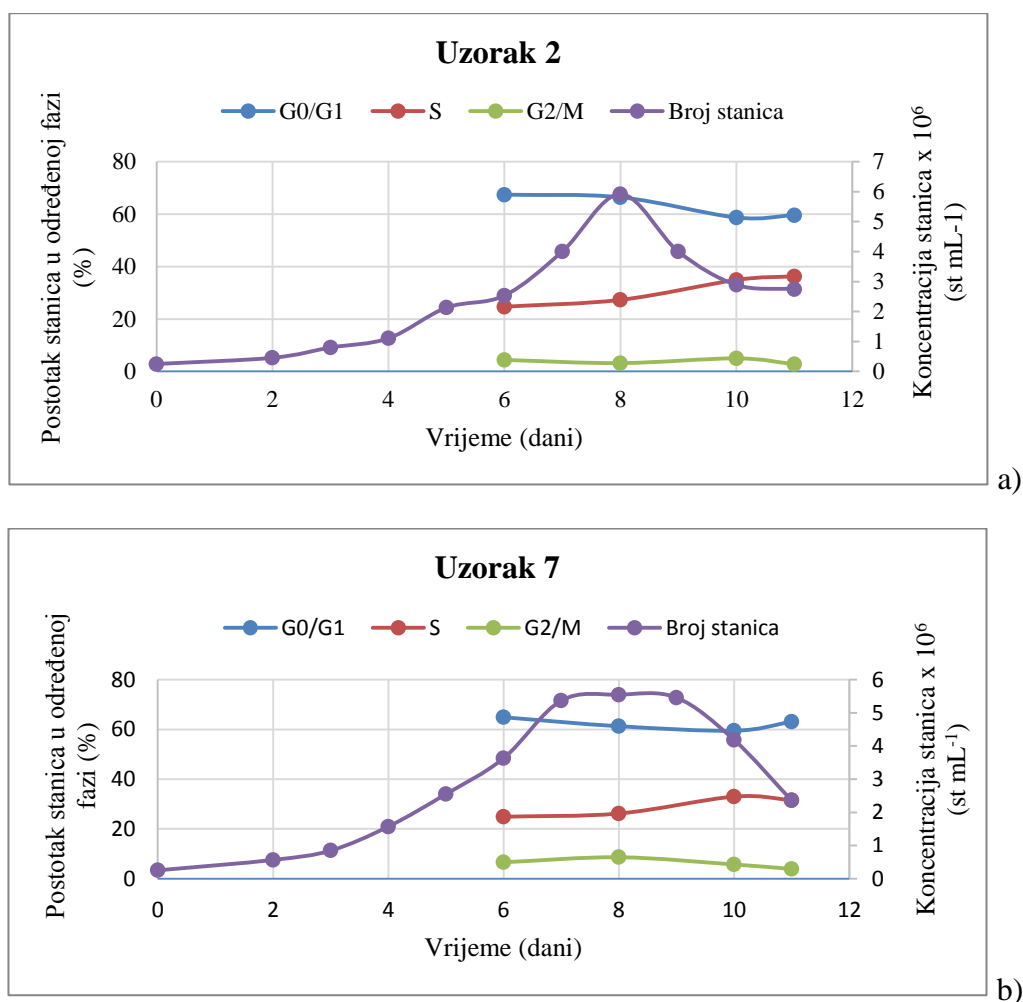


Slika 16. Prikaz raspodjele CHO DP-12 stanica (%) po fazama staničnog ciklusa za vrijeme uzgoja kontrolnog uzorka u mediju bez seruma i dodatka hidrolizata. Uvjeti uzgoja: atmosferski tlak, atmosferski zrak (atmosfera: 95 % zraka i 5 % CO₂) i temperatura 37 °C

Na slici 16 je vidljivo da je najmanji postotak stanica u kontrolnom uzorku u G2/M fazi, kao što je i očekivano s obzirom da interfaza čini 90 % vremena stanične diobe. U G2/M fazi se nalazi najviše stanica 8. i 10. dan uzgoja što odgovara kraju eksponencijalne faze rasta,

odnosno ulasku u stacionarnu fazu rasta i početku odumiranja stanične kulture. Kroz cijeli uzgoj se najviše stanica u kontrolnom uzorku nalazi u G0/G1 fazi staničnog ciklusa što odgovara literaturnim podacima koji kažu da je ta faza staničnog ciklusa najduža (Cooper, 2000).

Ako se uspoređi raspodjela stanica s obzirom na stanični ciklus u jednom uzorku koji sadrži hidrolizat konoplje (Uzorak 2) i uzorku koji sadrži hidrolizat lana (Uzorak 7), a koji su imali sličnu vijabilnost tijekom svih 11 dana uzgoja, ne primjećuju se značajne razlike (slika 17). Postotak stanica koje se nalaze u G0/G1 fazi je oko 63 %, u S fazi oko 29 % te u G2/M fazi oko 5 % u oba uzorka.



Slika 17. Usporedba utjecaja hidrolizata konoplje (Uzorak 2) (a) i lana (Uzorak 7) (b) na razdiobu CHO DP-12 stanica u određenoj fazi staničnog ciklusa tijekom 11. dana uzgoja. Uvjeti uzgoja: atmosferski tlak, atmosferski zrak (atmosfera: 95 % zraka i 5 % CO₂) i temperatura 37 °C

Rezultati prikazani na slici 17 su u skladu s dosadašnjim istraživanjima u kojima je zaključeno kako laneni (Logarušić i sur., 2021) i konopljini (Logarušić i sur., 2019) hidrolizati u koncentracijama 0,5-2 g L⁻¹ nemaju očit učinak na CHO DP-12 staničnu liniju.

Dodatak ispitivanih hidrolizata lana i konoplje te njihovih frakcija nije povoljno i pozitivno djelovao na rast suspenzijskih CHO DP-12 stanica uzgajanih 11 dana u SFM-u. Štoviše, hidrolizati u Uzorcima 2, 4, 5, 6 i 7, ne samo da nisu poticali rast nego su djelovali blago citotoksično. Hidrolizati konoplje u Uzorcima 1 i 3 su djelovali izrazito negativno na rast CHO DP-12 stanica, jer je njihovim dodatkom u medij došlo do odumiranja stanične linije drugog dana uzgoja (Uzorak 1), odnosno do odgode početka log faze s 3. na 9. dan te izrazito smanjene vijabilnosti stanica na oko 50 % (Uzorak 3). Iako sporiji rast proizvodne stanične linije nije poželjna pojava u biotehnološkom procesu, moguće je da taj usporeni rast rezultira povećanjem prinosa željenog produkta zbog preusmjerenja metabolizma stanica na proizvodnju produkta. Stoga postoji mogućnost da hidrolizati lana i konoplje, iako usporavaju rast stanica, povećavaju proizvodnju željenog imunoglobulina, što će svakako biti ispitano u nastavku istraživanja koja će se provoditi u ovom području u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije. U konačnici, ovaj rad pruža detaljniji uvid u utjecaj sedam odabranih hidrolizata lana i konoplje na proizvodnu CHO DP-12 staničnu liniju i njihovu metaboličku aktivnost tijekom suspenzijskog uzgoja te potvrđuje ranija saznanja o njihovom neutralnom ili negativnom djelovanju na rast navedenih stanica. Također, omogućuje usporedbu djelovanja hidrolizata lana naspram hidrolizata konoplje pri istim uvjetima uzgoja pri čemu je zapaženo da samo hidrolizati konoplje potiču apoptozu i nekrozu u CHO DP-12 stanicama, dok utjecaj na stanični ciklus unatoč slabijem rastu nego u kontrolnom uzorku nije zapažen.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata zaključeno je slijedeće:

1. Ukupni hidrolizat konoplje pripremljen pomoću enzima *Alcalase*TM u koncentraciji od 2 g L⁻¹ djeluje izrazito citotoksično na staničnu liniju CHO DP-12 uzgajanu u mediju bez seruma. Dodatak tog hidrolizata u medij rezultirao je smrtnošću stanica većom od 90 % već drugog dana uzgoja.
2. Dodatak hidrolizata konoplje pripremljenih primjenom enzima: *Alcalase*TM, *Neutrased*TM i *Protamex*TM, u koncentraciji do 2 g L⁻¹, djeluje negativno na rast CHO DP-12 stanica tijekom 11 dana uzgoja u odnosu na kontrolne CHO DP-12 stanice uzgajane samo u mediju bez seruma.
3. Dodatak lanenih hidrolizata pripremljenih primjenom enzima: *Alcalase*TM, *Neutrased*TM i *Protamex*TM, u koncentraciji do 2 g L⁻¹, ne pokazuje niti pozitivan niti negativan učinak na rast CHO DP-12 stanica tijekom 11 dana uzgoja u odnosu na kontrolne CHO DP-12 stanice uzgajane samo u mediju bez seruma.
4. Analizom stanične smrti na MuseTM analizatoru staničnog zdravlja uočeno je da CHO DP-12 stanice koje su uzgajane uz dodatak hidrolizata konoplje imaju veći postotak kasno apoptotičnih i nekrotičnih stanica, u usporedbi s kontrolnim uzorcima te onima kod kojih je uzgoj proveden uz dodatak hidrolizata lana.
5. Analizom staničnog ciklusa na MuseTM analizatoru staničnog zdravlja nije primijećen značajan učinak na raspodjelu CHO DP-12 stanica s obzirom na fazu staničnog ciklusa u kojemu se nalaze, bez obzira na vrstu i količinu dodanog hidrolizata u medij za uzgoj stanica bez seruma.

6. LITERATURA

Anonymous 1 (2021) Lan, <<https://www.plantea.com.hr/lan/#referenca-1>>. Pristupljeno 4. lipnja 2021.

Anonymous 2 (2021) Neubauerova komorica, <https://www.researchgate.net/publication/274063071_Second_Project_Practical_Characterization_of_hIPS_derived_Cardiomyocytes/figures?lo=1>. Pristupljeno 3. srpnja 2021.

Anonymous 3 (2021) Trinderov test, <https://en.wikipedia.org/wiki/Trinder_glucose_activity_test>. Pristupljeno 30. lipnja 2021.

ATCC (2021) <<https://www.atcc.org/products/crl-12445#detailed-product-images>>. Pristupljeno 3. srpnja 2021.

Babcock, J., Smith, S., Huttinga, H., Merrill, D. (2007, 15. studenoga) Enhancing Performance in Cell Culture. GEN - Genetic Engineering & Biotechnology News, <<https://www.genengnews.com/magazine/81/enhancing-performance-in-cell-culture/>>. Pristupljeno 25. lipnja 2021.

Bakowska-Barczak, A., Larminat, M. A. de, Kolodziejczyk, P. P. (2020) The application of flax and hempseed in food, nutraceutical and personal care products. U: *Handbook of Natural Fibres*, (Kozłowski, R. M., Mackiewicz-Talarczyk, M., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 557-566.

Castilho, L. R., Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Butler, M. (2008) Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy. Taylor & Francis, New York, str. 84-101.

Chandra, S., Lata, H., ElSohly, M. A. (2017) Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology, Springer Publishing, Oxford.

Cooper, G. M. (2000) The Cell: A Molecular Approach, 2. izd., Sinauer Associates, Sunderland.

Cunnane, S. C., Hamadeh, M. J., Liede, A. C., Thompson, L. U., Wolever, T. M., Jenkins, D. J. (1995) Nutritional attributes of traditional flaxseed in healthy young adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**, 62-68.

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Andrews, D. W. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486-541.

Gao, Y. (2020) Oilseed flax (*Linum usitatissimum* L.), an emerging functional cash crop of China. *OCS*, **5**, 23.

Genzel, Y., Ritter, J. B., König, S., Alt, R., Reichl, U. (2008) Substitution of Glutamine by Pyruvate To Reduce Ammonia Formation and Growth Inhibition of Mammalian Cells. *Biotechnol. Prog.* **21**, 58-69.

Girón-Calle, J., Vioque, J., Pedroche, J., Alaiz, M., Yust, M. M., Megías, C., Millán, F. (2008) Chickpea protein hydrolysate as a substitute for serum in cell culture. *Cytotechnology* **57**, 263-272.

Hacker, D. L., Wurm, F. M. (2017) Recombinant DNA Technology for Production of Protein Therapeutics in Cultured Mammalian Cells. U: *Reference Module in Life Sciences* [online], (Roitberg, B. D., ured.), Elsevier, Cambridge. doi: [10.1016/B978-0-12-809633-8.09079-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.09079-8)

Ivanić, A. (2020) Stanični ciklus i smrt stanice u proizvodnoj staničnoj liniji. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Jakopec, M. (2017) Procjena učinka nesteroidnih protuupalnih lijekova u kulturama životinjskih stanica. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Kolak, M. (2019) Djelovanje ekstrakata iz otpada proizvodnje kakaa na in vitro rast stanica i stanični ciklus. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Krampe, B., Al-Rubeai, M. (2010) Cell death in mammalian cell culture: molecular mechanisms and cell line engineering strategies. *Cytotechnology* **62**, 175-188.

Kuystermans, D., Al-Rubeai, M. (2015) Biopharmaceutical Products from Animal Cell Culture. U: *Animal Cell Culture*, (Al-Rubeai, M., ured.), Springer International Publishing, Oxford, str. 717-720.

Lew, D. J. (2013) Cell Cycle. U: *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, (Maloy, S., Hughes, K., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 456-464.

Logarušić, M., Slivac, I., Radošević, K., Bagović, M., Redovniković, I. R., Srček, V. G. (2019) Hempseed protein hydrolysates' effects on the proliferation and induced oxidative stress in normal and cancer cell lines. *Mol. Biol. Rep.* **46**, 6079-6085. doi: 10.1007/s11033-019-05043-8

Logarušić, M., Radošević, K., Bis, A., Panić, M., Slivac, I., Srček, V. G. (2020) Biological Potential of Flaxseed Protein Hydrolysates Obtained by Different Proteases. *Plant Foods Hum. Nutr.* **75**, 518-524.

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

Millipore (2013) Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit User's Guide: *Catalog No. MCH100105 (100 Tests)*. Merck KGaA, Darmstadt Germany.

Nema, R., Khare, S. (2012) An animal cell culture: Advance technology for modern research. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **3**, 219-226.

Omasa, T., Onitsuka, M., Kim, W. D. (2010) Cell Engineering and Cultivation of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **11**, 233-240.

Shim, Y.Y., Gui, B., Arnison, P.G., Wang, Y., Reaney, M. J. T., (2014) Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **38**, 5-20.

Wagner, R. (1997) Metabolic control of animal cell culture processes. U: *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*, (Hauser, H., Wagner, R., ured.), Walter de Gruyter, Berlin, str. 193-232.

Walsh, G. (2010) Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat. Biotechnol.* **28**, 917-924.

Yang, R. J., Fu, L. M., Hou, H. H. (2018) Review and perspectives on microfluidic flow cytometers. *Sensor Actuat. B-Chem.* **266**, 26-45.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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.

Paula Inkret