

Nove tehnologije u proizvodnji mesa: meso proizvedeno iz matičnih stanica domaćih životinja

Raič, Petar

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:193444>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Petar Raič

Diplomski sveučilišni studij Zootehnika

Smjer Specijalna zootehnika

**NOVE TEHNOLOGIJE U PROIZVODNJI MESA: MESO PROIZVEDENO IZ
MATIČNIH STANICA DOMAĆIH ŽIVOTINJA**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Petar Raič

Diplomski sveučilišni studij Zootehnika

Smjer Specijalna zootehnika

**NOVE TEHNOLOGIJE U PROIZVODNJI MESA: MESO
PROIZVEDENO IZ MATIČNIH STANICA DOMAĆIH ŽIVOTINJA**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Goran Kušec, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ivona Djurkin Kušec, mentor
3. izv. prof. dr. sc. Mislav Đidara, zamjenski član

Osijek, 2022.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. MATIČNE STANICE MIŠIĆNOG TKIVA – definicija i razvoj.....	2
3. IZOLACIJA MIŠIĆNIH MATIČNIH STANICA IZ TKIVA ŽIVOTINJE	4
3.1. Čimbenici koji utječu na rast mišićnih stanica.....	4
3.2 Disocijacija mišićnog tkiva	6
3.3 Odvajanje mišićnih matičnih stanica od populacije mononuklearnih stanica.....	6
3.4 Krioprezervacija mišićnih matičnih stanica	9
4. UZGOJ MIŠIĆNIH MATIČNIH STANICA	10
4.1 Stanične podloge	10
4.2 Bazalni mediji	11
4.3 Serum i njegove zamjene	12
4.3.1 Molekule stanične signalizacije	12
4.3.2 Faktori rasta fibroblasta (FGF2 ili FGF).....	13
4.3.3. Inhibitori signalizacije P38	13
4.3.4. Inzulin i inzulinu sličan faktor rasta 1 (IGF-1)	14
4.3.5. Wnt signalni putevi (eng. Wntless Int-1)	14
4.3.6 Antibiotici i antimikotici	14
5. NOSAČI (eng. Scaffolds)	15
5.1. Mikronosači.....	17
5.2. Uobičajeno korišteni nosači za proizvodnju staničnog mesa.....	19
5.2.1. Prirodni polimeri	19
5.2.2. Polimeri životinjskog podrijetla.....	19
5.3. Tehnike izrade nosača	20
6. BIOREAKTORI	21
6.1. Važnost mikrokruženja u bioreктору	22
7. PRIMJERI UZGOJA SATELITSKIH STANICA U RAZLIČITIH VRSTA DOMAĆIH ŽIVOTINJA.....	26
7.1. Pileće meso.....	26
7.2. Goveđe meso	26
7.3. Svinjsko meso	27
8. IZAZOVI U SVOJSTVIMA KAKVOĆE MESA PROIZVEDENOG U LABORATORIJU	
31	
8.1. Postmortalni metabolizam.....	31

8.2. Strukturna i teksturna svojstva staničnog mesa	32
8.3. Boja	34
8.4. Okus	35
8.5. Nutritivna vrijednost	36
9. RAZLOZI ZA PROIZVODNJU STANIČNOG MESA	37
9.1. Održivost okoliša	39
9.2. Dobrobit životinja	39
9.3. Sigurnost hrane.....	40
10. IZAZOVI U PROIZVODNJI STANIČNOG MESA	40
10.1. Odgovor tržišta.....	41
10.2. Nesposobnost strukturiranja.....	41
10.3. Fetalni goveđi serum	41
11. ZAKLJUČAK.....	43
12. POPIS LITERATURE.....	44
13. SAŽETAK	61
14. SUMMARY	62
15. POPIS SLIKA.....	63
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	65
BASIC DOCUMENTATION CARD.....	66

1. UVOD

Čovjek kao vrsta je omnivor, a to znači da su za pravilno funkcioniranje njegova organizma potrebni nutritivni elementi koji se nalaze u biljkama, ali i mesu dobivenom od životinja uzgojenih u ovu svrhu. Zbog rasta ljudske populacije, no isto tako i promjene prehrambenih navika, gdje je veliki naglasak dan upravo na konzumaciju mesa (što zbog nutritivnih potreba, što zbog preferencija konzumenata), proizvodnja se mesa u posljednjih 30 godina udvostručila. Do 2020. godine konzumirano je u svijetu 188 000 000 tona mesa, a do 2050. prognozira se da će ta brojka premašiti 460 milijuna tona i iznositi čak i do vrtoglavih 570 milijuna tona mesa. Sve veća potražnja za mesom neće biti moguće ostvariti konvencionalnom proizvodnjom mesa kakvu poznajemo danas. Razlog tomu je i podatak da se čak do 70% svih obradivih površina direktno ili indirektno koristi za stočarstvo (Steinfeld i sur., 2006.). Zbog toga je od velike važnosti iznaći alternative koje će s jedne strane zadovoljiti nutritivne potrebe rastuće ljudske populacije, no s druge strane biti održivo u smislu iskorištenja zemljišnih resursa – kako tla, tako i njezine atmosfere. Kao jedna od alternativa koja bi trebala zadovoljiti ove kriterije, no isto tako promijeniti drastično smjer stočarstva kakvog poznajemo danas je proizvodnja mesa iz matičnih stanica.

„Stanično“ ili „kultivirano“ meso je produkt animalnog podrijetla koji se dobiva izoliranjem matične stanice (putem biopsije) iz žive životinje, nakon čega se umjetnim putem uz kontrolirane uvjete stanice razvijaju, da bi naposljetku dobili gotov animalni proizvod. Pri tome kao glavne prednosti koje se očituju u kompletnoj proizvodnji staničnog mesa mogu se izdvojiti održivost proizvodnje, dobrobit životinja i naposljetku zdravstvenu ispravnost mesa kao konačnog proizvoda (Post i sur., 2020.).

Općenito proces proizvodnje mesa iz matičnih stanica se svodi na uzgajanje tkiva van tijela životinje u *in vitro* uvjetima. U sterilnim uvjetima na ovaj se način kontrolira mišićno tkivo te regulira prema potrebama tržišta. Stanično meso je potrebno odvojiti od raznih drugih mesnih supstituta kao što su biljno bazirani burgeri, jer je ono proizvod koje gotovo u svim aspektima najviše sličí tradicionalno proizvedenom mesu. Zbog visoke cijene proizvodnje i trenutne nemogućnosti proizvodnje u velikim količinama ovaj proizvod još nije komercijalno dostupno na tržištu.

Obzirom na navedeno, cilj ovoga diplomskog rada bio je definirati meso dobiveno iz matičnih stanica, način njegove proizvodnje u *in vitro* uvjetima te izazove i mogućnosti ovakve proizvodnje mesa, kao i utjecaj iste na budućnost stočarstva i mesne industrije.

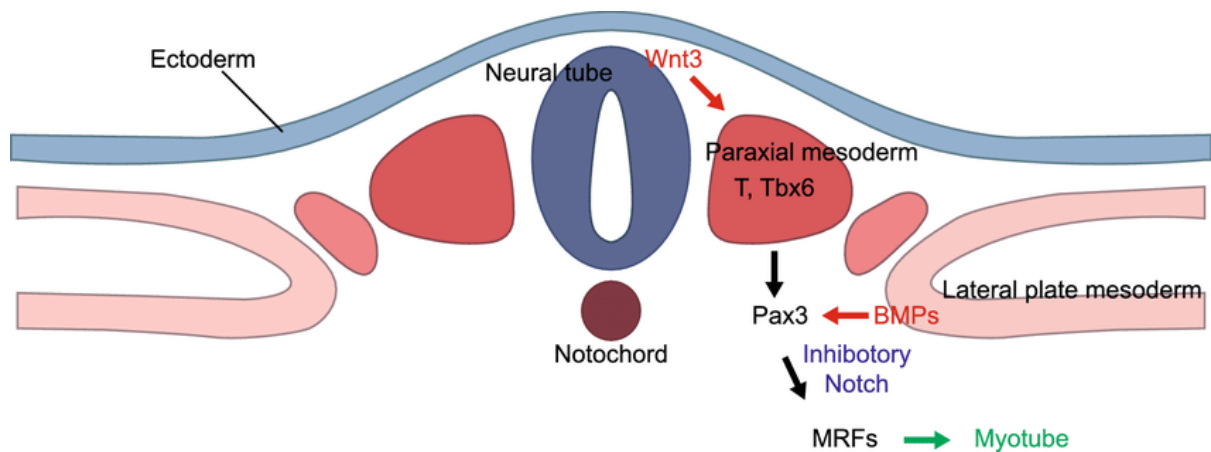
2. MATIČNE STANICE MIŠIĆNOG TKIVA – definicija i razvoj

U posljednja dva desetljeća selekcija, identifikacija, te modifikacija matičnih stanica u razvoju mesa proizvedenog iz matičnih stanica značajno su napredovale. Matične stanice imaju sposobnost zadržavanja u nediferenciranom obliku koje se mogu razviti u različite vrste specijaliziranih stanica (Arshad i sur., 2017.).

Fetalna faza razvoja mišića predstavlja ključnu fazu u rastu i proliferaciji jer se broj mišićnih vlakana ne mijenja nakon rođenja (Zhu i sur., 2004.). Stoga se postnatalni mišić zapravo razvija povećanjem veličine mišićnih vlakana (Karunaratne i sur., 2005.).

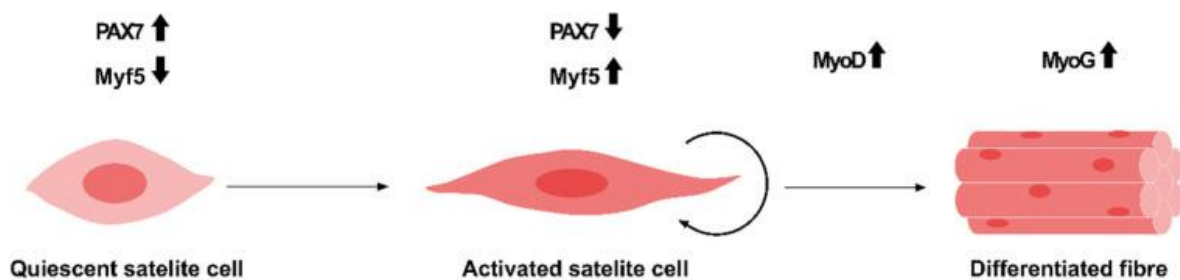
Matične stanice mišićnog tkiva (tzv. satelitske stanice), uključujući i neaktivne odnosno mitotski mirne matične stanice koje nakon aktivacije prelaze u mononuklearne mišićne prekursorne stanice ili mioblaste, su prekursori odgovorni za regeneraciju mišićnog tkiva (Le Grand, 2007.). Mišićno tkivo potječe iz paraksijalnih mezodermalnih progenitornih stanica tijekom fetalnog razvoja. Glavne satelitske stanice diferenciraju se u miogenu staničnu liniju, ali se mala populacija satelitskih stanica također može diferencirati u fibroblaste ili adipocite, koji čine tkivo skeletnih mišića (Rubin, 2019.). Paraksijalni mezoderm diferencira se u mioblaste kroz sekvencijalni razvojni proces reguliran s nekoliko čimbenika rasta (Chal i Pourquie, 2017.). Mioblasti stvaraju mišićno tkivo fuzijom stanica na stanicu, a dio njih se nalazi ispod bazalne lamele mišićnih vlakana i pretvaraju se u inaktivne satelitske stanice tijekom postnatalnog razdoblja. Nakon ozljede mišića, inaktivne satelitske stanice se aktiviraju, te se diferenciraju u mioblaste i pridonose regeneraciji mišića.

Za rast skeletnih mišića i njihovu strukturnost važni su kontrola dodataka hranjivim tvarima i nekoliko signalnih čimbenika. Rast skeletnih mišića pojačava se aktivacijom Wnt signalizacije, dok ona inhibira adipogenezu (Ding i sur., 2018.). β -katenin, koji je stabiliziran Wnt signalizacijom, pozitivno regulira miogene gene kao što su Pax3, MyoD i Myf5 (Ridgeway i Skerjanc, 2001.).



Slika 1. Formiranje skeletnog mišića iz paraksijalnog mezoderma tijekom ljudskog embrionalnog razvoja (Lim i sur., 2021.).

Inaktivne satelitske stanice definirane su ekspresijom transkripcijskog faktora Pax7 (engl. paired box 7) koji se stoga koristi i kao njihov marker (Kuang i sur., 2007.). Ozljeda mišića uzrokuje aktivaciju miogene satelitske stanice putem regulacije Myf5 i MyoD, te regulacije Pax7, čime se te stanice pretvaraju u proliferirajuće mioblaste. Pri tome Myf5 i MyoD imaju recipročnu ulogu u proliferaciji i diferencijaciji mioblasta (Gayraud - Morel i sur., 2007.). Mišićne matične stanice također su definirane površinskim i citoskeletnim proteinima, koji stupaju u interakciju s nizom matičnih stanica, poput adhezijskih molekula vaskularnih stanica (VCAM) i neuronskih stanica (NCAM, također poznate kao CD56), integrina $\alpha 7$ i $\beta 1$ (također poznat kao CD29), CD34, SM/C - 2.6 i desmina (Wang, Dumont, i Rudnicki, 2014.).



Slika 2. Put miogene diferencijacije mišićnih satelitskih stanica s ekspresirajućim markerima.

(Inaktivne satelitske stanice izražavaju Pax7 dok je miogeni faktor (Myf 5) smanjen. U procesu razvoja u mioblast i mišićno vlakno, satelitske stanice se proliferiraju i diferenciraju. Povećanje ekspresije MyoD i MyoG faktora rasta dolazi do stvaranja diferenciranog vlakna; Hong i sur., 2021.).

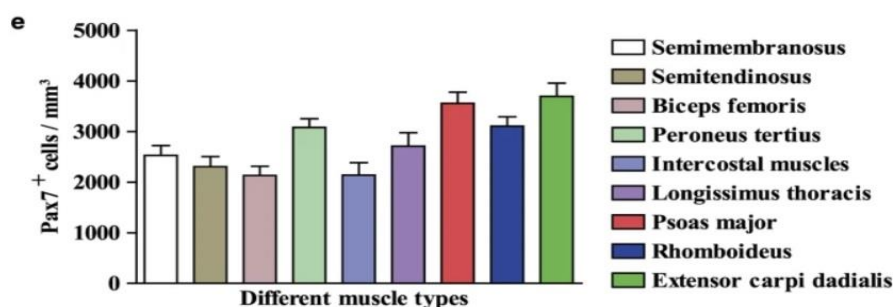
Drugim riječima, sklad vanjskih i unutarnjih faktora regulira sudbinu mišićnih matičnih stanica. Stoga, da bi se mišićne matične stanice u izoliranim uvjetima održale i nastavile svoju proliferaciju i razvoj *in vitro* potrebno je osigurati jednake uvjete kao i u uvjetima *in vivo*, a to uključuje i izvanstanični matriks (eng. ECM) i parakrine čimbenike.

3. IZOLACIJA MIŠIĆNIH MATIČNIH STANICA IZ TKIVA ŽIVOTINJE

3.1. Čimbenici koji utječu na rast mišićnih stanica

Mišićne matične stanice mogu se izolirati biopsijom mišića iz usmrćenih životinja. Kako se količina izolirane mišićne matične stanice mijenja u uvjetima životinje donora, za učinkovitiju izolaciju satelitskih stanica prije samog odabira donora potrebno je uzeti u obzir i nekoliko čimbenika. Naime, u raznim vrstama je dokazano da također i starost životinja te položaj mišića utječu na broj dobivenih mišićnih stanica (Choi i sur., 2020.).

Satelitske stanice čine oko 30-35% ukupnih jezgri mišićnih vlakana pri rođenju, no njihov se broj dramatično smanjuje starenjem, te u odraslih životinja čini samo 2-5% jezgri (Motohashi i sur., 2014.). Tako su primjerice Gibson i Schulz (1983.) pokazali da su u miševa starosti 1, 12 i 24 mjeseca satelitske stanice brojnije u *m. Soleus* nego u ekstenzoru *Digitorum*. Druga studija pak je pokazala da dijafragma i ekstraokularni mišići imaju više matičnih stanica nego mišići *Soleusa* (Keefe i sur., 2015.). Kod svinja je između devet istraživanih mišića (*Semimembranosus*, *Semitendinosus*, *Biceps femoris*, *Peroneus tertius*, *Intercostal*, *Longissimus thoracis*, *Psoas major*, *Romboid* i ekstenzor *Carpi radialis*) najveći broj mišićnih matičnih stanica pozitivnih na Pax7 otkriveno u *Psoas major* i ekstenzoru *Carpi radialis* (Ding i sur., 2017.)



Slika. 3. Prikaz kvantifikacije broja satelitskih stanica u različitim dijelovima skeletnih mišića (Ding i sur., 2017.)

Također, satelitske stanice izolirane iz različitih mišića pokazale su i različite potencijale diferencijacije i svojstva proliferacije. Satelitske stanice dobivene iz dijafragme imaju nižu stopu proliferacije i veću miogenu sposobnost od onih koje potječu iz *m. Semimembranosus* kod svinja (Redshaw i sur., 2010.). Isto tako je utvrđeno da genetsko svojstvo poznato kao "dvostruka mišićavost", uzrokovano mutacijom miostatina Gdf8, može utjecati na svojstva proliferacije, ali ne i na miogeni potencijal mišićnih matičnih stanica. Naime, fetalni mioblasti goveda s karakteristikama „dvostruke mišićavosti“ zadržavaju svoje nediferencirano stanje dulje i imaju povećanu stopu proliferacije u usporedbi s onima divljeg tipa goveda (Quinni sur., 1990.). Nakon rasta mišića tijekom postnatalnog razvoja, ukupni broj mišićnih matičnih stanica raste dok se njihov udio smanjuje. To potvrđuju i istraživanja Champion i sur. (1982.) koji navode da se u *m. semimembranosus* u japanske prepelice nakon izlijeganja apsolutni broj satelitskih stanica povećavao, dok se njihov udio smanjio. Kod miševa se apsolutni broj satelitskih stanica povećavao do 12 mjeseci, a zatim se smanjivao do 24 mjeseca u mišiću *Soleus*, te se u ekstenzoru *Digitorum longus* sa starenjem postupno smanjivao (Gibson i Schultz, 1983.). Nadalje, Champion i sur. (1981.) su pokazali da se u organizmu svinje broj satelitskih stanica povećava do 32. tjedna starosti, dok se postupno smanjuje tijekom postnatalnog rasta u mišićima *Peroneus longus* i *Sartorius*. Također, starenjem se proliferacijski potencijal satelitskih stanica smanjivao i u *Gastrocnemius* mišiću štakora (Chakravarthy i sur., 2000.).

Spol životinja je još jedan čimbenik koji ima važan utjecaj na rast matičnih stanica mišića. Spolni hormoni poput estrogena i testosterona utječu na njihov rast. U mišićima *Triceps brachii* pojedinih primitivnih vrsta svinja broj satelitskih stanica značajno se smanjio nakon kastracije u usporedbi s njihovim brojem u nekastriranih svinja, a na ovaj poremećeni rast moguće je reverzibilno djelovati primjenom testosteron propionata (Mulvaney i sur., 1988.). Studija izvedena na miševima pokazala je da mužjaci imaju više satelitskih stanica po miofibrilu nego ženke, gdje se starenjem u istom spolu dramatičnije smanjuje broj satelitskih stanica po miofibrilu u odnosu na ženski spol (Day i sur., 2010.). Istraživanja Neal i sur. (2012.) na štakorima su pokazala da su proliferirajuće satelitske stanice bile prisutnije u odraslih mužjaka miševa nego u ženki, dok su satelitske stanice u mirovanju bile prisutne u sličnom rasponu. Štoviše, spolni hormoni imaju ključnu ulogu u uspostavljanju populacije matičnih stanica u mirovanju aktivacijom nodalnog inducirano puta Mib1 (Kim i sur., 2016.). Tako na primjer kod ljudi postmenopauzalni gubitak estrogena uzrokuje apoptozu i gubitak satelitskih stanica, izazivajući time oslabljenu regeneraciju mišića kod starijih žena (Collins i sur., 2019.).

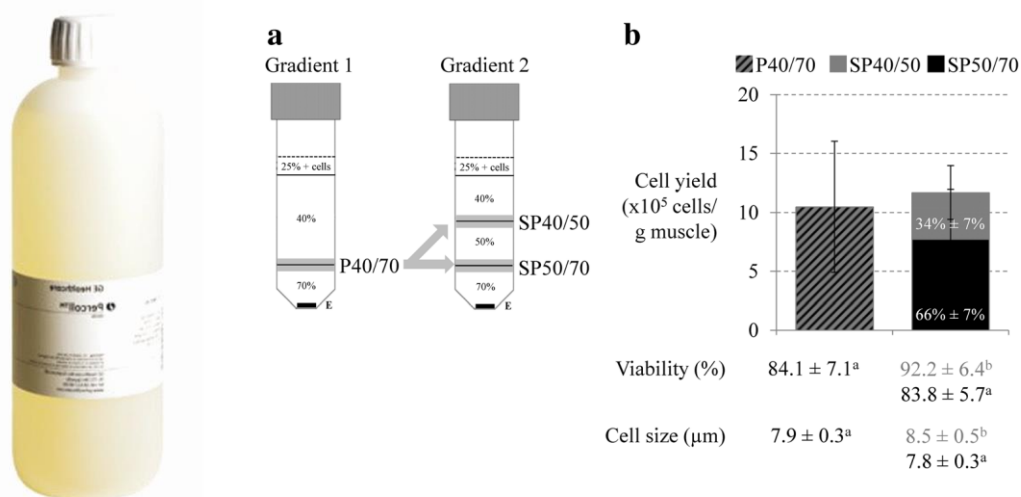
3.2 Disocijacija mišićnog tkiva

Skeletni mišići se sastoje od mišićnih vlakana, vezivnog tkiva i stromalnih stanica, kao i različitih populacija matičnih stanica. Kako se mišićne matične stanice nalaze na mišićnim vlaknima, od ključne je važnosti učinkovito odvojiti te stanice od mišićnog tkiva radi njihove izolacije. Općenito, za pročišćavanje mišićnih matičnih stanica nakon fizičke disocijacije koriste se proteaze kao što su tripsin, pronaza, dispaza i kolagenaza. Također, za razdvajanje mišićnog tkiva postoji i mogućnost primjene nekoliko enzima u više kombinacija. Konkretno, kolagenaza i dispaza se naširoko koriste jer navodno ciljaju na izvanstaničnu matricu uključujući fibronektin i kolagen (Stenn i sur., 1989.). Nakon enzimske disocijacije, fragmente vlakana, krhotine tkiva i vezivno tkivo treba odvojiti od disociranih stanica koje sadrže mišićne stanice radi učinkovitog naknadnog procesa razvrstavanja. Standardni pristupi za izolaciju mononuklearne stanične populacije koja sadrži matične stanice mišića na temelju razlika u veličini i težini su filtriranje i diferencijalno centrifugiranje. Općenito, disocirana tkiva se filtriraju kroz cjedilo za stanice ili najlonsku mrežu s porama od 20 do 40 μm , a zatim se centrifugiraju pri niskoj G - sili od oko 300g kako bi se uklonili ostaci.

3.3 Odvajanje mišićnih matičnih stanica od populacije mononuklearnih stanica

Rezultirajući supernatant diferencijalnog centrifugiranja sadrži različite vrste stanica kao što su somatske stanice, krvne stanice, stromalne stanice i mišićne matične stanice. Stoga je nakon koraka disocijacije važno razvrstati stanice kako bi se dobila visoko pročišćena populacija mišićnih matičnih stanica. Za sortiranje mišićnih matičnih stanica razvijeno je nekoliko metoda na temelju njihovih fizičkih (centrifugiranje s gradijentom gustoće), bioloških (predplantacija i tretman citohalasinom B) i molekularnih značajki (protočna citometrija i magnetski aktivirano sortiranje stanica). Centrifugiranje s gradijentom gustoće, koje slijedi nakon nanošenja i vezanja fibroblasta za površinu obloženu kolagenom, široko je primjenjivana metoda razvrstavanja mišićnih matičnih stanica. Ovo je tehnika za odvajanje stanica na temelju njihove relativne gustoće. Stanice se mogu odvojiti u nekoliko subpopulacija centrifugiranjem pomoću otopine koja se sastoji od gustih podloga kao što su Percoll i Ficoll. Ove podloge stvaraju gradijent gustoće kroz koji uzorak prolazi tijekom centrifugiranja. U istraživanju na štakorima gradijentnim centrifugiranjem pomoću 70, 50, i 35% Percoll slojeva uspješno su se disocirale stanice mišića stražnjih nogu (Bischoff, 1997.). Više od 98% stanica prikupljenih s podloge između gradijenta od 50 i 70% pokazalo je morfologiju i značajke diferencijacije karakteristične za miogene stanice. U istraživanju Perruchot i sur. (2012.) gradijentno je

centrifugiranje primijenjeno i za izolaciju matičnih stanica mišića svinja gdje je približno 95% stanica ispoljilo desmin kao marker mioblasta. Ovi su rezultati pokazali da se visoko pročišćene mišićne matične stanice mogu sortirati gradijentnim centrifugiranjem.

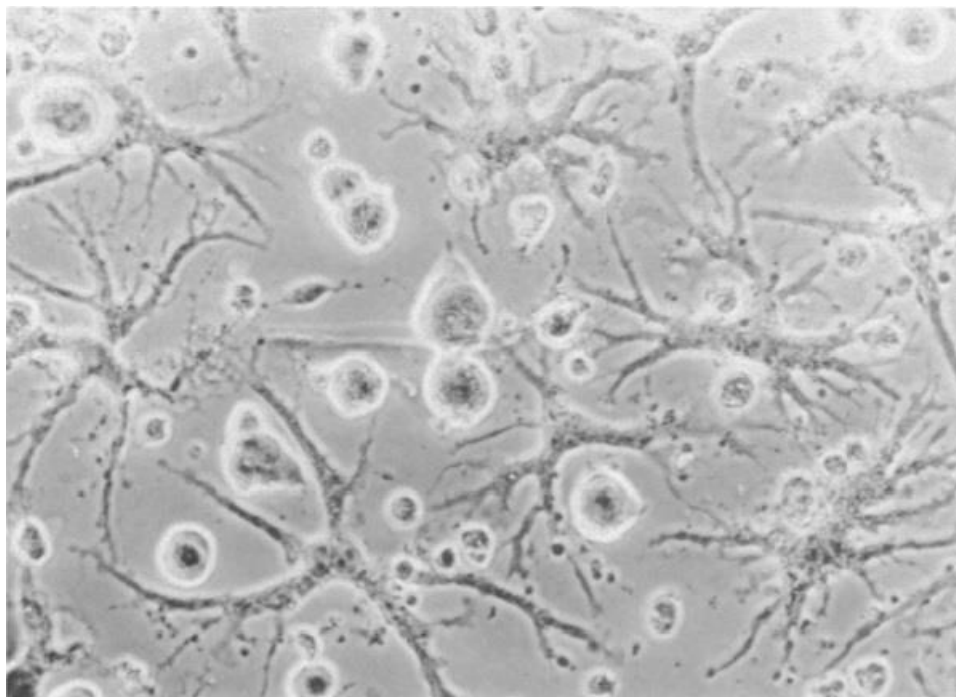


Slika 4. Prikaz Percoll plus otopine za centrifugiranje (Thermo Fisher Scientific, lijevo) te gradijenata i karakteristika mišićnih stanica svinja odmah nakon njihove izolacije (Miersch i sur., 2018., desno)

Tehnika pre - platiranja također je dugo bila široko rasprostranjena tehnika za razdvajanje stanica. Budući da je različitim tipovima stanica potrebno različito vrijeme da se prijanjaju na ploču stanične kulture, obogaćivanje stanica također se može izvesti na temelju ovih bioloških značajki. Za različite stanične tipove disociranog mišićnog tkiva, primjerice mišićne matične stanice, potrebno je više vremena da se prilipe na ploče stanične kulture nego fibroblastima ili epitelnim stanicama. Nakon 40 do 60 minuta od postavljanja stanica na ploču stanične kulture, visoko pročišćena populacija matičnih stanica može se dobiti prikupljanjem supernatanta, jer se većina fibroblasta i epitelnih stanica već veže na ploču kulture (Richer i Yaffe, 1970.). Različite studije su utvrdile da tehnika pre - platiranja ima vrlo visoku učinkovitost ($> 90\%$). Tako je primjerice na temelju ekspresije miogenih markera kao što su integrin α , MyoD i desmin utvrđeno da je čistoća mišjih mioblasta preplatiranjem povećana čak do 98% (Shahini i sur., 2018.).

Drugi način izolacije mioblasta iz fibroblasta je tretman Citohalasinom B. Citohalasin B ometa stvaranje aktinskih niti, čime se inhibira dioba i kretanje stanica. Budući da ovaj spoj inducira

odvajanje miooblata, ali ne i fibroblata, suspendirane miogene stanice mogu se sortirati njihovim sakupljanjem iz medija kulture miooblata (Sanger, 1974.).



Slika 5. Polje arboriziranih i okruglih stanica nakon 2 dana u citohalasinu B (5,4 g/ml). Može se primijetiti da se okrugle stanice skupljaju. (Sanger, 1974.).

Profil stanične ekspresije gena ovisi o funkciji i tipu stanice. Marker ekspresije gena definirani su kao geni ili proteini koji su visoko izraženi u specifičnim vrstama stanica u usporedbi s ostalima. Ove su molekule specifične za određene tipove stanica, što omogućuje staničnu identifikaciju i specifično sortiranje stanica pomoću fluorescentno konjugiranih antitijela protiv ovih protein markera. Stanice vezane za protutijela mogu se odabrati pomoću fluorescentno aktiviranog sortiranja stanica (eng. FACS - fluorescence activated cell sorting) i magnetski aktiviranog sortiranja stanica (eng. MACS - magnetic-activated cell sorting).

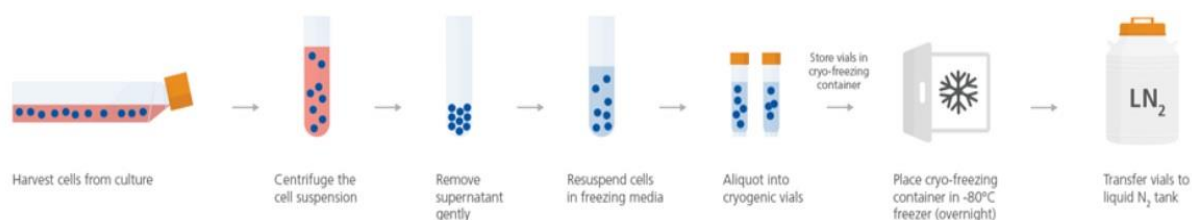
FACS predstavlja metodu sortiranja stanica temeljenu na protočnoj citometriji. Protočna citometrija omogućuje analizu i izolaciju stanica na temelju njihovih fizičkih značajki (kao što su veličina i granularnost), te ekspresiju markera otkrivanjem fluorescentnih signala. U ranim studijama populacija satelitskih stanica pročišćena je na temelju veličine stanice (pomoću raspršene svjetlosti, eng. FSC - forward scattered light) i složenosti (pomoću bočno raspršene svjetlosti, eng. SSC - side scattered light). Podaci protočne citometrije pokazali su da bi dvije različite populacije mogle biti otkrivene među disociranim stanicama ljudskog mišića i da je

98% populacije malih stanica s nižim razinama FSC i SSC identificirano kao miogene stanice (Baroffio i sur., 1993.; 1996.).

MACS je metoda razvrstavanja stanica koja se temelji na interakciji antigen - antitijelo, pa se za ovaj pristup mogu primijeniti slični markeri kao i za FACS. Za razliku od FACS, MACS zahtijeva korištenje magnetskih antitijela konjugiranih mikro kuglicama umjesto fluorescentnih antitijela. Stanice označene mikro kuglicama mogu se onda uhvatiti pomoću jakog magneta.

3.4 Krioprezervacija mišićnih matičnih stanica

Krioprezervacija predstavlja postupak zamrzavanja pripravka korištenjem uređaja i tehnika s ciljem produženja vijeka trajanja pripravka («Narodne novine» 177/04). Kako se u *in vitro* kulturi mišićne matične stanice samoobnavljaju i miogeni kapacitet postupno smanjuje, za održavanje ovih svojstava potrebna je banka stanica temeljena na krioprezervaciji. Razvrstane mišićne matične stanice ili odvojene stanice iz mišićnog tkiva mogu se pohraniti do upotrebe bez gubitka svojstava i uzgajati u *in vitro* uvjetima i nakon odmrzavanja. Za krioprezervaciju stanica ključno je smanjiti količinu vode zbog kristalizacije u mediju i citosolu tijekom procesa zamrzavanja. Danas postoji nekoliko metoda zamrzavanja pomoću medija koji sadrže krioprotektore, poput dimetil sulfoksida, etilen glikola i saharoze.



Slika 6. Prikaz protokola za krioprezervaciju (<https://www.stemcell.com/cryopreservation-basics-protocols-and-best-practices-for-freezing-cells>)

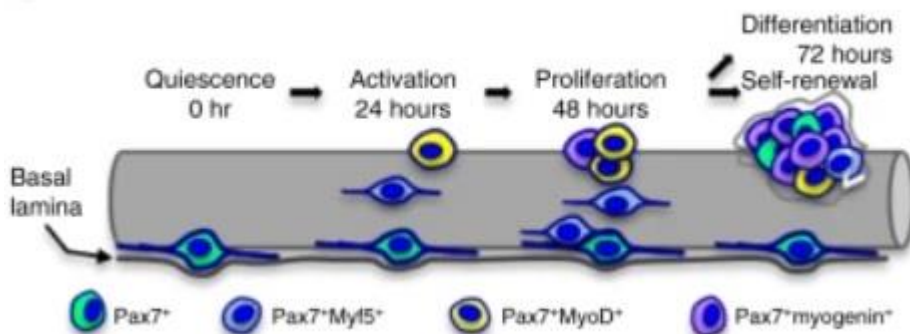
Generalno, metoda sporog zamrzavanja se uglavnom koristi za skladištenje mišićnih matičnih stanica. Tijekom sporog zamrzavanja stanice u fetalnom goveđem serumu (eng. Fetal Bovine Serum, FBS) i mediji koji sadrže krioprotektore postupno se zamrzavaju brzinom od 1°C /min, čime se smanjuje stanično oštećenje minimiziranjem kristalizacije vode (Freshney, 2015.). Nakon odmrzavanja satelitskih stanica štakora i svinja zamrznutih pomoću medija koji sadrži 20% FBS i 10% DMSO (hrv. dimetilsulfidoksid) nisu uočeni štetni učinci na vitalnost stanica i miogeni potencijal (Chakravarthy i sur., 2000.).

4. UZGOJ MIŠIĆNIH MATIČNIH STANICA

Kultura mišićnih matičnih stanica može biti dobivena oponašanjem mikrookruženja matičnih stanica s izvanstaničnom matricom (eng. ECM - extracellular matrix), signalnim molekulama (hormoni i citokini), metabolitima, te fizičkim okruženjem koje uključuje temperaturu, pH i vlažnost. Ove komponente okružuju mišićne matične stanice, te se rekapituliraju *in vitro* pomoću sintetičkih kemikalija i umjetnih naprava.

4.1 Stanične podloge

Osnovna uloga staničnih supstrata je osiguravanje prijanjajuće površine za stanice, što utječe na proliferaciju, održivost i starenje stanica u matičnim stanicama posredovane kadherinom i i integrinskim receptorima (Guilak i sur., 2009.). Matičnim mišićnim stanicama *in vivo* fizičko okruženje, a ovo se također primjenjuje i za *in vitro* staničnu kulturu, čini nekoliko izvanstaničnih proteina, poput fibronektina, laminina i kolagena (Yin i sur., 2013.). Studije *in vivo* su pokazale da prekomjerna ekspresija fibronektina potiče ekspanziju stanica satelita, dok njegova smanjena regulacija izaziva oslabljenu repopulaciju niše satelitskih stanica (Bentzinger i sur., 2013.). Utvrđeno je da fibronektin aktivira signalizaciju Wnt7a proteina kroz receptorski kompleks sastavljen od Syndecan - 4 (Sdc4) i Frizzled - 7 (Fzd7), čime se regulira sposobnost proliferacije satelitskih stanica. Štoviše, pokazalo se da se ekspresija fibronektina postupno smanjuje sa starenjem u skeletnim mišićima, što dovodi do gubitka mišićnih matičnih stanica inaktivacijom signalnog puta integrina posredovanog p38 (Lukjanenko i sur., 2016.). Kolagen također igra ključnu ulogu u samoobnovi i diferencijaciji mišićnih matičnih stanica. Tako primjerice kolagen tipa IV izaziva smanjenje kapaciteta regeneracije satelitskih stanica nakon ozljede mišića kod miševa (Urciuolo i sur., 2013.). Ozljeda mišića izaziva povećanje ekspresije članova obitelji laminina u mišićima, što dovodi do promicanja samoobnove satelitskih stanica (Rayagiri i sur., 2018.).



Slika 7. Shematski prikaz sustava kulture mišićnog vlakna koji prikazuje sekvencijalnu aktivaciju (plava), proliferaciju (žuta), samoobnavljanje (zelena) i diferencijaciju (ljubičasta) satelitskih stanica (Rayagiri i sur., 2018.).

Mišićne matične stanice uzgojene na ECM pločama obloženim proteinima pokazuju poboljšane sposobnosti proliferacije i diferencijacije. Doumit i sur. (1992.) su potvrdili veću stopu proliferacije i diferencijacije kada su koristili četiri supstrata uključujući primaria BD (Becton Dickinson), fibronektin, kolagen tipa III i želatinu za uzgoj satelitskih stanica svinja na pločama obloženim želatinom.

Osim pojedinačnih ECM molekula za ekspanziju matičnih stanica mišića *in vitro* naširoko se primjenjuje i mješavina ECM komponenti, poznata još i kao Matrigel, koju izlučuju stanice sarkoma miša Engelbreth - Holm - Swarm (EHS). Matrigel oponaša *in vivo* stanično mikrokruženje (nišu) zbog svojih specifičnih komponenti kao što su laminin, kolagen tipa IV, entaktin i faktori rasta u tragovima (Vukicevic i sur., 1992.). Štoviše, istraživanja Wang i sur. (2014.) su pokazala da se matičnost (od eng. "stemness") mišjih miogenih progenitornih stanica može održavati duže vrijeme na posudama obloženim Matrigelom. U usporedbi s drugim supstratima Matrigel je olakšao ekspresiju integrina i Wnt signalne puteve, te povećao sposobnosti proliferacije i diferencijacije u matičnim stanicama svinjskih mišića (Wilschut i sur., 2010.).

4.2 Bazalni mediji

Medij za rast stanica općenito sadrži bazalne medije, serum ili zamjene u serumu, te stanične signalne molekule. Bazalni mediji sastavljeni od osnovnih elemenata kao što su hranjive tvari (aminokiseline, ugljikohidrati i lipidi), vitamini, anorganske soli i minerali u tragovima koji omogućuju *in vitro* mikrokruženje stanice (Choi i sur., 2020.). Bazalni mediji, baš kao i tjelesne tekućine *in vivo*, sudjeluju u puferiranju pH i osmotskog tlaka kao i u hranjenju stanica *in vitro*.

Kako su za održavanje različitih tipova stanica potrebni različiti metaboliti i komponente, za te su posebne svrhe razvijeni i različiti bazalni mediji, poput GMEM-a za stanice BHK-21 (Stoker i Macpherson, 1961.), F10/F12 hranjivi medij za CHO stanice (Ham, 1965.) ili IMDM za hematopoetske stanice (Guilbert i Iscove, 1976.)

Satelitske stanice svinja pokazale su najveću stopu proliferacije kada su uzgojene s pet medija, uključujući McCoy 5A, Ham F12, DMEM, minimalni esencijalni medij (MEM) i DMEM/F12,

dok je najlošiji miogeni potencijal utvrđen u MEM i McCoy 5A medijima (Doumit i Merkel, 1992.). Rando i Blau (1994.) su utvrdili da je Hamov hranjivi medij F10 selektivno olakšao rast mioblasta miša, dok su fibroblasti nastavili rasti u DMEM, Waymouth i M199 mediju.

4.3 Serum i njegove zamjene

Kao komponenta u mediju za *in vitro* staničnu kulturu eukariotskih stanica obično se koristi serum, budući da se u njemu nalazi mnogo komponenti potrebnih za rast. Najviše korištena vrsta seruma je fetalni goveđi serum, koji je uzet od steonih krava tijekom usmrćivanja. Fetalni goveđi serum (FBS) pruža širok spektar makromolekula, proteina nosača za lipidne tvari i elemente u tragovima, čimbenike vezivanja i širenja, hranjive tvari, hormone i faktore rasta (Jochems i sur., 2002.). Stoga se naširoko koristi kao dodatak mediju stanične kulture. U uzgoju matičnih stanica mišića također se široko primjenjuje i serum konja (eng. Horse Serum). Dokazano je da je rast mišićnih matičnih stanica olakšan, a spontana miogena diferencijacija potisnuta kada se stanice uzgajaju u visokoj serumskoj koncentraciji. Satelitske stanice svinja pokazale su najveći proliferacijski i miogeni potencijal u medijima koji sadrže FBS kada su uzgojene s četiri različita seruma i to FBS, konjski serum, svinjski i janjeći serum (Doumit i Merkel., 1992.). Svojstvo matičnosti stanice se značajno povećala na način ovisan o dozi u tim uvjetima.

Nadalje, Shanini i sur. (2018.) su izvijestili da medij s visokim sadržajem seruma s 20% FBS-a i 10% konjskog seruma potiče isključivo proliferaciju mišićnih matičnih stanica miša u usporedbi s onom nemiogenih stanica, posebno fibroblasta. Zbog velikih varijacija u sastavu donora životinja, za dobivanje dosljednih eksperimentalnih rezultata koriste se i nadomjesci seruma (eng. Knockout serum replacements) i dodaci N2/B27. Međutim, mediji bez seruma i dalje imaju slabije učinke na ekspanziju mioblasta u usporedbi s medijima koji sadrže serum, što ukazuje na potrebu daljnjih istraživanja kako bi se riješio problem zamjene seruma kulture mišićnih matičnih stanica (Kolkman i sur., 2020.).

4.3.1 Molekule stanične signalizacije

Hormoni i čimbenici rasta, kao i hranjive tvari, neophodni su za rast i održavanje *in vitro* uzgojenih stanica. Izlučuju se iz endokrinih organa okolnih stromalnih stanica, te se vežu na receptore u staničnoj membrani ili citoplazmi kako bi aktivirali signalne puteve uključene u rast i diferencijaciju stanica (Choi i sur., 2020.). Uočeno je da *in vitro* uzgojene mišićne matične

stanice postupno gube svoju svojstva zbog nedostataka signalnih molekula (Machida i sur., 2004.).

4.3.2 Faktori rasta fibroblasta (FGF2 ili FGF)

FGF2 se najviše koristi za *in vitro* uzgojene mišićne matične stanice. FGF2 proizvode stromalne stanice (poput fibroblasta), parakrino, a ne proliferacijom satelitskih stanica na autokrini način, koji ima trofički učinak na mioblaste *in vivo* (Groux-Muscatelli i sur., 1990.). Proteoglikani heparan sulfata u staničnoj membrani potrebni su za vezanje FGF2 na njihove receptore te blokiranje heparan sulfata koji uzrokuje diferencijaciju mioblasta (Rapraeger i sur., 1991.). Nadalje, istraživanja su pokazala da korištenje FGF-a povećava stopu rasta govedih mioblasta kroz inhibiciju miogene diferencijacije (Gospodarowicz., 1976.), dok je istraživanje Rando i Blau (1994.) pokazalo da je među različitim faktorima rasta (FGF-1, FGF-2, PDGF-AA, PDGF-BB, IGF-1, IGF2, EGF I LIF) korištenje FGF-2 stimuliralo rast mišićnih mioblasta za više od 25%. Nakon što se FGF-2 povuče iz *in vitro* kulture, spontana diferencijacija mioblasta se značajno povećava (Shahini i sur., 2018.).

4.3.3. Inhibitori signalizacije P38

P38 signalni put ima ključnu ulogu u diferencijaciji i proliferaciji mišićnih matičnih stanica *in vivo*. Uslijed ozljede mišića, aktivacija inhibitora p38 izaziva samoobnavljanje i diferencijaciju satelitskih stanica izlaskom iz mirovanja, dok podskup satelitskih stanica ostaje u stanju mirovanja potiskujući inhibitor p38 (Troy i sur., 2012.). Genetska ablacija inhibitora p38 dovodi do poremećaja rasta zbog odgođene diferencijacije satelitskih stanica tijekom postnatalnog razvoja (Brien i sur., 2013.). Slično rezultatima *in vivo*, korištenje kultiviranih govedih satelitskih stanica inhibitorom p38 SB203580 sprječava smanjenje aktivnosti PAX7 i omogućuje produženo održavanje njihove sposobnosti diferencijacije (Ding i sur., 2018.). Kada su transplantirane, *in vitro* uzgojene satelitske stanice tretirane s SB203580 pokazuju veću učestalost stvaranja himernih mišića i engraftmenta u usporedbi s netretiranim stanicama (Charville., 2015.). Nadalje, dokazano je da je signalizacija inhibitora p38 uključena u degeneraciju mišićnog tkiva povezanog sa starenjem. Starenjem se inhibitor p38 pojačano regulira kod miševa, čime se smanjuje kapacitet samoobnavljanja satelitskih stanica dok inhibicija signalizacije stanica malim molekulama, poput SB203580 i BIRB796, oporavlja satelitske stanice od defekata povezanih s dobi (Bernet i sur., 2014.). Potiskivanje inhibitora p38 poboljšava starenje satelitskih stanica vraćanjem njihovog miogenog potencijala prilikom transplantacije (Cosgrove i sur., 2014.).

4.3.4. Inzulin i inzulinu sličan faktor rasta 1 (IGF-1)

Inzulin je hormon čija je uloga poticanje preživljavanja i samoobnavljanja matičnih stanica uzgojenih *in vitro* (Godoy-Parejo i sur., 2019.). Dodson i sur. (1985.) su pokazali da korištenje IGF-1, IGF-2 i inzulina pospješuje rast satelitskih stanica te suplementacija inzulinom, zajedno s IGF-2, ali ne i s IGF-1, ima aditivni učinak na njihov potencijal samoobnavljanja. Povećana razina IGF-1 u satelitskim stanicama dovodi do njihovog brzog širenja tijekom regeneracije skeletnih mišića što ukazuje na njihovu trofičku ulogu u mišićnim matičnim stanicama (Jennische i sur., 1987). Slično IGF-1, IGF-2 povećava proliferaciju kultiviranih mioblasta i smanjuje njihovu diferencijaciju (Florini i sur., 1984.). Zamjenom inzulina sa serumom održava se sposobnost diferencijacije mioblasta, iako oni gube svoj miogeni potencijal u odsutnosti FBS-a (Mandel i Pearson, 1974.).

Slično inhibiciji signalizacije p38, IGF-1 također obnavlja smanjeni proliferativni potencijal ostarjelih satelitskih stanica izoliranih od miševa starih 30 mjeseci (Chakravarthy i sur., 2000.).

4.3.5. Wnt signalni putevi (eng. Wntless Int-1)

Le Grand i sur. (2009.) su otkrili da satelitske stanice koje su u stanju mirovanja tijekom regeneracije mišića visoko izražavaju Wnt7a i njegov receptor. Wnt7a povećava broj satelitskih stanica promicanjem simetrične diobe stanica, ali ne utječe na diferencijaciju i proliferaciju mioblasta. Osim toga, Wnt signalizacija se može aktivirati vezanjem izvanstaničnih matrica (ECM) proteina, kao što je fibronektin ili regulacija hipoksije inducirano čimbenika (HIF), čime se potiskuje diferencijacija satelitskih stanica (Majmundar i sur., 2015.).

Wnt signalni putevi se sastoje od kanonskih i nekanonskih puteva. Oba puta u mišićnim matičnim stanicama su koordinirano uključena u regulaciju proliferacije i diferencijacije. Korištenje kanonskog inhibitora Wnt IWR1-endo uzrokuje smanjenu aktivnost proliferacije mioblasta i inhibira fuziju mioblasta tijekom miogene diferencijacije (Suzuki i sur., 2015.).

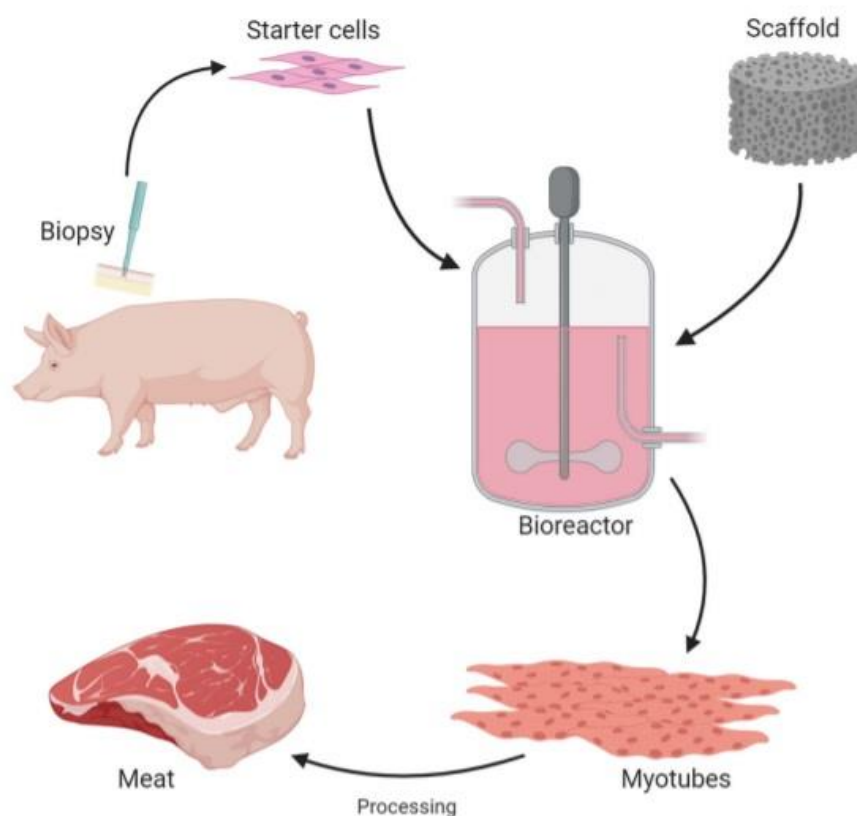
4.3.6 Antibiotici i antimikotici

Tijekom uzgoja životinjskih stanica, moguća je kontaminacija bakterijama i raznim neželjenim negativnim faktorima. Za sprečavanje moguće kontaminacije koriste se antibiotici i antimikotici. Neki od njih su pencilin, streptomycin, i gentamicin. Međutim, navedeni

antibiotici se trebaju izbjegavati radi negativnih nuspojava nakon udisanja. Dugotrajna izloženost ostacima antibiotika u hrani, čak i u njihovim tragovima, može prouzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme uključujući reakciju preosjetljivosti, reproduktivni poremećaj te pojačano pojavljivanje patogenih mikroorganizama otpornih na antibiotike u ljudima.

5. NOSAČI (eng. Scaffolds)

Nosači su porozne 3D strukture koje funkcioniraju kao predložak za formiranje staničnog tkiva, obično simulirajući ekstracelularni matriks za stanice da se pričvrste, odnosno proliferiraju ili diferenciraju (O'Brien., 2011.). Nosači daju fizičke i biokemijske znakove za prianjanje stanica, razmnožavanje i diferenciranje u potrebne tipove stanica, te im omogućuju prostornu heterogenost u konačnom proizvodu koji će biti nalik prirodnoj strukturi i teksturi mesa (Stephens i sur., 2018.).



Slika 8. Shematski prikaz proizvodnje staničnog mesa.

(Seah i sur., 2021.)

Glavna svrha nosača je olakšavanje razvoja potrebnih mišića, masti i vezivnog tkiva. Svojstva konačnih proizvoda kao što su tekstura ili okus dalje se mogu obraditi trenutnim tehnikama za preradu mesnih proizvoda kao što su pileće pljeskavice, mljevena govedina ili kobasice (King, 2019.). Za stvaranje strukturiranog mesnog proizvoda kao što je odrezak ili file, potreban je pravilan odabir nosača jer upravo oni olakšavaju proliferaciju stanice, diferencijaciju u predodređene tipove stanica, te prostorni raspored koji omogućava nastanak karakterističnog izgleda i teksture mesa.

Tehnike koje se koriste za pravilan odabir nosača uglavnom se temelje na biokompatibilnosti, biorazgradivosti i mehaničkim svojstvima kao što su veličina pora, čvrstoća materijala, arhitektura nosača i proizvodne tehnologije (O'Brien, 2011.). Osnovu arhitekture nosača predstavlja poroznost jer mora dopustiti kontinuiranu perfuziju medija i vaskularizaciju prirodnog tkiva. No važno je napomenuti i ostale važne čimbenike, a to su: sastav, veličina, debljina poroznosti, mehanička svojstva, profil razgradnje i biokompatibilnost. Još jedan važan čimbenik u uzgoju mesa iz matičnih stanica jest i uklanjanje otpada poput degradiranih nosača ili izlučenih metabolita iz bioreaktora.

Nosači se mogu razviti od životinja, biljaka i na sintetički način. Naravno, etika proizvodnje staničnog mesa koja uglavnom nalaže očuvanje okoliša i dobrobit životinja, teži prema sintetičkom načinu proizvodnje nosača. Tako su primjerice Van Elen i sur. (1999.) u svom preglednom radu predložili uzgoj embrionalnih mioblata ili satelitskih stanica odraslih skeletnih mišića na kolagenskim mrežama ili zrcima mikronosača, gdje se medij uzgoja perfundira u stacionarnom ili rotirajućem bioreaktoru. Jednom kada se stanice spoje u miotube i diferenciraju u mišićna vlakna, mogu se skupiti i konzumirati kao mesni proizvod.

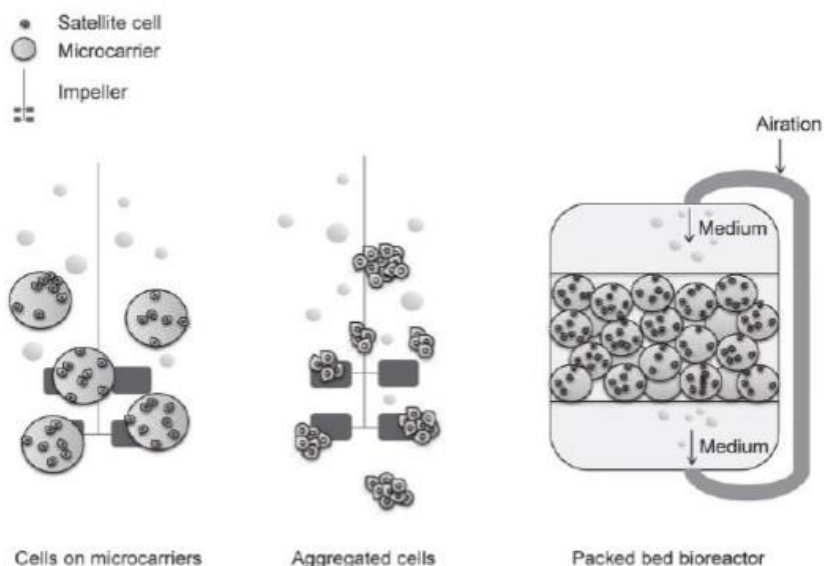
S obzirom na složenost postizanja adekvatne vaskularizacije tkiva, predloženo je nekoliko rješenja koja se mogu primijeniti u proizvodnji mesa iz matičnih stanica. Tako su primjerice rastuće stanice na poroznim pločama koje su složene u 3D nosače poboljšale proliferaciju stanica za opskrbu hranjivim tvarima na svim slojevima (Papenburg i sur., 2009.; Li i sur., 2013.). Porozne ploče također mogu biti dizajnirane tako da se mehanički rastežu kako bi potaknule razvoj u miotubama, te se mogu konzumirati zajedno s mesom ako su sastavljene od jestivog materijala. Inače, porozne ploče su dizajnirane tako da se odvoje od razvijenog mišićnog tkiva, točnije mišićni sloj se može odvojiti od termo osjetljive polimerne ploče s promjenom temperature (Edelman i sur., 2005.). Dobiveni listovi mišićnih stanica mogu se smotati do znatne debljine i obraditi kako bi se dobilo mljeveno meso.

Za visoko strukturirano i organizirano tkivo kao što su odresci, potrebni su visoko vaskularizirani nosači. Edelman i sur. (2005.) su sugerirali da se kolagen ili biokompatibilna polimerna otopina može nanijeti na odljev, kako bi se osigurala platforma koja tvori razgranatu mrežu mikrokanala, koji se potom mogu naslagati jedan na drugi u 3D mrežu. Ovaj pristup, međutim, nije izvediv za visoku skalu proizvodnje, što predstavlja veliki nedostatak. Uzimajući u obzir probleme skalabilnosti proizvodnje, kao potencijalno rješenje predložena je stanična kultura olakšana mikronosačima, zbog velikog omjera površine, volumena i prevalencije u bioproceniranju za skalabilnost. Provjera koncepta za proizvodnju govedine u uzgoju već je provedena korištenjem različitih komercijalnih mikronosača koji su pokazali "prijenos zrna na zrno" stanica koje imaju potencijal u proizvodnji staničnog mesa. Međutim važno je naglasiti kako trenutno još nije komercijaliziran niti jedan prehrambeni ili jestivi mikronosač (Enrione i sur., 2017.). Bodiou i sur. (2020.) predlažu tri dizajna mikronosača za primjenu u staničnom mesu: privremeni mikronosači (uklanjanje mikronosača na kraju procesa), razgradivi mikronosači (koji se razgrađuju u procesu) i jestivi mikronosači koji su dio konačnog proizvoda. Prva dva dizajna uključuju dodatne korake kao što su disocijacija, razgradnja i odvajanje, koji uključuju višestruke tretmane (kemijski, mehanički i toplinski), što proces čini kompliciranim i manje poželjnim. Zaključeno je da najveći potencijal za primjenu ima korištenje jestivih mikronosača, u kojem ne samo da su smanjena ili potpuno eliminirana tri gore navedena naredna koraka, nego čak i pomaže u poboljšanju organoleptičkih karakteristika kada se konzumiraju kao dio konačnog proizvoda.

5.1. Mikronosači

Uzgoj stanica u suspenziji daje veći učinak nego sustavi jednoslojnih kultura, ali prijanjanje na specifičnu površinu kulture ključno je za razmnožavanje stanica ovisnih o sidrenju bez gubitka svojih staničnih svojstava (Grinnell, 1978.). U svrhu masovne kulture stanica ovisnih o sidrenju, mikronosači se koriste za uspostavljanje suspenzijskih kultura (Rafiq i sur., 2013.). Van Wezel je 1967. godine opisao koncept "mikro-nosača" koristeći čestice dekstrana za razvoj velikih staničnih kultura u miješanoj suspenziji. Ove čestice dekstrana su mikro veličine kuglice koje prikazuju pozitivno nabijene površine i privlače životinjske stanice koje sadrže negativno nabijene membrane (Van Wezel, 1967.). Kao mikronosači mogu se koristiti različiti materijali, uključujući dekstran, celulozu, želatinu i plastiku (Stanbury i sur., 2013.). Ti mikronosači mogu biti čvrsti ili porozni, a materijali se mogu odabrati prema namjeni kulture i tipu stanice (Tavassoli i sur., 2018.). Posebno se treba uzeti u obzir usklađenost s hranom u situacijama kada se mikronosači koriste u proizvodnji jestivog mesa. Iako se nekoliko

istraživača usredotočilo na razvoj mikronosača prikladnih za ljudske matične stanice, mikronosači za ekspanziju mioblasta ili za proizvodnju uzgojenog mesa tek se trebaju razviti (Bodiou i sur., 2020.). Proces odvajanja kultiviranih stanica od mikronosača je posljednji korak u kojem se kultivirane stanice koriste za naknadne primjene (Verbruggen i sur., 2018.). Mikronosači izrađeni od materijala koji reagiraju na toplinu mogli bi ovisno o temperaturi promijeniti svoja površinska svojstva i pomaknuti pričvršćene stanice koje bi se naknadno mogle filtrirati (Bodiou i sur., 2020.). Biorazgradivi mikronosači također se široko koriste jer ne zahtijevaju zahtjevne postupke sakupljanja (Lam i sur., 2017.). Različiti jestivi polimeri i hidrogelovi mogu se koristiti kao baze za jestive mikronosače (Ali i Ahmed, 2018.), gdje jestivim mikronosačima možda neće biti potreban korak stanične disocijacije jer je cijela struktura sigurna za ingestiju (Bodiou i sur., 2020.). Miogene satelitske stanice mogu se uzgajati u suspenziji s biorazgradivim ili jestivim mikronosačima (Moritz i sur., 2015.). Nedavno su uzgojene i diferencirane satelitske stanice u sustavima suspenzijskih kultura korištenjem biorazgradivih nosača za razvoj mesa iz matičnih stanica. Ovaj proces zahtijeva da se stanice usidre na površinu nosača, što bi mogli biti osigurano konstrukcijama tkivnog inženjeringa (Post, 2012.).



Slika 9. Prikaz tri moguća sustava velikih razmjera za uzgoj goveđeg mesa. Tri metode koje uključuju stanice na mikronosačima u bioreaktoru s mehaničkim miješalom, agregirane stanice u bioreaktoru s mehaničkim miješalom ili upotreba bioreaktora sa nabijenim slojem. (Moritz i sur., 2015.)

5.2. Uobičajeno korišteni nosači za proizvodnju staničnog mesa

Na temelju podrijetla materijala, nosači se mogu izraditi od prirodnih polimera (životinjskih i biljnih), te od sintetičkih materijala.

5.2.1. Prirodni polimeri

Prirodni polimeri mogu se podijeliti na:

- Proteine (svila, kolagen, želatina, fibrinogen, elastin, keratin, aktin i miozin),
- Polisaharide (celuloza, amiloza, dekstran, hitin i glikozaminoglikani),
- Polinukleotide (DNA, RNA), (Stevens i sur., 2008.).

Prirodni polimeri koji su jestivi se često koriste za proizvodnju mesa iz matičnih stanica, od kojih su nosači na bazi biljnih proteina često privlačni zbog niske cijene, te dodatne nutritivne vrijednosti (Ben-Arye i sur. 2019.; Huang i sur., 2018.).

5.2.2. Polimeri životinjskog podrijetla

Biomaterijali životinjskog podrijetla koriste se u vrlo ograničenom opsegu za razvoj nosača. Međutim, neki od biomaterijala pokazali su izvanredne rezultate u tkivnom inženjeringu. To je primjerice kolagen, koji se često navodi kao standard u uzgoju mesa iz matičnih stanica. Literatura pokazuje da je većina *in vitro* uzgojenih mišića uzgojeno upravo na kolagenskim nosačima (Powel i sur. 2002; Hinds i sur. 2011; Smith i sur. 2012; Vandenburg i sur., 2008.). Nedavno se za razvoj analoga mesa (hrana napravljena od vegetarijanskih sastojaka), koristila želatina koja se također smatra prirodnom komponentom mesa koja nastaje denaturacijom kolagena tijekom obrade i kuhanja (MacQueen i sur., 2019.).

Fibrin, prirodni vlaknasti protein koji stvara krvne ugruške na mjestima ozljede, korišten je za formiranje nosača za optimizaciju vaskularizacije mišića uzgojenih *in vitro*. Rezultati su pokazali da je fibrinski gel dovoljan za formiranje vaskulariziranih *in vitro* mišića (Gholobova i sur. 2015.; Ahmed i sur. 2008.; Noori i sur. 2017.). U tkivnom inženjeringu se naširoko koristi i hijaluronska kiselina poznata po učinkovitom zacjeljivanju rana i regulaciji ponašanja stanica, kao što su adipogeneza, angiogeneza i organizacija tkiva (Colwell i sur. 2003.; Davidenko i sur., 2010.). Danas se ulažu znatni naponi kako bi se pronašao alternativni izvor hijaluronske kiseline bez uporabe životinja koristeći mikroorganizme bez endotoksina (Sze i sur., 2016.).

Važno je naglasiti ipak da nosači životinjskog podrijetla nisu održivi u cjelokupnom procesu, osim ako nisu proizvedeni umjetno. Čak i ako govorimo o umjetnom načinu, proces proizvodnje ne smije sadržavati toksične ostatke nosača, odnosno polimere životinjskog podrijetla koji mogu biti štetni po ljudsko zdravlje.

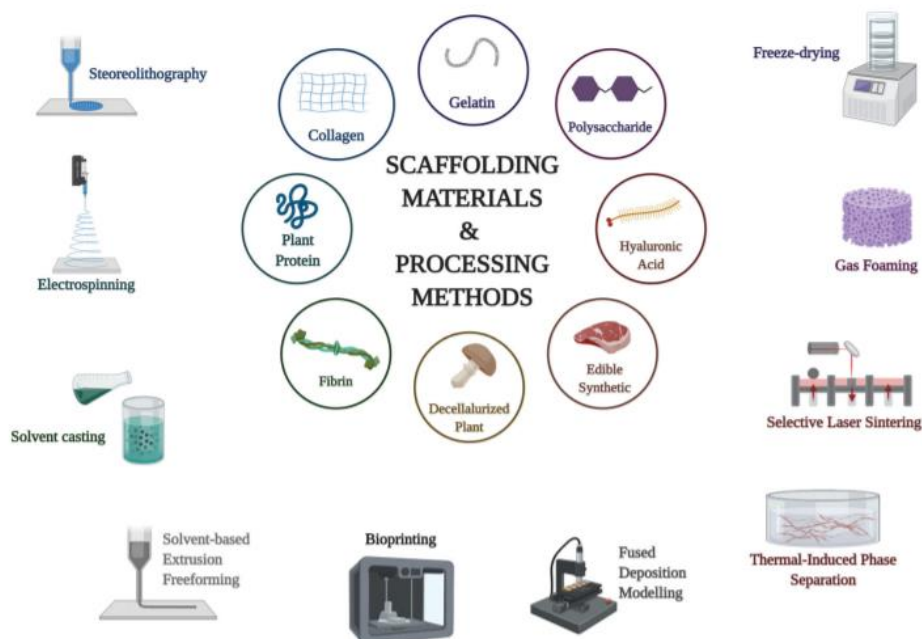
5.3. Tehnike izrade nosača

U procesu projektiranja željenih nosača važno je da arhitekturna, mehanička, biološka i površinska svojstva budu prikladna za pričvršćivanje, širenje, razmnožavanje, diferenciranje i sazrijevanje željenih stanica. Trenutno se koriste različite tehnike obrade, ponekad u kombinaciji, kako bi se optimizirala svojstva nosača za različite primjene (Carletti i sur., 2011.).

Liofilizacija, elektrosprednje (eng. Electrospinning) i 3D ispis su samo neke od tehnika koje se koriste pri obradi nosača. Liofilizacija se obično koristi za proizvodnju poroznih struktura u nosačima (Lv i Feng, 2006.). Prti tome su temperatura, tlak i koncentracija polimera čimbenici koji utječu na veličinu i raspodjelu pora te mehanička svojstva nosača (Zhang i sur. 2005.).

Elektrosprednje je vrlo atraktivna tehnika jer se mogu proizvesti vlaknaste strukture s promjerom vlakana od 10 nm do 1 mikrona (Li i Xia, 2004.). Također se može postići i visoki omjer površine, volumena i modulacija veličine pora kako bi se podržala visoka gustoća stanica, kao i da bi se moglo modulirati ponašanje stanica kako bi se uzgojenom mesu pružila pravilna struktura (Brown i sur 2018.; Das i sur., 2020.).

3D ispis može stvoriti kanalizirane strukture, pružajući oblik perfuzije, a može čak i omogućiti uzgoj kako bi omogućio što vjerniju mimiku strukturiranog mesa (Handral i sur., 2020.).



Slika 10. Dostupni materijali nosača koji se koriste za obradu staničnog mesa.

(Seah i sur., 2021.)

Materijali od kojih su napravljeni nosači bez mjesta za prepoznavanje stanica mogu zahtijevati modifikaciju površine kako bi se poboljšala površinska vlažnost ili osigurale nabijene funkcionalne skupine koje pomažu u interakciji između stanice i materijala poboljšavajući pričvršćivanje ili širenje stanica (Talawi i sur., 2015.). Tako se primjerice obično na pločama koristi obrada plinskom plazmom kako bi se povećala hidrofilitnost i osigurao negativni naboj na njegovoj površini (Lerman i sur., 2018.). Biofunkcionalizacija materijala korištenjem bioaktivnih molekula kao što su RGD (Tripeptid Arg-Gly-Asp) peptid, kolagen i laminin obično se pokrivaju na materijale nosača fizikalnim ili kemijskim metodama radi poboljšanja bioloških svojstava nosača (Talawi i sur., 2015.).

6. BIOREAKTORI

Oko 50% svih komercijalnih biotehnoloških proizvoda koji se danas koriste u dijagnostičke i terapijske svrhe dobiva se pomoću životinjskih stanica (Gaurina Srček i sur., 2016.). Najvažnija uloga sustava za uzgoj stanica je osigurati svojstva staničnog mikro-okoliša koja jamče stanicama uspješan rast i produktivnost. Vođeni ranijim iskustvom s uzgojem mikroba te specifičnim zahtjevima kulture životinjskih stanica, stručnjaci su do danas razvili više vrsta kultivacijskih sustava koji se međusobno razlikuju karakteristikama i primjenom, a radni

volumeni dosežu raspon od 0,025 do 25.000 litara (Warnock i Al-Rubeai., 2006.). Sustavi radnog volumena većeg od jedne litre, konstruirani tako da omogućuju upravljanje postupkom bez kontinuirane primjene tzv. dodatnih jedinica za osiguravanje nekog od uzgojnih parametara (npr. CO₂ inkubatori, čiste komore, magnetska miješala) zovu se bioreaktori (Gaurina Srček i sur., 2016.).

Razvoj industrijskih bioreaktora za uzgoj životinjskih stanica započinje krajem 50-tih godina prošlog stoljeća za potrebe proizvodnje cjepiva;. Tehnologija rekombinantne DNA koja je od 1980-tih temelj suvremene biotehnologije, omogućila je proizvodnju niza terapijskih rekombinantnih proteina i virusnih cjepiva pomoću kulture stanica. Ovakav razvoj tehnologije dao je poticaj u oblikovanju i optimiziranju novih bioprocasa industrijskih mjerila za uzgoj svih tipova stanica i proizvodnju do nekoliko kilograma proteina godišnje sisavaca (Gaurina Srček i sur., 2016.).

Osnovna uloga bioreaktora je osigurati uvjete za rast stanica i biosintezu odgovarajućeg staničnog proizvoda (Gaurina Srček i sur., 2016.). Uvjeti koji su potrebni za staničnu homeostazu uključuju održavanje temperature, pH i osmotskih svojstava medija za uzgoj i kontroliranu dobavu hranjivih tvari i kisika te uklanjanje proizvoda metabolizma. Nadalje, potrebno je održavati i monoseptične uvjete uzgoja, kako bi se izbjegle moguće kontaminacije mikroorganizmima, virusima ili drugim stanicama. Životinjske stanice u kulturi mogu biti suspenzijske i adherentne. Korištenje suspenzijskih stanica olakšava nadzor i vođenje uzgoja. Razlog tomu je što je većina komercijalno dostupnih terapijskih rekombinantnih proteina proizvedena upravo u suspenzijskoj kulturi. Kod adherentnih staničnih kultura broj stanica ovisi o raspoloživosti površine na kojoj stanice mogu rasti. Pri tome treba obratiti pozornost da se kultura održava do pojave konfluentnosti ili potpune prekrivenosti površine stanicama. Prosječna gustoća je oko 10^5 stanica/cm², ali ona prije svega ovisi o vrsti stanica. Za rast adherentnih staničnih kultura u bioreaktorima preporučuje se imobilizacija stanica na mikronosačima kojima se postupak uzgoja prevodi u tzv. pseudosuspenzijski oblik i time tehnološki olakšava izvedbu procesa. Vrlo poželjno svojstvo bioreaktora je kapacitet povećanja mjerila proizvodnje unutar jedne bioreaktorske jedinice (Gaurina Srček i sur., 2016.).

6.1. Važnost mikrokruženja u bioreaktoru

Jedan od glavnih ciljeva bioreaktora je stvaranje jedinstvenog mikrokruženja koje je ugroženo fizičkim povećanjem bioreaktora, budući da se nehomogenost staničnog medija povećava (Oosterhuis, 2017.). Još jedan izazov rada s bioreaktorima velikog volumena potrebnim za

povećanje kulture mišićnih stanica je osjetljivost na smicanje. Osjetljivost na smicanje rezultat je mehaničkih sila koje utječu na stanice u bioreaktoru. Ove sile mogu biti destruktivne, ali također mogu modificirati morfologiju, povećati brzinu rasta i promijeniti metaboličku aktivnost stanica (Gooch i Frangos, 1993.). S jedne strane potrebna je određena brzina miješanja za raspodjelu plinova i hranjivih tvari za stanice, dok sa druge strane povećanje brzine mehaničkog miješala rezultira većim naprežanjem uslijed čega dovodi do oštećenja stanica.

U mikrookruženju temperatura također igra jednu od vodećih uloga, pa tako 2015. Freshney određuje optimalnu temperaturu stanične kulture prema sljedećim kriterijima:

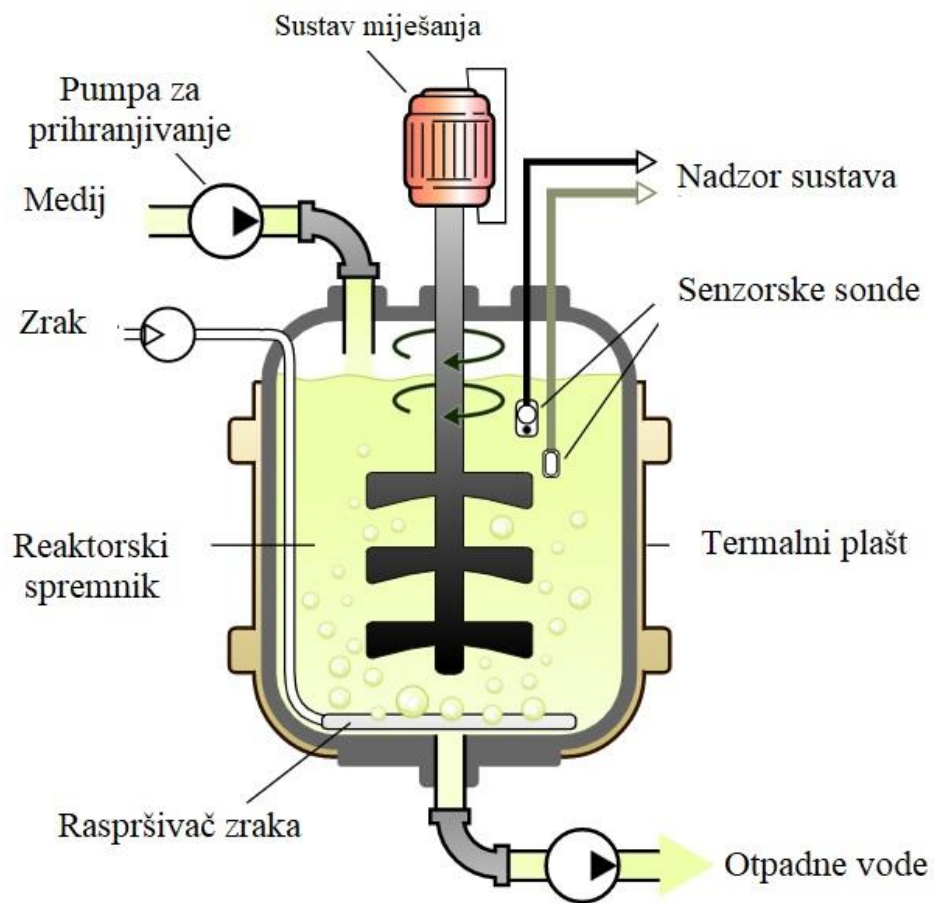
- Tjelesna temperatura stanice donora. Za stanice sisavaca većina linija kulture izvodi se na 37°C. Ptice imaju višu tjelesnu temperaturu pa se linije stanične kulture za peradsko meso trebaju održavati na 38,5°C. Stanične linije hladnokrvnih životinja, poput stanica tune i žabljih krakova podnose širok raspon temperatura (između 15-26°C). U teoriji ova se kultura može držati na sobnoj temperaturi, ali ova praksa nije preporučljiva jer varijabilnost sobne temperature ima negativan učinak.
- Faktor sigurnosti. Potrebno je da je temperatura uglavnom niža jer je pregrijavanje ozbiljan problem. Za stanične linije poikilotermnih životinja preferira se sustav hlađenja kako bi se izbjegla temperaturna varijabilnost.
- Temperatura ima neizravan učinak na rast stanica, budući da utječe na topljivost CO₂, a time posredno i na pH.

Također valja naglasiti da je jedan od glavnih potencijalnih izvora bakterijske kontaminacije upravo neuspjeh u postupcima sterilizacije (Freshney, 2016.). Budući da su troškovi i poteškoće pri sterilizaciji bioreaktora visoki, predlaže se korištenje bioreaktora za jednokratnu uporabu (Oosterhuis, 2017.).

Unutar područja staničnog mesa, popularna analogija je opisati proces velikih razmjera potreban za proizvodnju koji može biti usporediv s primjerice pivskom industrijom kako bi se potrošačima i stručnjacima iz različitih područja najlakše pomoglo vizualizirati proces uzgoja staničnog mesa. Pivovare i većina drugih velikih biotehnoloških procesa temelji se na fermentaciji pomoću prokariota ili jednostavnih eukariota poput kvasca, dok stanično meso zahtijeva složene eukariotske stanice kao što su stanice sisavaca ili riba. Trenutne komercijalne

primjene kulture stanica sisavaca primjenjuju se u industriji rekombinativnih terapijskih proteina kao stanice domaćina (Allan i sur., 2019.).

Terapijska proizvodnja proteina provodi se u velikim bioreaktorima s mehaničkim miješalom zapremine do 20.000L (Kunert i Reinhart., 2016.). Ovo predstavlja dobru paralelu i izvor tehničke stručnosti za proizvodnju staničnog mesa, no stanične linije odobrene za proizvodnju monoklonskih antitijela (eng. mAbs - monoclonal antibody) za humanu terapiju su CHO, NSO i Sp2/0 stanice (Dumont i sur., 2016.) koje su sve uzgojene u suspenziji, bez potrebe za nosačima. Iako su stanice sisavaca osjetljivije na pomicanje u bioreaktoru od prokariota, bioreaktor s mehaničkim miješalom koristi se u terapijskoj industriji proteina s eukariotima. To je moguće zbog upotrebe suspenzijskih staničnih linija, međutim prekursori miocita potrebni za stanično meso ovise o mjestu sidrišta ili učvršćenju i imaju niže granice pomicanja (Hu i sur. 2011.). Ograničenje pri tome predstavljaju hidrodinamičke sile (posmičnih i normalnih naprezanja) koje odvajaju stanicu od površine nosača što rezultira konačnom smrću stanice, dok suspenzijske stanice mogu izdržati veću agitaciju u obliku dodavanja zraka i rotacije impelera (Hu i sur. 2011.). Ovo ograničenje može se prevladati korištenjem staničnih agregata ili sferoida bez nosača (Kumar i Starly., 2015.). Moguće prednosti su potencijal za postizanje visoke gustoće stanica i okruženje kulture. Nedostaci koji uključuju poteškoće u kontroli promjera bioreaktora mogu dovesti do nekrotičnog tkiva i ograničenja prolaza ako su adhezijski proteini oštećeni tijekom disocijacije agregata u jednostaničnom obliku (Kumar i Starly., 2015.).



Slika 11. Shematski prikaz bioreaktora

Izvor: Preuzeto i prilagođeno prema Mrabet (2009.)

7. PRIMJERI UZGOJA SATELITSKIH STANICA U RAZLIČITIH VRSTA DOMAĆIH ŽIVOTINJA

7.1. Pileće meso

Izolacija i uzgoj mišićnih stanica pileta nije nov koncept. Još davne 1983. su Matshuda i sur. opisali izolaciju i diferencijaciju satelitske stanice mišića pileta, dok su 1987. Yablonka - Reuveni i sur. uspjeli dobiti stanice pilećeg prsnog koša diferencirane od satelitskih stanica, izolacijom centrifugiranjem kroz Percoll gradijent gustoće. Satelitske stanice igraju ključnu ulogu u rastu mišića nakon izlijeganja pilića, te u njihovom održavanju i regenerativnom učinku nakon ozljede mišića. Budući da potencijal proliferacije i diferencijacije predstavljaju osnovna svojstva satelitskih stanica oni su u pilića detaljno procijenjeni. Općenito, kada je skeletni mišić oštećen, nova mišićna vlakna izvedena iz već postojećih inaktivnih satelitskih stanica zamjenjuju oštećeno područje i rekonstruiraju mišićnu strukturu (Feldman i Stockdale, 1991.).

Stanično meso još nije komercijalno dostupno, no trenutno postoji puno različitih tvrtki koje promoviraju različite prototipove hrane kao što su hamburgeri, slanina i pileći medaljoni. Umjetno proizvedeno pileće meso 2018. je predstavila je JUST, tvrtka koja se bavi proizvodnjom veganske hrane. Štoviše, JUST je 2019. uspješno proizveo proizvod od pilećih medaljona uzgojenih u staničnoj kulturi po cijeni od 50\$ po medaljonu (Savvides, 2020.). Uz JUST i tvrtka Memphis Meat (Berkeley, CA, SAD.) je 2016. prvi put predstavila koncept stanično uzgojenog mesa te je tijekom 2017. uspješno proizvela i predstavila proizvod od uzgojenog pilećeg mesa. Nadalje, Future Meat Technologies, start-up tvrtka osnovana 2018. godine sa sjedištem u Izraelu, u svom kratkom periodu postojanja vrlo brzo je uspjela proizvesti stanično uzgojeno pileće meso. Ista je tvrtka uspjela smanjiti troškove proizvodnje na 150\$/kg (Lucas, 2019.).

7.2. Govede meso

U istraživanju i razvoju staničnog mesa u većini je slučajeva govedina stavljana u prvi plan, stoga danas postoji veliki broj znanstvenih studija koje su istraživale više bioloških aspekata mišića te je objavljen niz znanstvenih otkrića vezanih za proliferaciju i rast mišićnih stanica (Allen i sur., 1979.; Dayton i White, 2008.). U svom radu iz 1987., Dodson i sur. pružaju dokaz da se satelitske stanice mogu izolirati iz govedeg skeletnog mišića. Također ukazuju da se satelitske stanice govedeg porijekla mogu inducirati tako da se podvrgnu značajnoj morfološkoj diferencijaciji *in vitro* (Dodson i sur. 1987.).

Mosa Meat, nizozemska start-up tvrtka, prva je u javnosti promovirala stanično uzgojenu govedinu. Ovo meso je nastalo uzgojem i diferenciranjem matičnih stanica dobivenih od krave i formulirano je u mišićne trake. Predstavnici tvrtke Mosa Meat su organizirali javno predstavljanje svojeg proizvoda nakon čega je uslijedila i degustacija istog (BBC news, 2013.). Austrijska nutricionistica Hanni Rutzler je bila dio panela za degustaciju, te se osvrnula na okus hamburgera i izjavila da je intezivnog okusa, vrlo blizu okusu mesa, ali ne tako ukusno. Rutzler je nadodala da hamburger ima savršenu konzistenciju. Drugi degustator, novinar iz Chicaga u Illinoisu, Josh Schonwald je primijetio da meso ima "poznati osjećaj u ustima", te se složio sa Rutzler da okus nije jednak kao u hamburgeru dobivenom konvencionalnim metodama uzgoja mesa (Kupferschmidt, 2013.) Mosa Meat i dalje radi na proizvodnji mesa uzgojenim staničnom kulturom koje je isplativije nego ikad prije, pri čemu je zanimljivo napomenuti da je tvrtka objavila da je razvila medij bez goveđeg seruma koji je jedan od najvećih problema kompletne industrije staničnog mesa (Kateman, 2020.). Tvrtka trenutno radi na pilot projektu u kojem su iz ciklusa financiranja "crowdfunding" skupili približno oko 180 miliona dolara, u kojem će izgraditi tvornicu koja će povećati radni opseg i biti koncentrirana na dovođenje staničnog mesa na tržište (Shaffer, 2020.).

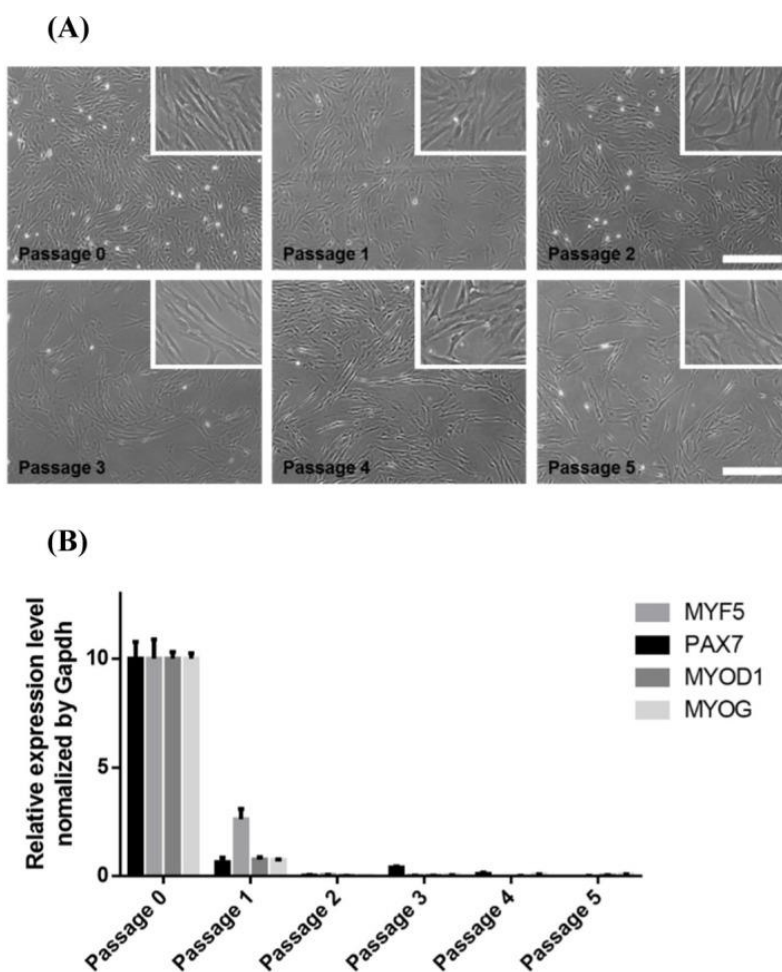


Slika 12. Prvi hamburger na svijetu uzgojen u laboratoriju, London 5.8.2013.

<https://www.bbc.com/news/science-environment-23576143>

7.3. Svinjsko meso

U svom radu Doumit i Merkel (1992.). su predložili da se miogene satelitske stanice svinja mogu izolirati iz svinjskih skeletnih mišića i razviti optimizirani medij za razvoj satelitskih stanica svinje. Ovo je do danas poboljšano uz neznatne izmjene (Metzger i sur., 2020.). Doumit i sur. (1993.) su pokazali da mišićne matične stanice svinje imaju višu stopu proliferacije u medijima temeljenim na MEM-u, u usporedbi s drugim medijima uključujući McCoyjev 5A, Hamov F12, DMEM i DMEM/F12. Visoka koncentracija FBS-a koja sadrži nekoliko poznatih čimbenika rasta podržava brzinu proliferacije i miogeni potencijal matičnih stanica svinja tijekom *in vitro* kulture (Doumit i Merkel, 1992.). Međutim, matične stanice svinjskog mišića postupno gube svoju sposobnost proliferacije i izraženu morfologiju dugotrajnim kultiviranjem tijekom dva tjedna (Choi i sur., 2020.). Kvantitativna PCR analiza je pokazala da su geni markeri za satelitske stanice i mioblaste (PAX7, MYF5 i MYOD1) (Kuang i sur., 2007.) i gen vezan za miogenezu (MYOG) (Cao i sur. 2006.) dramatično smanjeni nakon prolaska, što ukazuje da MEM koji sadrži FBS ne može poduprijeti matičnost (od eng. "stemness") mišićnih matičnih stanica svinje tijekom duljeg razdoblja *in vitro*.



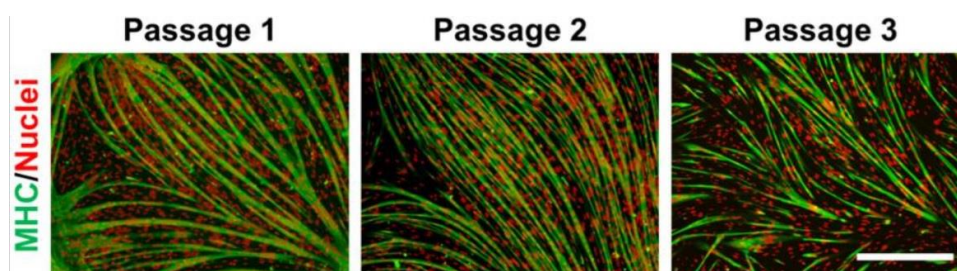
Slika 13. Svinjske mišićne matične stanice uzgajane u 10% FBS -a koji sadrži minimalni esencijalni medij (MEM).

Mišićne matične stanice izolirane iz mišića *Biceps femoris* 3 dana starosti (Choi i sur. 2020.)

- a.) Morfološke promjene matičnih stanica mišića svinje tijekom *in vitro* dugotrajne kulture.
- b.) Obrazac ekspresije gena miogenih markera tijekom *in vitro* dugotrajne kulture mjeren pomoću qPCR (Landras*Jorkšir*Durok).

Kako bi se pronašli prikladni uvjeti kulture *in vitro* za matične stanice mišića svinje, Choi i sur. (2020.) su prvo testirali komercijalno dostupan medij SkGM-2 koji uključuje epidermalni faktor rasta (EGF) i deksametazon za ljudske mioblaste. EGF i deksametazon povećavaju sposobnost proliferacije i diferencijacije mioblasta *in vitro* (Roe i sur., 1995; Syverud i sur., 2016.). Brzina proliferacije mišićnih matičnih stanica svinja uzgojenih u SkGM-2 je bila visoko povećana u usporedbi s medijima na bazi rasta MEM (slika 13a.), a stanice su održavane dulje vrijeme (slika 13b) (Choi i sur., 2020.). Iako su geni markera miogenih stanica bili značajno jače izraženi u skupini koji su tretirani s SkGM-2, njihova je ekspresija postepeno s pasažom slabila.

Choi i sur. (2020.) su primijenili i SkGM-2 kao bazalni medij te ispitali učinak inhibitora p38 SB203580 na održavanje nediferenciranog stanja matičnih stanica mišića svinje. Aktivacijom signalnog puta p38 inhibira proliferaciju i uzrokuje miogenu diferencijaciju u mišićnim matičnim stanicama (Bernet i sur., 2014.). Tretman s SB203580 sprječava regulaciju PAX7 i održava matičnost mišićnih matičnih stanica *in vitro* (Ding i sur., 2018.). Značajne razlike između skupine tretirane SB203580 i kontrolne skupine u morfološkim značajkama nisu uočene, no u skupini tretiranoj s SB203580 geni miogenih markera bili značajno pojačani i konstantno eksprimirani tijekom dugotrajne kulture. Također, stanice uzgojene u mediju s dodatkom SB203580 bile su sposobne za miogenu diferencijaciju nakon višestrukih pasaža, što je određeno imunološkim bojenjem miozinskog teškog lanca.



Slika 14. Miogeni potencijal matičnih stanica mišića svinja uzgojenih u SB203580 s dodatkom SkGM-2. (Choi i sur., 2020.).

EGF je dobro poznati mitogen koji stimulira proliferaciju mišićnih matičnih stanica svinja uzgojenih u mediju bez seruma (Doumit i sur., 1993.). Također, EGF poboljšava unos hranjivih tvari i sintezu proteina matičnih stanica ovčjih mišića (Roe i sur. 1995.). P38 signalni put je uključen u diferencijaciju i starenje mišićnih matičnih stanica gdje ozljeda mišića pojačava regulaciju puta p38, što dovodi do diferencijacije mirujućih satelitskih stanica (Troy i sur. 2012.). Deksametazon je drugi sintetski glukokortikoid koji pojačava sposobnost proliferacije mišićnih matičnih stanica regulacijom katabolizma (Guerriero i Florini, 1980.). Deksametazon je također povećao mitogeni učinak čimbenika rasta, kao što su IGF-1 i IGF-2 na satelitske stanice (Dodson i sur., 1985.) i potaknuo miogeno sazrijevanje (Syverud i sur. 2016.). Uvjeti bazalne kulture koji sadrže EGF, deksametazon i inhibitor p38 su prikladni za održavanje matičnih stanica mišića svinje tijekom kulture (Choi i sur. 2020.).

8. IZAZOVI U SVOJSTVIMA KAKVOĆE MESA PROIZVEDENOG U LABORATORIJU

Cilj kompletnog razvoja mesa iz matičnih stanica životinja je u tome da bude biološki ekvivalentno tradicionalnom mesu. Stoga su senzorske karakteristike (tekstura, boja i okus) staničnog mesa od najveće važnosti. Senzorska svojstva proizlaze iz molekularnih karakteristika proizvoda, kao što su sadržaj i priroda proteina, zatim prisutnost mioglobina, sastav hlapivih spojeva i ostalo. Osim senzorskih karakteristika, nutritivna kvaliteta staničnog mesa također bi trebala nalikovati tradicionalnom nutritivnom sastavu mesa. Tradicionalno meso je u nutritivnom smislu bogata hrana koja sadrži visoko kvalitetne proteine, vitamine, minerale i druge važne hranjive tvari (Feiner, 2006.). Zanimljivo je primijetiti da se mnogi spojevi koji se nakupljaju u mišićima, u stvari ne proizvode u mišićima već potječu od komponenata stočne hrane koje su probavili i modificirali ne-mišićni organi (Fraeye i sur., 2020.). Osim ako se posebno ne dodaju u medij kulture i ne usvoje u stanicama ti spojevi su odsutni u laboratorijski uzgojenom mesu, što utječe na procese koji određuju okus, teksturu, boju i nutritivne aspekte.

8.1. Postmortalni metabolizam

Kada se životinja usmrti, mišići se pretvaraju u meso složenim biokemijskim procesima. Nedostatak opskrbe kisikom dovodi do metaboličkog pomaka prema anaerobnoj glikolizi, kojom se glikogen prisutan u mišićnoj stanici pretvara u laktat (Fraeye i sur., 2020.). To rezultira padom unutarstaničnog pH s oko 7 (kod žive životinje) na 5,4-5,8 *post mortem*. Zbog oslobađanja kalcija iz sarkoplazmatskog retikuluma dolazi do kontrakcije mišića. Kako koncentracija ATP-a u stanici opada, kontrakcija mišića prestaje u stanju nazvanom *rigor mortis* u kojem aktin i miozin međusobno djeluju, tvoreći trajni aktomiozinski kompleks (Ertbjerg i sur., 2017.). Ova mišićna kontrakcija i stvaranje aktomiozinskog kompleksa značajno utječu na svojstva mesa. S jedne strane, smanjuje se nježnost i sposobnost zadržavanja vode u mesu (Ertbjerg i sur., 2017.), dok s druge strane, pad pH vrijednosti i druge promjene unutarstaničnih uvjeta aktiviraju enzime odgovorne za nježnost i stvaranje prekursora mirisa. Isto tako, formiranje aktomiozinskog kompleksa zahtijeva korištenje fosfata, oslobađajući veze između aktiona i miozina u proizvodnji mnogih prerađenih mesnih proizvoda (Glorieux i sur., 2017.).

Utvrđeno je da u izooblici aktina i miozina u kultiviranim mišićima pretežno oni utvrđeni u novorođenčadih životinja ili embrionalni, a ne odraslih jedinki (Thorrez i sur., 2019.). To može promijeniti odgovor proteina na potencijalnu postmortalnu transformaciju. Ako te

transformacije nema, onda se mišić ne pretvara u meso, koje je biokemijski različito od mišića (Datar i sur., 2010.). Ako bi *rigor mortis* bio manje jak ili ako ne bi nastajao aktomiozinski kompleks, to bi moglo imati pozitivan učinak na kvalitetu proizvoda uključujući nježnost i sposobnost zadržavanja vode u odnosu na tradicionalno meso, no s druge strane može promijeniti daljnji proces njegova zrenja (Fraeye i sur., 2020.).

Nakon klanja, meso zrije radi omekšavanja i stvaranja prekursora okusa (Parker i sur., 2017.). Vrijeme zrenja ovisi isključivo o vrsti mesa. U govedini, u kojoj je prisutna mala količina proteaza, ono traje ± 14 dana. Proces omekšavanja je složen: uključuje mnoge proteolitičke enzime i proučavan je dugi niz godina, ali do danas nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da je kalpain, kompleks proteaze prisutan u sarkoplazmi, igra središnju ulogu u tom procesu (Ertbjerg i sur., 2017.). Kalpainski razgrađuju nekoliko miofibrilarnih proteina, ali ne aktin i miozin (Lonergan i sur., 2010.). U proces je uključeno i nekoliko drugih enzima, kao što su proteasom, kaspaza (Ertbjerg i sur., 2017; Langelaan i sur., 2010.), ili lizosomalni enzim katespini (Bowker i sur., 2010.). Stupanj do kojeg navedeni enzimi djeluju snažno ovisi o mikrokolišnim uvjetima, kao što su pH, ionska snaga te oksidacijski status stanice (Lonergan i sur., 2010.). Unutarstanični uvjeti u staničnom mesu mogu se znatno razlikovati od tradicionalno proizvedenog mesa, što će utjecati na stopu i stupanj omekšavanja te razvoj okusa.

8.2. Strukturna i teksturna svojstva staničnog mesa

Stvaranje vizualno privlačne teksture u proizvodnji staničnog mesa predstavlja daleko veći izazov od pripreme mljevenih mesnih proizvoda. Utvrđeno je da proizvodnja staničnog mesa sličnog odresku ili svinjskim kotletima predstavlja i dalje izazov te možda neće biti izvediva u bliskoj budućnosti (Bhat i sur., 2019.). Zbog odsutnosti krvi, opskrbe hranjivim tvarima i kisikom, te ograničenja difuzije, trenutno dostupnim tehnikama kultiviranja može se proizvesti samo nekoliko staničnih slojeva (Bhat, 2010.). Za proizvodnju debljih komada mesa bio bi potreban perfuzijski sustav koji bi omogućio distribuciju medija s hranjivim tvarima i kisikom kroz tkivo. Gholobova i sur. (2018.) navode međutim da se implementacijom krvožilnog sustava obloženog endotelnim stanicama može omogućiti takva perfuzija. U tradicionalno proizvedenom mesu tekstura ovisi o miofibrilnoj strukturi na koju utječe *rigor mortis*, proces zrenja, količina i struktura vezivnog tkiva prisutnog u endo-, peri- epimiziju mišića te količina i sastav masti u mišićima (Feiner, 2006.). Blisko oponašanje ovih svojstava zahtijevalo bi zajedničko kultiviranje mioblasti s fibroblastima i adipocitima (Langelaan i sur., 2010.).

Međutim, kultiviranje nekoliko tipova stanica tehnički je izazovno, budući da je za rast i diferenciranje svakog pojedinačnog tipa stanica potreban specifični medij. Kada se nekoliko tipova stanica uzgaja u istom mediju, ovi uvjeti mogu biti neoptimalni za jednu ili više tipova stanica (Gholobova i sur., 2015.). Dodavanjem medija stanice se mogu usmjeriti prema povećanom taloženju ekstracelularnog matriksa, mijenjajući mehanička svojstva tkiva (Thorrez i sur., 2018.). S druge strane, umjesto induciranja strukture kroz složene stanične kulture, struktura vezivnog tkiva može se stvoriti i pomoću jestivog (nestaničnog) matriksa. Takav matriks bi se mogao temeljiti na vezivnom tkivu kada je napravljen od strukturnih proteina, poput kolagena i elastina (Fraeye i sur., 2020.).

Proizvodnja mesnih proizvoda, poput hamburgera je izvediva što je i demonstrirano 2013. godine u Londonu (Kupferschmidt, 2013.). Tradicionalni hamburgeri visoke kvalitete dobivaju se mljevenjem mesa (junetine) oštricom od 3-6 mm. Konačna struktura još uvijek uključuje fragmente tkiva. Vezanje ovih fragmenata odvija se uglavnom putem proteina mesa koji se ekstrahira dodavanjem male količine soli (Feiner, 2006.). U hamburgeru, odnosno pljeskavici proizvedenoj od staničnog mesa 2013. korišteno je 10.000 traka mišićnih vlakana promjera 1mm, pa su fragmenti tkiva bili znatno manji (Post, 2014.). Kako bi se ove trake povezale i kako bi proizvod dobio potrebnu teksturu, bile su potrebne krušne mrvice, bjelanjak u prahu i veziva (Post, 2017.). Stoga se očekuje da će tekstura dobivenog proizvoda nalikovati industrijski obrađenim hamburgerima (koji su sitnije mljeveni i također sadrže dodatne sastojke), a ne svježim visoko kvalitetnim hamburgerima koji sadrže samo sol kao sastojak.

Ostali prerađeni mesni proizvodi, kao što su kuhane kobasice, još su sitnije mljevene. U tim proizvodima meso se usitnjava u tolikoj mjeri da ne ostaju nikakve stanične strukture (Glorieux i sur., 2019.). To bi moglo smanjiti složenost proizvodnje uzgojenog mesa u tu svrhu. Tako primjerice Specht i sur. (2018.) predlažu izostavljanje nosača za staničnu kulturu. Formiranje strukture u tim proizvodima snažno se oslanja na geliranje miofibrilarnih proteina aktina i miozina tijekom pasterizacije (Specht i sur., 2018.). Osim toga ako se dodaju frakcije masti, proteini stabiliziraju masnoću tvoreći međufaznu površinu odnosno proteinski film oko masnih kuglica (Glorieux i sur., 2019.). Stoga su svojstva geliranja i emulgiranja bjelančevina mesa od iznimne važnosti u proizvodnji mljevenih mesnih proizvoda.

Važno naglasiti da se očekuje da će i biokemijski sastav staničnog mesa u odnosu meso dobiveno tradicionalnim metodama biti ujednačen (Bhat i sur., 2019.). Međutim mišićna vlakna formirana trenutno dostupnim *in vitro* metodama sadrže samo male količine pretežno

embrionalnih ili neonatalnih izoforma aktina i miozina (Thorrez i sur., 2019.). Električna ili mehanička stimulacija povećava promjer mišićnih vlakana, poboljšava strukturu miotuba i povećava sadržaj miofibrilarnih proteina (Khodabukus i sur., 2019.). Nadalje potrebno je utvrditi skalabilnost stimulacije, ekonomsku izvedivost, sadržaj proteina i tehno-funkcionalnu kvalitetu, sve u svojstvu da bi se osigurala dovoljna svojstva geliranja i emulgiranja u proizvodnji takvih mesnih proizvoda.

8.3. Boja

Crvena boja mesa uglavnom se pripisuje prisutnosti mioglobina, proteina koji sadrži hem. Kultivirana mišićna tkiva općenito imaju blijedu boju zbog odsutnosti mioglobina, budući da je ekspresija mioglobina potisnuta u uvjetima kisika u okolini (Post i sur., 2017.). Trenutno je dostupno nekoliko pristupa za povećanje sadržaja mioglobina u staničnom mesu. Prvi pristup je povećanje ekspresije mioglobina prilagodbom uvjeta kulture, točnije kultiviranjem mišićnih vlakana u uvjetima minimalne količine kisika (Post i sur., 2017.). Međutim, do danas nije sigurno jesu li hipoksična stanja dovoljna za povećanje ekspresije mioglobina (Schlater i sur., 2019.). U uvjetima hipoksije uočena je povećana potrošnja glukoze i proizvodnja mliječne kiseline što ukazuje na bolju učinkovitost (Moritz i sur., 2015.), međutim ovo može dovesti do acidifikacije medija, što bi moglo značajno oštetiti stanice (Datar i sur., 2010.). Ekspresija mioglobina također se može potaknuti prisutnošću aditiva medija, kao što su lipidi ili octena kiselina (Moritz i sur., 2015.). Osim sinteze proteina mioglobina, razvoj boje u mesu zahtijeva i prisutnost dovoljne količine željeza u stanicama. Mioglobin sadrži hem, koji ima željezo u središtu svoje strukture. Bazalni medij za staničnu kulturu ne sadrži željezo (npr. IMDM, RPMI1640) ili posjeduje male količine željeza u obliku željezovog nitrata nonahidrata (DMEM: 0,1 mg/L) ili željeznog sulfata heptahidrata (Hamov medij 0,8 mg/L) (Fraeye i sur., 2020.).

Drugi pristup za povećanje sadržaja mioglobina u kultiviranim stanicama je izravno dodavanje mioglobina u medij. Simsa i sur. (2019.) u svojem radu su pokazali da dodatak metmioglobina povećava kapacitet stanične proliferacije i rezultira povećanim sadržajem mioglobina u kultiviranim stanicama. Međutim, sadržaj mioglobina je još uvijek bio niži u usporedbi s govedinom, što rezultira smeđom bojom. Razlog tomu je posljedica upotrebe metmioglobina koji je oksidirani oblik mioglobina.

Nemogućnost ugradnje dovoljne količine mioglobina u uzgojene stanice zahtijeva vanjski dodatak mioglobina ili drugih bojila u kasnijoj fazi proizvodnog procesa, a to bi bilo moguće

samo za preradevine od mesa. U tom smislu, umjetno bojilo sojin leghemoglobin proizveden putem genetski modificirane *Pichia pastoris* (Jin i sur., 2018.) je dobilo odobrenje od FDA za ugradnju u hamburgere biljnog podrijetla dajući mu boju i okusu prirodnog hamburgera (Watson, 2019.) od goveđeg mesa.

8.4. Okus

Svježe meso gotovo i nema okus. Njegov "krvav" okus se pripisuje uglavnom relativno visokom udjelu željeza (Parker i sur., 2017.). Sadržaj željeza u stanicama donekle se može povećati korištenjem medija obogaćenog željezom (Fraeye i sur., 2020.). Ostali spojevi koji doprinose okusu su laktat (kiseli okus) i inozin 5-monofosfat (umami), pri čemu oba spoja nastaju tijekom metabolizma *post mortem* (Parker i sur., 2017.). Nakon zagrijavanja, složene termički izazvane reakcije rezultiraju stvaranjem ogromnog broja hlapivih tvari od kojih neke doprinose tipičnom okusu mesa. Reakcije koje su uključene u proces su Maillardova reakcija, reakcija razgradnje lipida i njihova međusobna interakcija (Parker i sur., 2017.). Maillardova reakcija uključuje reakciju između amino spoja (slobodne aminokiseline ili peptidi) i reducirajućeg šećera (uglavnom riboze i riboza 5-fosfata) (Fraeye i sur., 2020.). U tradicionalno proizvedenom mesu značajne količine ovih prekursora nastaju tijekom metabolizma u mišićnom tkivu *post mortem*. Razgradnja lipida pri termičkoj obradi događa se čak i u vrlo nemasnom mesu i mesnim proizvodima zbog prisutnosti unutarstaničnih lipida, a posebno fosfolipida iz membrana koji općenito sadrže veću količinu višestruko nezasićenih masnih kiselina podložnijih oksidaciji (Parker i sur., 2017.). Kada su prisutne veće količine masti, doprinos hlapivih tvari cjelokupnom okusu se povećava, dok proizvodi oksidacije doprinose poželjnoj aromi mesa (Parker i sur., 2017.).

Poznato je da u svježem mesu mast značajno doprinosi okusu proizvoda, te teksturi i sočnosti. Dodavanje frakcije masti u staničnom mesu može zahtijevati kultivaciju mišićnih matičnih stanica s adipocitima. S druge strane u sitno mljeveno meso često se kao zasebna sirovina dodaje mast (u većini slučajeva leđna mast). U staničnom mesu postoji mogućnost dodavanja masti na kraju procesa uzgoja. Također se kao alternativa umjesto masti životinjskog podrijetla može se upotrijebiti mast biljnog podrijetla (Jiang i sur., 2015; Jimenez-Colemnero i sur., 2015.).

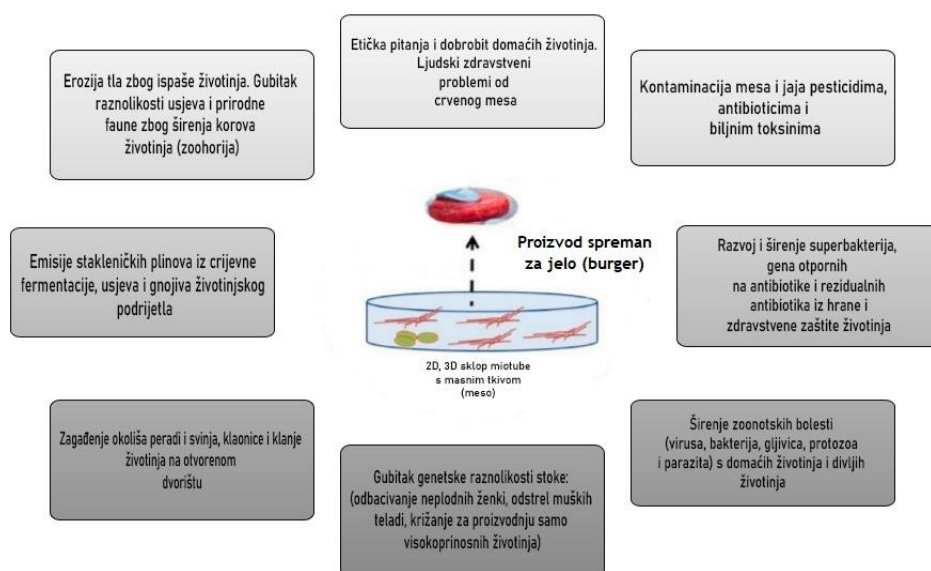
8.5. Nutritivna vrijednost

Meso se općenito smatra hranjivim proizvodom zbog prisutnosti visoko probavljivih proteina s izvrsnim sastavom aminokiselina, vitamina i minerala (Fraeye i sur., 2020.). S nutritivne točke gledišta mast u mesu se može okarakterizirati svojim postotnim sadržajem i sastavom masnih kiselina. Također na udio masti utječu razni čimbenici, kao što su vrsta, pasmina, starost, hranidba. Dok ukupni sadržaj masti utječe uglavnom na kalorijsku vrijednost proizvoda, sastav masnih kiselina utječe na njegovu prehrambenu vrijednost (zasićene ili nezasićene masti, omjer višestruko nezasićenih masnih kiselina i trans-nezasićenih masti) (Fraeye i sur., 2020.). Dodatak masnih kiselina može se postići ko-kulturama adipocita dobivenih iz masnih matičnih stanica, koje mogu sintetizirati razne zasićene i nezasićene masne kiseline (Yue i sur., 2018.).

Meso je i značajan prehrambeni izvor minerala, kao što su željezo, cink i selen (Fraeye i sur., 2020.). U mišićnom tkivu željezo je ili prisutno kao dio hem grupe u mioglobinu (i u manjoj mjeri hemoglobin) ili je pohranjeno u kompleksu s feritinom u ne-hem obliku (Beard, 2001.). S nutricionističke točke gledišta, poželjno je konzumirati željezo u obliku hema jer se lakše apsorbira od ne-hem oblika i njegovu apsorpciju ne ometaju kelatni agensi koji se prirodno nalaze u nekim namirnicama (West i Oates, 2008.). Povećanje sadržaja mioglobina bi stoga poboljšalo nutritivne karakteristike laboratorijski uzgojenog mesa u svojstvima boje i okusa (Fraeye i sur. 2020.). Ostali minerali kao što su cink i selen, ili nisu prisutni u bazalnim staničnim podlogama, ili su u vrlo niskim koncentracijama i stoga ih je potrebno dodati kako bi podržali rast stanica. Meso također i obiluje raznim vitaminima B skupine, posebice B12 (Williams, 2007.). Ako se stanično meso smatra zamjenom za tradicionalno meso, važno je da ono sadrži i vitamin B12. S obzirom na tkivno inženjerstvo, vitamini su neophodni za medij i optimalnu proliferaciju stanica, ali nije ustanovljeno da li unos iz medija rezultira razinama vitamina jednakim kao u tradicionalno proizvedenom mesu (Higuchi, 1973.). Alternativni pristup bio bi dodavanje vitamina B12 tijekom post kultivacije (Fraeye i sur., 2020.). Slično tome, mnoge trenutno dostupne biljne alternative za meso sadrže dodani vitamin B12 kako bi se poboljšala njihova nutritivna vrijednost (Richards, 2021.).

9. RAZLOZI ZA PROIZVODNJU STANIČNOG MESA

Buduća održivost oslanja se na održivost hrane i okoliša koji su glavni globalni izazovi u modernom svijetu. Što se tiče održive proizvodnje mesa, sve su veće društvene implikacije na dobrobit životinja i moguće alternative tradicionalnom uzgoju životinja i proizvodnji mesa. Istraživanje Sanchez-Sabate i Sabate (2019.) ukazuju na to da su potrošači pretežito zapadnog dijela Europe spremniji promijeniti sklonosti prema konzumiranju mesa zbog utjecaja proizvodnje životinja za meso na okoliš. Štoviše, utvrđeno je da su dobrobit životinja i ekološka zabrinutost najjači pozitivni pokretač među potrošačima za prihvaćanje staničnog mesa (Weinrich i sur., 2020.). Osim toga, rastuća zabrinutost za sigurnost hrane, zdravstveni problemi, otpornost na antibiotike te bolesti povezane s prehranom također doprinose traženju alternativnih izvora proteina.

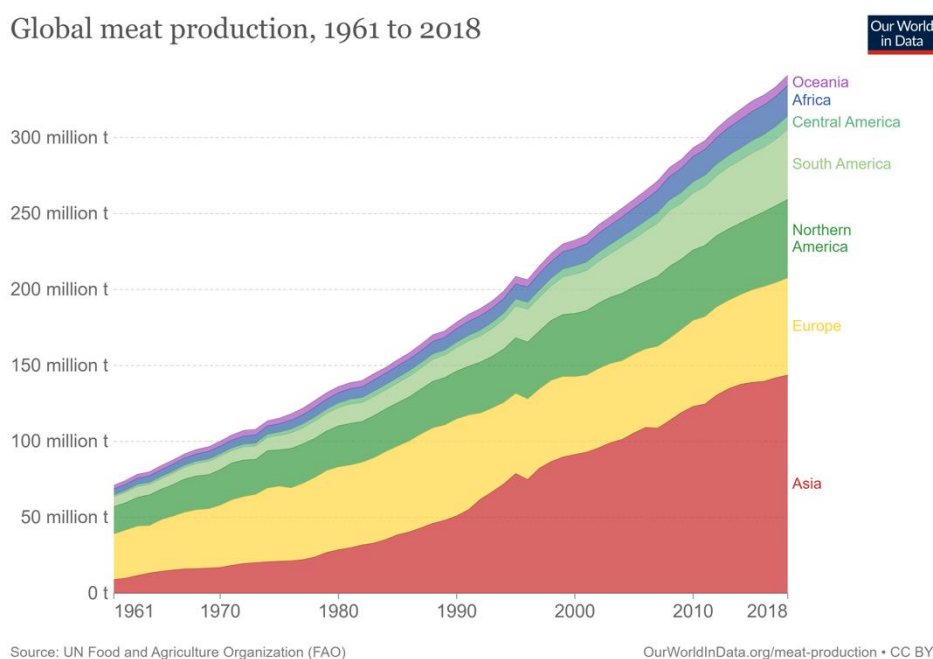


Slika 15. Izazovi zbog kojih je uzgojeno meso održiva opcija.

Izvor: Preuzeto i prilagođeno prema Jairath i sur. (2021.).

Ovi izazovi predstavljaju pokretačku snagu za proizvodnju i konzumaciju staničnog mesa jer će u doglednoj budućnosti osigurati održivu proizvodnju sigurnog i funkcionalnog alternativnog izvora proteina, budući da se uvjeti i medij mogu kontrolirati. Također je važno naglasiti da proces proizvodnje staničnog mesa manje utječe na stalne klimu (FAO, 2013.), te se čini da bi stanično meso moglo omogućiti većem dijelu svjetske populacije dosljedan pristup proteinima.

Rapidno rastuća svjetska populacija s tradicionalnom proizvodnjom mesa jednostavno je neodrživa. Predviđa se da će ljudska populacija doseći 9,9 milijardi do 2050. godine, što je povećanje populacije više od 25% u odnosu na populaciju od 7,8 milijardi iz 2020. godine (Kaneda i sur., 2020.). Paralelno sa porastom populacije raste i potreba za hranom, odnosno mesom i mliječnim proizvodima životinjskog podrijetla (Singh i sur., 2019.). Ova potražnja za proizvodima animalnog porijekla, te naknadno i povezano povećanje proizvodnje i proizvodnih metoda naziva se „revolucijom stočarstva“ (Steinfeld, 2004.). Stoga će prvi i jedini izazov biti zadovoljenje potražnje za mesom jer se očekuje da će ukupna potrošnja mesa u svijetu 2050. godine porasti za više od 60%, odnosno na 464 milijuna tona (Revell, 2015.). Nadalje, FAO (2012.) je izvijestio o svojim predviđanjima koja govore da će kapacitet konvencionalnih sustava proizvodnje mesa uskoro doći u fazu stagnacije koja će na kraju rezultirati svojim maksimumom.



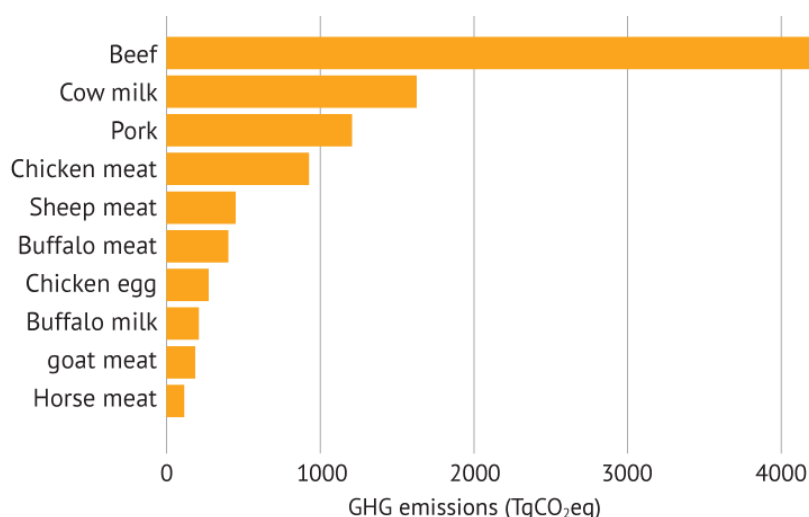
Slika 16. Prikaz porasta svjetske proizvodnje mesa od 1961. do 2018 godine.

Izvor: <https://ourworldindata.org/meat-production#global-meat-production> (2018.)

Nadalje, još jedna od zabrinjavajućih predviđanja je da će se urbanizacija povećati, te se nagađa da će iznositi 5 milijardi do 2028. godine i 6 milijardi 2041., pri čemu bi gotovo 90% povećanja bilo u razvoju zbog viših prosječnih prihoda kućanstava i promjene načina života i veća sklonost konzumiranju hrane izvan kuće (United Nations, 2019.).

9.1. Održivost okoliša

Konvencionalni sustav proizvodnje mesa stavlja okoliš u nezavidan položaj u smislu emisije stakleničkih plinova, korištenja ogromnih količina zemljišta, vode i energije. Udio stoke u proizvodnji triju glavnih stakleničkih plinova (CO₂, CH₄ i N₂O) su 9%, 39% i 65% (FAO, 2006.). Trenutno 60% ukupnih emisija stakleničkih plinova je posljedica svjetske proizvodnje mesa (Milman, 2021.). Iako se negativni učinci uzgoja stoke u postotcima mogu razlikovati u različitim zemljama, važno je naglasiti da i krčenje šuma radi stvaranja pašnjaka čini veliki udio u ovom postotku (Steinfeld i sur., 2010.). Proizvodnja krava zahtijeva 15.500 m³/t vode, dok peradi zahtijeva 3918 m³/t (Hoekstra i Chapagain, 2007.), što dodatno opterećuje resurse vode i okoliša. U usporedbi s konvencionalno proizvedenom govedinom, ovčetinom, svinjetinom i piletinom, proizvodnja uzgojenog mesa uključuje manje emisije stakleničkih plinova i manje korištenje zemlje, vode i energije jer je otprilike 78-96% manje emisija i 99%, 82-96% i 7-45% manje korištenja zemlje, vode i energije (Tuomisto i de Mattos, 2011.).



Slika 17. Globalne emisije stakleničkih plinova iz hrane životinjskog podrijetla (metričke tone)

Izvor: Xu i sur. (2021.).

9.2. Dobrobit životinja

Povećana zabrinutost javnosti i društava za dobrobit životinja te etički problemi koji se javljaju kod sve više ljubitelja mesa dovodi do potencijalnih promjena u konzumaciji mesa. Količina publikacija o pitanjima dobrobiti životinja u konvencionalnom sustavu proizvodnje mesa postupno se povećavala tijekom 1982.-2008., što je posljedično utjecalo na naklonost potrošača

prema mesu. Nadalje, vjerska uvjerenja i dalje posreduju u klanju i konzumaciji životinja koje predstavljaju dio obreda. Na primjer u Indiji, s obzirom na status krave kao svete životinje, klanje je prekršaj iako u većini ostalog dijela svijeta predstavlja važan izvor mlijeka i mesa (Singh i sur. 2020.). Kako se za proizvodnju mesa iz matičnih stanica nastoji teoretski iskoristiti jedna farmska životinju kao donora iz perspektive zaštite životinja ovo ne bi bilo privlačno samo ljubiteljima mesa, već bi moglo privući vegane, vegetarijance, te naravno savjesne svejede koji su zainteresirani za smanjenje unosa mesa iz etičkih razloga (Bryant i sur., 2019.).

9.3. Sigurnost hrane

Patogeni koji se prenose hranom kao što su *Salmonella*, *Campylobacter* i *E. coli* različito se nalaze u mesu i odgovorni su za neke od bolesti svake godine (CDC, 2011.). Nadalje, patogeni i bolesti koje utječu na ljude poput ptica i svinja u svojstvu zoonoza, sve su otporniji na antibiotike (Greger, 2007.). Proces uzgoja staničnog mesa posebno naglašava kontrolirane uvjete u kojima se može nadzirati potencijalni ulazak bakterija i ostalih uzročnika kontaminacije, a također bi se smanjila i prevalencija pesticida i ostataka fungicida zbog ograničenog i kontroliranog okruženja (Bhat i sur., 2015.). Trenutna svjetska pojava pandemije teškog akutnog respiratornog sindroma Korona virusa (SARS-CoV-2, COVID-19) dodatno je pokrenula pitanja o upotrebi mesa od stoke iz nekonvencionalnih izvora među kojima je i meso proizvedeno iz matičnih stanica (Volpato i sur., 2020.).

10. IZAZOVI U PROIZVODNJI STANIČNOG MESA

Preživljavanje novog proizvoda ili tehnologije u nastajanju, između ostalog ovisi i o broju i vrsti izazova s kojima se suočava. Potrošači su krajnji dionici na tržištu, a prihvatljivost proizvoda među potrošačima je višefaktorna u rasponu od percepcije do ekonomije proizvoda. Nadalje u početnim će fazama mnogi izazovi u rasponu od tehničkih do društvenih i političkih prepreka utjecati na budući opstanak tehnologije.

10.1. Odgovor tržišta

Odgovor tržišta na novu hranu ili tehnologiju ovisi o percepciji i navikama potrošača kao i o osjetilnim čimbenicima u odnosu na ekonomičnost proizvoda koji će se lansirati na tržište. Istraživanje koje su proveli Bryant i sur. (2019.) u SAD-u među 1185 odraslih o konzumaciji mesa uzgojenog u laboratoriju pokazali su da je 66,4% odraslih ljudi spremno probati takav proizvod, gdje bi ih 48,9% jelo ovakvo meso redovito, a 55,2% bi ih ga jelo umjesto konvencionalno proizvedenog mesa. Isti autori navode da je veliki broj potrošača u različitim zemljama spreman kupovati meso proizvedeno iz matičnih stanica i to: u SAD 29,8%, Indiji 48,7% i Kini 59,3%. Bryant i Barnett (2020.) navode da unatoč tome što se činilo da je prihvaćanje mesa uzgojenog u laboratoriju među potrošačima bolje od genetski modificirane hrane i drugih proteinskih nadomjestaka poput insekata, ipak će biljni proteini po svemu sudeći barem još neko vrijeme ostati na vrhu potrošačkog lanca u vidu konzumiranja alternativa mesu.

10.2. Nesposobnost strukturiranja

Kao što Hocquette (2016.) sugerira, meso proizvedeno u laboratoriju je umjetni mišićni protein koji sadrži mišićna vlakna, dok je konvencionalno meso skeletni mišić s prirodno dodanim masnoćama i vezivnim tkivom (European Parliament, 2003.). Drugim riječima, meso dobiveno od životinja može se definirati kao iskrvaren proizvod mišićno-koštanog sustava koji sadrži skeletne mišiće, kosti, vezivno tkivo i krvne žile od kojih svaki ima odlučujuću ulogu u okusu i konzistenciji mesa (Gillies i Lieber, 2011.). Iz navedenog je lako zaključiti da prava imitacija mesa zahtijeva sve ove strukture u isto vrijeme, što možda nije trenutno isplativo i zahtijeva daljnji tehnološki razvoj u tom pogledu. Štoviše, za uzgoj pravih odrezaka i pravu imitaciju mesa potrebni su visokosofisticirani objekti s 3D tehnologijama koji su trenutno još u razvoju (Post i sur., 2018.).

10.3. Fetalni goveđi serum

Jedan od najvećih izazova staničnog mesa je zamjena fetalnog goveđeg seruma sintetičkim alternativama. Fetalni goveđi serum (FBS) je uobičajena komponenta medija za kulturu životinjskih stanica. Uzima se od goveđih fetusa uzetih od steonih krava tijekom usmrćivanja. FBS se obično uzima putem punkcije srca bez ikakvog oblika anestezije (Jochems i sur., 2002.). Fetusi su izloženi boli ili nelagodji, pa je sadašnja praksa vađenja krvi fetusa nehumana i etički upitna. Osim etičkih i moralnih briga, postoji i nekoliko znanstvenih i tehničkih problema u vezi s upotrebom FBS-a u staničnoj kulturi (Jochems i sur., 2002.). Važno je

naglasiti da znanstvenici i dalje u 2021. godini tragaju za dostojnom zamjenom u odnosu na fetalni goveđi serum.

11. ZAKLJUČAK

Meso proizvedeno iz matičnih stanica u laboratoriju smatra se novim alternativnim izvorom proteina. Uz konvencionalno proizvedeno meso, jestive insekte, te biljno bazirane proteine, neupitno je da će postati zamjena za konzumaciju mesa, barem dijelu stanovništva. Proizvodnja ovakvog mesa ima mnoge pozitivne strane, a to su prije svega utjecaj na okoliš te bioetička pitanja koja nastaju konvencionalnim uzgojem domaćih životinja za meso, no isto tako i slabe točke, kao i izazove koje se tek treba premostiti. Prije svega ovo se odnosi na izradu etički prihvatljivih, lako dostupnih medija za uzgoj i rast mišićnih stanica te cijenu mesa, koja u ovom trenutku nije lako dostupna prosječnom potrošaču, čak niti u zapadnim zemljama s visokim prihodima. Osim ovih tehničkih izazova, važna su i društvena i etička pitanja, uključujući prihvaćanje potrošača te nacionalne propise o sigurnosti hrane, kao i njihovo usklađivanje na međunarodnoj razini. Stoga su i dalje potrebi stalni napori znanstvenika i relevantnih organizacija kako bi utrli put nadolazećoj eri stanične poljoprivrede.

12. POPIS LITERATURE

1. Ahmed, T. A., Dare, E. V., Hincke, M. (2008.): Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Engineering Reviews* 14(2):199-215.
2. Allen, R. E., Merkel, R. A., Young, R. B. (1979.): Cellular aspects of muscle growth: myogenic cell proliferation. *Journal of Animal Science* 49(1):115-27.
3. Allan, S. J., De Bank, P. A., Ellis, M. J. (2019.): Bioprocess Design Considerations for Cultured Meat Production With a focus on the expansion bioreactor. *Frontiers in Sustainable food systems*, 3.
4. Ali, A., Ahmed, S. J. (2018.): Recent Advances in Edible Polymer Based Hydrogels as a Sustainable Alternative to Conventional Polymers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(27): 6940-6967.
5. Arshad, M. S., Javed, M., Sohaib, M., Saeed, F., Imran, A., Amjad, Z. (2017.): Tissue engineering approaches to develop cultured meat from cells: A mini review. *Cogent Food and Agriculture*, 3:1.
6. Aykan, N. F. (2015.): Red meat and colorectal cancer. *Oncology reviews* 9(1), 288.
7. Baroffio, A., Aubry, J. P., Kaelin, A., Krause, R. M., Hamann, M., Bader, C. R. (1993.): Purification of human muscle satellite cells by flow cytometry. *Muscle and Nerve*, 16(5), 498-505.
8. Baroffio, A., Hamann, M., Bernheim, L., Bochaton-Piallat, M. L., Gabbiani, G., Bader, C, R. (1996.): Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells. *Differentiation*, 60(1), 47-57.
9. Bentzinger, C. F., Wang, Y. X., von Maltzahn, J., Soleimani, V. D., Yin, H., Rudnicki, M. A. (2013.): Fibronectin regulates Wnt7a signaling and satellite cell expansion. *Cell stem cell*, 12(1), 75-85.
10. Beard, J. L. (2001.): Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *The Journal of nutrition*, 131:568S-580S.
11. Bernet, J. D., Doles, J. D., Hall, J. K., Kelly Tanaka, K., Carter, T. A., Olwin, B. B. (2014.): p38 MAPK signaling underlies a cellautonomous loss of stem cell self-renewal in skeletal muscle of aged mice. *Nature Medicine*, 20(3), 265-271.

12. Ben-Arye, T., Shandalov, Y., Ben-Saul, S., Landau, S., Zagury, Y., Ianovici, I., Lavon, N., Levenberg, S. (2020.): Textured soy protein scaffolds enable the generation of threedimensional bovine skeletal muscle tissue for cell based meat. *Nature Food*, 1(4):210-220.
13. Bhat, Z. F., Fayaz, H. (2010.): Prospectus of cultured meat-advancing meat alternatives. *Journal of food science and technology*. 48:125-40.
14. Bhat, Z. F., Kumar, S., Fayaz, H. (2015.): In vitro meat production: Challenges and benefits over conventional meat production. *Journal of integrative agriculture*, 14(2), 241-248.
15. Bhat, Z. F., Morton, J. D., Mason, S. L., Bekhit, A., Bhat, H. F. (2019.): Technological, regulatory, and ethical aspects of in vitro meat: a future slaughterfree harvest. *Comprehensive reviews in food science food safety* 18:1192-208.
16. Bischoff, R. (1997.): Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Developmental Dynamics*, 208(4), 505-515.
17. Bodiou, V., Moutsatsou, P., Post, M. J. (2020.): Microcarriers for upscaling cultured meat production. *Frontiers in nutrition* 7:10.
18. Bowker, B. C., Eastridge, J. S., Paroczay, E. W., Callahan, J. A., Solomon, M. B. (2010.): Aging/Tenderization mechanism. *Handbook of meat processing*. 87-104.
19. Brien, P., Pugazhendhi, D., Woodhouse, S., Oxley, D., Pell, J. M. (2013.): p38alpha MAPK regulates adult muscle stem cell fate by restricting progenitor proliferation during postnatal growth and repair. *Stem Cells*, 31(8),1597-1610.
20. Brown, J. H., Das, P., DiVito, M. D., Ivancic, D., Tan, L. P., Wertheim, J. A. (2018.): Nanofibrous PLGA electrospun scaffolds modified with type I collagen influence hepatocyte function and support viability in vitro. *Acta Biomaterialia*, 73: 217-227.
21. Bryant, C. J., Anderson, J. E., Asher, K. E., Green, C., Gasteratos, K. (2019.): Strategies for overcoming aversion to unnaturalness: The case of clean meat. *Meat Science*, 154, 37-45.
22. Bryant, C. J., Barnett, J. C. (2019.): Whats in a name? Consumer perceptions of in vitro meat under different names. *Appetite*, 137, 104-113.
23. Bryant, C. J., Barnett, J. C. (2020.): Consmuer acceptance of cultured meat: An updated review (2018-2020.). *Applied Sciences*, 10, 5201.
24. Champion, D. R., Richardson, R. L., Reagan J. O., Kraeling, R. R. (1981.): Changes in the satellite cell population during postnatal growth of pig skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 52(5), 1014-1018.
25. Champion, D. R., Marks, H. L., Richardson, L. R. (1982.): An analysis of satellite cell content in the semimembranosus muscle of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) selected for rapid growth. *Acta Anatomica*, 112(1), 9-13.

26. Cao, Y., Kumar, R. M., Penn, B. H., Berkes, C. A. Kooperberg, C., Boyer, L. A., Young, R. A., Tapscott, S. J. (2006.): Global and gene-specific analyses show distinct roles for Myod and Myog at a common set of promoters. *The EMBO journal*, 25(3): 502-511.
27. Carletti, E., Motta, A., Migliaresi, C. (2011.): Scaffolds for tissur engineering and 3D cell culture. *Methods in molecular biology*, 695:17-39.
28. CDC. (2011.): CDC estimates of foodborne illnes in the United States (http://www.cdc.gov/foodborneburden/PDFs/FACTSHEET_A_FINDINGS_updated413.pdf/) datum pristupa: 16.12.2021.
29. Chakravarthy, M. V., Davis, B. S., Booth, F. W. (2000.): IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985.), 89(4), 1365-1379.
30. Chal, J., Pourquie, O. (2017.): Making muscle: Skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development*, 144(12), 2104-2122.
31. Charville, G. W., Cheung, T. H., Yoo, B., Santos, P. J., Lee, G. K., Shrager, J. B., Rando, T. A. (2015.): Ex vivo expansion and in vitro self-renewal of human muscle stem cells. *Stem Cell Reports*, 5(4),621-632.
32. Choi, K. H., Lee, D. K., Kim, S. W., Woo, S. H., Kim, D. Y., Lee, C. K. (2019.): Chemically defined media can maintain pig pluripotency network in vitro. *Stem Cell Reports* 13(1), 221-234.
33. Choi, K. H., Yoon, J. W., Kim, M., Jeong, J., Ryu, M., Park, S., Jo, C., Lee, C. K. (2020.): Optimization of culture conditions for maintaining pig muscle stem cells in vitro. *Food Sci Anim Resour*, 40(4): 659-667.
34. Choi, K. H., Yoon, J. W., Kim, M., Lee, H. J., Jeong, J., Ryu, M. (2020.): Muscle stem cell isolation and in vitro culture for meat production: a methodological review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*; 1-29.
35. Choi, K. H., Yoon, J. W., Kim, M., Lee, H. J., Jeong, J., Ryu, M., Jo, C., Lee, C. (2021.): Muscle stem cell isolation and in vitro culture for meat production: A methodological review. *Comprehesive reviews in food science and food safety*, 20(1), 429-457.
36. Collins, B. C., Arpke, R. W., Larson, A. A., Baumann, C. W., Xie, N., Cabelka, C. A., Lowe, D. A. (2019.): Estrogen regulates the satellite cell compartment in females. *Cell reports*, 28(2), 368-381 e366.
37. Colwell, A. S., Longaker, M. T., Lorenz, H. P. (2003.): Fetal wound healing. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 8(6): S1240-S1248.

38. Cosgrove, B. D., Gilbert, P. M., Porpiglia, E., Mourkioti, F., Lee, S. P., Corbel, S. Y., Blau, H. M. (2014.): Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscle. *Nature Medicine*, 20(3), 255-264.
39. Davidenko, N., Campbell, J. J., Thian, E. S., Watson, C. J., Cameron, R. E. (2010.): Collagen-hyaluronic acid scaffolds for adipose tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 6(10): 3957-3968.
40. Das, P., Di Vito, M. D., Wertheim, J. A., Tan, L. P. (2020.): Collagen-I and fibronectin modified three-dimensional electrospun PLGA scaffolds for long-term in vitro maintenance of functional hepatocytes. *Mater Sci Eng C*, 111: 110-273.
41. Datar, I., Betti, M. (2010.): Possibilities for an in vitro meat production system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11:13-22.
42. Day, K., Shefer, G., Shearer, A., Yablonka-Reuveni, Z. (2010.): The depletion of skeletal muscle satellite cells with age is concomitant with reduced capacity of single progenitors to produce reserve progeny. *Developmental Biology*, 340(2), 330-343.
43. Dayton W. R., White, M. E. (2008.): Cellular and molecular regulation of muscle growth and development in meat animals. *Journal of Animal Science*. E217-25.
44. Ding, S., Wang, F., Liu, Y., Li, S., Zhou, G., Hu, P. (2017.): Characterization and isolation of highly porcine satellite cells. *Cell Death Discovery*, 3, 17003.
45. Ding, S., Swennen, G. N. M., Messmer, T., Gagliardi, M., Molin, D. G. M., Li, C., Post, M. J. (2018.): Maintaining bovine satellite cells stemness through p38 pathway. *Scientific Reports*, 8(1), 10808.
46. Dodson, M. V., Allen, R. E., Hossner, K. L. (1985.): Ovine somatomedin, multiplication-stimulating activity, and insulin promote skeletal muscle satellite cell proliferation in vitro. *Endocrinology*, 117(6), 2357-2363.
47. Dodson, M. V., Martin, E. L., Brannon, M. A., Mathison, B. A., McFarland, D. C. (1987.): Optimization of bovine satellite cell-derived myotube formation in vitro. *Tissue and Cell*, Volume 19, Issue 2, 159-166.
48. Doumit, M. E., Merkel, R. A. (1992.): Conditions for isolation and culture of porcine myogenic satellite cells. *Tissue and Cell*, 24(2), 253-262.
49. Doumit, M. E., Cook, D. R., Merkel, R. A. (1993.): Fibroblast growth factor, insulin-like growth factors, and platelet-derived growth factor-BB stimulate proliferation of clonally derived porcine myogenic satellite cells. *Journal of Cell Physiology*, 157:326-332.

50. Du, M., Tong, J., Zhao, J., Underwood, K. R., Zhu, M., Ford, S. P., Nathanielsz, P. W. (2010.): Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *Journal of Animal Science*. 88: E51-E60.
51. Dumont, J., Eewart, D., Mei, B., Estes, S., Kshirsagar, R. (2016.): Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*. 36, 1110-1122.
52. Edelman, P. D., Mc Farland, D. C., Mironov, V. A., Matheny, J. G. (2005.): Commentary: in vitro-cultured meat production. *Tissue Engineering*, 11(5-6): 659-662.
53. Enrione, J., Blaker, J., Brown, D., Weinstein-Opppenheimer, C. R., Pepczynska, M., Olguin, Y., Sanchez, E., Acevedo, C. A. (2017.): Edible scaffolds based on non-mammalian biopolymers for myoblast growth. *Materials*, 10(12): 1404.
54. Ertbjerg, P., Puolanne, E. (2017.): Muscle structure, sarcomere length and influence on meat quality: a review. *Meat Science*., 132:52-139.
55. European Parliament. (2003.): Laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat (commission regulation (EC) No 2075/2005). *Official Journal of the European Union L*, 338:60-82.
56. FAO. (2006.): Livestocks long shadow-environmental issues and options. Rome, Italy: FAO publications, 51:157-157. (izvor: <http://www.fao.org/3/a0701e/a0701e.pdf/>)
57. FAO. (2012.): Livestock sector development for poverty reduction: An economic and policy perspective-livestocks many virtues, 161.
58. FAO. (2013.): World livestock 2013- changing disease landscapes. Rome, Italy: FAO publications. (izvor: <http://www.fao.org/3/i3440e/i3440e>.)
59. Feiner, G. (2006.): *Meat products Handbook*, Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
60. Fraeye, I., Kratka, M., Vandeburgh, H., Thorrez, L. (2020.): Sensorial and Nutritional Aspects of Cultured Meat in Comparison to Traditional Meat: Much to Be Inferred. *Frontiers in Nutrition*, 7.
61. Feldman, J. L., Stockdale, F. E. (1991.): Skeletal muscle satellite cell diversity: Satellite cells form fibers of different types in cell culture. *Developmental Biology*., 143:320-334.
62. Fresheny, R. I. (2015.): *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications*. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, page 6.
63. Fresheny, R. I. (2016.): Appendix II Glossary. Ln: *Culture of animal cells*, sixth edition. Wiley Blackwell, Hoboken, New Jersey, USA, pp 6.

64. Gaurina Srček, V., Radošević, K., Jukić, S., Slivac, I. (2016.): Bioreaktori za uzgoj kultura životinjskih stanica. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* 11(1-2), 18-27.
65. Gayraud-Morel, B., Chretien, F., Flamant, P., Gomes, D., Zammit, P. S., Tajbakhsh, S. (2007.): A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis. *Developmental Biology*, 312(1), 13-28.
66. Gholobova, D., Decroix, L., Van Muylder, V., Desender, L., Gerard, M., Carpentier, G., Vandeburgh, H., Thorrez, L. (2015.): Endothelial network formation within human tissue-engineered skeletal muscle. *Tissue Eng Part A*, 21(19-20):2548-2558.
67. Gholobova, D., Gerard, M., Decroix, L., Desender, L., Callewaert, N., Annaert, P., Thorrez, L. (2018.): Human tissue-engineered skeletal muscle: a novel 3D in vitro model for drug disposition and toxicity after intramuscular injection. *Scientific Reports.*, 1-14.
68. Gibson, M. C., Schultz, E. (1983.): Age related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. *Muscle and Nerve*, 6(8), 574-580.
69. Gillies, A., Lieber, R. (2011.): Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle and Nerve*, 44(3), 318-331.
70. Glorieux, S., Goemaere, O., Steen, L., Fraeye, I., (2017.): Phosphate reduction in emulsified meat products: impact of phosphate type and dosage on quality characteristic. *Food Technology and Biotechnology*, 55:390-7.
71. Glorieux S., Steen, L., van de Walle, D., Dewettinck, K., Foubert, I., Fraeye, I. (2019.): Effect of meat type, animal fat type, and cooking temperature on microstructural and macroscopic properties of cooked sausages. *Food Bioprocess Technology.*, 12:16-26.
72. Gospodarowicz, D., Weseman, J., Moran, J. S., Lindstrom, J. (1976.): Effect of fibroblast growth factor on the division and fusion of bovine myoblasts. *Journal of Cell Biology*, 70(2pt1), 394-405.
73. Godoy-Parejo, C., Deng, C., Liu, W., Chen, G. (2019.): Insulin stimulates PI3K/AKT and cell adhesion to promote the survival of individualized human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 37(8), 1030-1041.
74. Gooch, K. J., Frangos, J. A. (1993.): Shear sensitivity in animal cell culture. *Current opinion in Biotechnology*, 4, 193-196.
75. Greger, M. (2007.) The human/animal interface: Emergence and resurgence of zoonotic infectious diseases. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(4), 243-299.
76. Grinnel, F. (1978.): Cellular adhesiveness and extracellular substrata. *International Review of Cytology*, 53: 65-144.

77. Groux-Muscattelli, B., Bassaglia, Y., Barritault, D., Caruelle, J. P., Gautron, J. (1990.): Proliferating satellite cells express acidic fibroblast growth factor during in vitro myogenesis. *Developmental Biology*, 142(2), 380-385.
78. Guerriero, V., Florini, J. R. (1980.): Dexamethasone effects on myoblast proliferation and differentiation. *Endocrinology*, 106(4):1198-202.
79. Guilak, F., Cohen, D. M., Estes, B. T., Gimble, J. M., Liedtke, W., Chen, C. S. (2009.): Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell*, 5(1), 17-26.
80. Guilbert, L. J., Iscove, N. N. (1976.): Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. *Nature*, 263 (5578), 594-595.
81. Ham, R. G. (1965.): Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 53, 288-293.
82. Handral, H. K., Tay, S. H., Chan, W. W., Choudhury, D. (2020.): 3D printing of cultured meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*, 1-10.
83. Higuchi, K. (1973.): Cultivation of animal cells in chemically defined media, a review. *Advances in Applied Microbiology*. 16:36-111.
84. Hinds, S., Bian, W., Dennis, R. G., Bursac, N. (2011.): The role of extracellular matrix composition in structure and function of bioengineered skeletal muscle. *Biomaterials*, 32(14): 3575-3583.
85. Hocquette, F. (2016.): Is in vitro meat the solution for the future? *Meat Science*, 120:167-176.
86. Hoekstra, A. Y., Chapagain, A. K. (2007.): Water footprints of nations: Water use by people as a function of their consumption pattern. *Water Resources Management*, 21(1), 35-48.
87. Hong, T. K., Shin, D. M., Choi, J., Do, J. T., Han, S. G. (2021.): Current issues and technical advances in cultured meat production: A review. *Food Science of Animal Resources*, 41(3): 355-372.
88. Hu, W., Berdugo, C., Chalmers, J. J. (2011.): The potential of hydrodynamic damage to animal cells of industrial relevance: current understanding. *Cytotechnology* 63, 445-460.
89. Huang, J., Huang, K., You, X., Liu, G., Hollett, G., Kang, Y., Gu, Z., Wu, J. (2018.): Evaluation of tofu as a potential tissue engineering scaffold. *Journal Materials Chemistry B*, 6(9): 1328-1334.
90. Huff, L. E., Zhang, W., Lonergan, S. M. (2010.): Biochemistry of postmortem muscle-lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science.*, 86:95-184.

91. Jairath, G., Mal, G., Gopinath, D., Singh, B. (2021.): A holistic approach to access the viability of cultured meat: A review. *Trends in food science and technology*, 110,700-710.
92. Jennische, E., Skottner, A., Hansson, H. A. (1987.): Satellite cells express the trophic factor IGF-I in regenerating skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, 129(1), 9-15.
93. Jimenez-Colmenero, F., Salcedo-Sandoval, L., Bou, R., Cofrades, S., Herrero, A. M., Ruiz-Capillas, C. (2015.): Novel applications of oil-structuring methods as a strategy to improve the fat content of meat products. *Trends in Food Science and Technology*., 44:88-177.
94. Jiang, J., Xiong, Y. L. (2015.) Role of interfacial protein membrane in oxidative stability of vegetable oil substitution emulsions applicable to nutritionally modified sausage. *Meat Science*, 109:56-65.
95. Jochems, C. E. A., van der Valk, J. B. F., Stafleu, F. R., Baumans, V. (2002.): The use of Fetal Bovine Serum: Ethical or Scientific Problem? *Alternatives to Laboratory Animals*, 30(2), 219-227.
96. Kaneda, T., Greenbaum, C., Kline, K. (2020.): 2020 World population data sheet shows older population growing, total fertility rates declining. Population Reference Bureau.
97. Karunaratne, J. F., Ashton, C. J., Stickland, N. C. (2005.): Fetal programming of fat and collagen in porcine skeletal muscle. *J Anat.*, 207:763-768.
98. Keefe, A. C., Lawson, J. A., Flygare, S. D., Fox, Z. D., Colasanto, M. P., Mathew, S. J., Kardon, G. (2015.): Muscle stem cells contribute to myofibers in sedentary adult mice. *Nature Communications*, 6, 7087.
99. Khodabukus, A., Madden, L., Prabhu, N. K., Koves, T. R., Jackman, C. P., Muoio, D. M., Bursac, N. (2019.): Electrical stimulation increases hypertrophy and metabolic flux in tissue-engineered human skeletal muscle. *Biomaterials*, 198:69-259.
100. Kim, J. H., Han, G. C., Seo, J. Y., Park, I., Park, W., Jeong, H. W., Kong, Y. Y. (2016.): Sex hormones establish a reserve pool of adult muscle stem cells. *Nature Cell Biology*, 18(9), 930-940.
101. Krioprezervacija, Narodne novine. (2010.): Pravilnik o postupku prikupljanja, pohranjivanja i uporabe krvotvornih matičnih stanica (izvor: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_05_59_2010.html).
102. Kolkman, A. M., Post, M. J., Rutjens, M. A. M., van Essen, A. L. M., Moutsatsou, P., (2020.): Serum-free media for the growth of primary bovine myoblasts. *Cytotechnology*, 72(1), 111-120.
103. Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., Rudnicki, M. A. (2007.): Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell*, 129(5), 999-1010.

104. Kumar, A., Starly, B. (2015.): Large scale industrialized cell expansion: Producing the critical raw material for biofabrication processes. *Biofabrication*, 7:44-103.
105. Kupferschmidt, K. (2013.): Lab burger adds sizzle to bid for reserarch funds. *Science*, 341:602-603.
106. Lam, A. T., Li, J., Toh, J. P., Sim, E. J., Chen, A. K., Chan, J. K., Choolani, M., Reuveny, S., Birch, W. R., Oh, S. K. (2017.): Biodegradable poly-e-caprolactone microcarriers for efficient production of human mesenchymal stromal cells and secreted cytokines in batch and fed-batch bioreactors. *Cytotherapy*, 19(3): 419-432.
107. Langelaan, M. L. P., Boonen, K. J. M., Polak, R. B., Frank, P. T., Post, M. J., Schaft, D. W. J. (2010.): Meet the new meat: tissue engineered skeletal muscle. *Trends in Food Science and Technology*. 21:59-66.
108. Larsson, S. C., Wolk, A. (2006.): Meat consumption and risk of colorectal cancer: A meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Cancer*, 119(11), 2657-2664.
109. Lerman, M. J., Lembong, J., Muramoto, S., Gillen, G., Fisher, J. P. (2018.): The evolution of polystyrene as a cell culture material. *Tissue Engineering Part B Reviews*. 24(5): 359-372.
110. Le Grand, F., Jones, A. E., Seale, V., Scime, A., Rudnicki, M. A. (2009.): Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells. *Cell Stem Cell*, 4(6), 535-547.
111. Li, D., Xia, Y. (2004.): Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel? *Advanced Materials.*, 16(14): 1151-1170.
112. Li, H., Wong, Y. S., Wen, F., Ng, K. W., Ng, G. K., Venkatraman, S. S., Boey, F. Y., Tan, L. P. (2013.): Human mesenchymal stem-cell behaviour on direct laser micropatterned electrospun scaffolds with hierarchical structures. *Macromolecular Bioscience.*, 13(3):299-310.
113. Lim, H., Choi, I. Y., Hyun, S. H., Kim, H., Lee, G. (2021.): Approaches to characterize the transcriptional trajectory of human myogenesis. *Cellular Molecular Life Sciences.*, 78(9):4221-4234.
114. Lucas, A. (2019.): Lab-grown meat start-up raises \$14 milion to build production plant (izvor: <https://www.cnbc.com/2019/10/10/future-meat-technologies-a-lab-grown-meat-start-up-raises-14-million-dollars.html>).
115. Lukjanenko, L., Jung, M. J., Hegde, N., Perruisseau-Carrier, C., Migliavacca, E., Rozo, M., Bentzinger, C. F. (2016.): Loss of fibronectin from the aged stem cell niche affects the regenerative capacity of skeletal muscle in mice. *Nature Medicine*, 22(8), 897-905.

116. Lv, Q., Feng, Q. (2006.): Preparation of 3-D regenerated fibroin scaffolds with freeze drying method and freeze drying/foaming technique. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 17(12): 1349-1356.
117. Machida, S., Spangenburg, E. E., Booth, F. W. (2004.): Primary rat muscle progenitor cells have decreased proliferation and myotube formation during passages. *Cell Proliferation*, 37(4), 267-277.
118. MacQueen, L. A., Alver, C. G., Chantre, C. O., Ahn, S., Cera, L., Gonzalez, G. M., O'Connor, B. B., Drennan, D. J., Peters, M. M., Motta, S. E., Zimmerman, J. F., Parker, K. K. (2019.): Muscle tissue engineering in fibrous gelatin: implications for meat analogs. *NPJ Science of Food*, 3(1):1-12.
119. Majmundar, A. J., Lee, D. S., Skuli, N., Mesquita, R. C., Kim, M. N., Yodh, A. G., Simon, M. C. (2015.): HIF modulation of Wnt signaling regulates skeletal myogenesis in vivo. *Development*, 142(14), 2405-2412.
120. Matsuda, R., Spector, D. H., Strohman, R. C. (1983.): Regenerating adult chicken skeletal muscle and satellite cell cultures express embryonic patterns of myosin and tropomyosin isoforms. *Development in Biology*, 100(2):478-488.
121. Metzger, K., Tuchscherer, A., Palin, M. F., Ponsuksili, S., Kalbe, C. (2020.): Establishment and validation of cell pools using primary muscle cells derived from satellite cells of pig skeletal muscle. *In Vitro Cell Development in Biology of Animals*, 56(3):193-199.
122. Miersch, C., Stange, K., Rontgen, M. (2018.): Separation of functionally divergent muscle precursor cell populations from porcine juvenile muscles by discontinuous Percoll density gradient centrifugation. *BMC Cell Biology*, 19(1).
123. Milman, O. (2021.): Meat accounts for nearly 60% of all greenhouse gases from food production, study finds (izvor: <https://www.theguardian.com/environment/2021/sep/13/meat-greenhouses-gases-food-production-study> datum pristupa: 17.12.2021.)
124. Moritz, M. S. M., Verbruggen, S. E. L., Post, M. J. (2015.): Alternatives for large-scale production of cultured beef: A review. *Journal of Integrative Agriculture*, 14:208-216.
125. Motohashi, N., Asakura, A. (2014.): Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2.
126. Mrabet, Y. (2009.): General structure of a continuous stirred-tank type bioreactor (izvor: <https://en.wikipedia.org/wiki/Bioreactor>).
127. Mulvaney, D. R., Marple, D. N., Merkel, R. A. (1988.): Proliferation of skeletal muscle satellite cells after castration and administration of testosterone propionate. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 188(1), 40-45.

128. Neal, A., Boldrin, L., Morgan, J. E. (2012.): The satellite cell in male and female, developing and adult mouse muscle: Distinct stem cells for growth and regeneration. *Plos One*, 7(5), e37950.
129. Nienow, A. W., Rafiq, Q. A., Coopman, K., Hewitt, C. J. (2014.): A potentially scalable method for the harvesting of hMSCs from microcarriers. *Biochemical Engineering Journal*., 85:79-88.
130. Noori, A., Ashrafi, S. J., Vaez-Ghaemi, R., Hatamian-Zaremi, A., Webster, T. J. (2017.): A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *International journal of nanomedicine*, 12:4937-4961.
131. O'Brien, F. J. (2011.): Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 14(3):88-95.
132. Oosterhuis, N. (2017.): Trends in bioreactor design and scale-up of bioprocesses. Presentation at The Third International Conference on Cultured Meat, Maastricht, Nederland.
133. Papenburg, B. J., Liu, J., Higuera, G. A., Barradas, A. M. C., Boer, J., Blitterswijk, C. A., Wessling, M., Stamatialis, D. (2009.): Development and analysis of multi-layer scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 30(31):6228-6239.
134. Parker, J. K., Buettner, A. (2017.): *Springer Handbook of Odor*. Cham: Springer International Publishing, p. 191-221.
135. Perruchot, M. H., Ecolan, P., Sorensen, I. L., Oksbjerg, N., Lefaucheur, L. (2012.): In vitro characterization of proliferation and differentiation of pig satellite cells. *Differentiation*, 84(4), 322-329.
136. Post, M. J. (2012.): Cultured meat from stem cells: challenges and prospects. *Meat Science*., 92(3):297-301.
137. Post, M. J. (2014.): Cultured beef: medical technology to produce food. *Journal of Science Food in Agriculture*, 94:1039-41.
138. Post, M. J., Hocquette, J. F. (2017.): New Sources of Animal Proteins: Cultured Meat. *New Aspects of Meat Quality*, 425-441.
139. Post, M. J., Levenberg, S., Kaplan, D. L., Genovese, N., Fu, J., Bryant, C. J., Negowetti, N., Verzijden, K., Moutsatsou, P. (2020.): Scientific, sustainability and regulatory challenges of cultured meat. *Nature Food* 1, 403-415.
140. Powell, C. A., Smiley, B. L., Mills, J., Vandenberg, H. H. (2002.): Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 283(5):C1557-C1565.

141. Rafiq, Q. A., Coopman, K., Hewitt, C. J. (2013.): Scale-up of human mesenchymal stem cell culture: Current technologies and future challenges. *Current Opinion in Chemical Engineering.*, 2:8-16.
142. Rando, T. A., Blau, H. M. (1994.): Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *Journal of Cell Biology*, 125(6), 1275-1287.
143. Rapraeger, A. C., Krufka, A., Olwin, B. B. (1991.): Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science*, 252(5013), 1705-1708.
144. Rayagiri, S. S., Ranaldi, D., Raven, A., Mohamad Azhar, N. I. F., Lefebvre, O., Zammit, P. S., Borycki, A. G. (2018.): Basal lamina remodeling at the skeletal muscle stem cell niche mediates stem cell self-renewal. *Nature Communications*, 9(1), 1075.
145. Redshaw, Z., McOrist, S., Loughna, P. (2010.): Muscle origin of porcine satellite cells affects in vitro differentiation potential. *Cell Biochemistry and Function*, 28(5), 403-411.
146. Revell, B. (2015.): Meat and milk consumption 2050: The potential for demand-side solutions to greenhouse gas emissions reduction. *EuroChoices*, 14(3), 4-11.
147. Richler, C., Yaffe, D. (1970.): The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Developmental Biology*, 23(1), 1-22.
148. Ridgeway, A. G., Skerjanc, I. S. (2001.): Pax3 is essential for skeletal myogenesis and the expression of Six1 and Eya2. *Journal of Biological Chemistry.*, 1;276(22): 19033-9.
149. Roe, J. A., Baba, A. S., Harper, J. M., Buttery, P. J. (1995.): Effects of growth factors and gut regulatory peptides on nutrient uptake in ovine muscle cell cultures. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A Physiology*, 110(2):107-14.
150. Sanchez-Sabate, R., Sabat'e, J. (2019.): Consumer attitudes towards environmental concerns of meat consumption: A systematic review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(7), 1220.
151. Sanger, J. W. (1974.): The use of cytohalasin B to distinguish myoblasts from fibroblasts in cultures of developing chick striated muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(9), 3621-3625.
152. Schaefer, G. O., Savulescu, J. (2014.): "The Ethics of Producing In Vitro Meat" *Journal of applied philosophy* vol. 31,2: 188-202.
153. Schlater, A. E., De Miranda, M. A., Frye, M. A., Trumble, S. J., Kanatous, S. B. (2019.): Changing the paradigm for myoglobin: a novel link between lipids and myoglobin. *Journal of Applied. Physiology*, 117:307-15.

154. Seah., J. S. H., Sings, S., Tan, L. P. T., Choudhury, D. (2021.): "Scaffolds for the manufacture of cultured meat". *Critical reviews in biotechnology*, 1–13.
155. Shaffer, E. (2020.): Memphis meats sets sights on building a pilot plant. (izvor: <https://www.meatpoultry.com/articles/22509-memphis-meats-sets-sights-on-building-a-pilot-plant>)
156. Simsa, R., Yuen, J., Stout, A., Rubio, N., Fogelstrand, P., Kaplan, D. L. (2019.): Extracellular heme proteins influence bovine myosatellite cell proliferation and the color of cell-based meat. *Foods.*, 8:E521.
157. Shahini, A., Vydiam, K., Choudhury, D., Rajabian, N., Nguyen, T., Lei, P., Andreadis, S. T. (2018.): Efficient and high yield isolation of myoblasts from skeletal muscle. *Stem Cell Research*, 30, 122-129.
158. Singh, B., Mal, G., Gautam, S. K., Mukesh, M. (2019.): Non-meat alternatives. In *advances in animal biotechnology*. Switzerland: Springer Nature, 155-165.
159. Singh, A., Verma, V., Kumar, M., Kumar, A., Sarma, D. K., Singh, B., Jha, R. (2020.): Stem cells-derived in vitro meat: From petri dish to dinner plate. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 9, 1-14.
160. Smith, A., Passey, S., Greensmith, L., Mudera, V., Lewis, M. P. (2012.): Characterization and optimization of a simple, repeatable system for the long term in vitro culture of aligned myotubes in 3D. *J Cell Biochem.*, 113(3):1044-1053.
156. Stanbury, P. F., Whitaker, A., Hall, S. J. (2013.): *Principles of fermentation technology*. 2nd ed. Elsevier; Amsterdam, Nederland: Chapter 1: 1-20.
157. Steinfeld, H. (2004.): The livestock revolution-a global veterinary mission. *Veterinary Parasitology*, 125(1-2):19-41.
158. Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., de Haan, C. (2006.): *Livestocks long shadow: enviromental issues and options*, Rome, Italy, Chapter 2., 23-79.
- xxx. Steinfeld, H., Mooney, H. A., Schneider, F. (2010.): *Livestock in a changing landscape*, Washington D.C: Island Press. Volume 1.
159. Stenn, K. S., Link, R., Moellmann, G., Madri, J., Kuklinska, E. (1989.): Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa* is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *Journal Of Investigave Dermatology*, 93(2), 287-290.
160. Stephens, N., Di Silvio, L., Dunsford, I., Ellis, M., Glencross, A., Sexton, A. (2018.): Bringing cultured meat to market: technical, socio-political, and regulatory challenges in cellular agriculture. *Trend in Food Science and Technology.*, 78:155-166.

161. Stevens, B., Yang, Y., Mohandas, A., Stucker, B., Nguyen, K. T. (2008.): A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B Applied Biomaterials*, 85(2):573-582.
162. Stoker, M., Macpherson, I. (1961.): Studies on transformation of hamster cells by polyoma virus in vitro. *Virology*, 14(3), 359-370.
163. Specht, E. A., Welch, D. R., Rees Clayton, E. M., Lagally, C. D. (2018.): Opportunities for applying biomedical production and manufacturing methods to the development of the clean meat industry. *Biochem Eng J.*, 132:161-168.
164. Suzuki, A., Pelikan, R. C., Iwata, J. (2015.): WNT/beta-catenin signaling regulates multiple steps of myogenesis by regulating step-specific targets. *Molecular and Cellular Biology*, 35(10), 1763-1776.
165. Syverud, B. C., van Dusen, K. W., Larkin, L. M. (2016.): Effects of Dexamethasone on Satellite Cells and Tissue Engineered Skeletal Muscle Units. *Tissue Engineering Part A.*, 22(5-6):480-9.
166. Talawi, M., Rosellini, E., Barbani, N., Cascone, M. G., Rai, R., Saint-Pierre, G., Boccaccini, A. R. (2015.): Strategies for the chemical and biological functionalization of scaffolds for cardiac tissue engineering: a review. *Journal of the Royal Society, Interface*, 12(108):20150254-20150254
167. Tavassoli, H., Alhosseini, S. N., Tay, A., Chan, P. P. Y., Weng, O. S. K., Warkiani, M. E. (2018.): Large-scale production of stem cells utilizing microcarriers: A biomaterials engineering perspective from academic research to commercialized products. *Biomaterials*, 181(): 333-346.
168. Thorrez, L., DiSano, K., Shansky, J., Vandeburgh, H. (2018.): Engineering of human skeletal muscle with an autologous deposited extracellular matrix. *Frontiers in Physiology*, 9:1076.
169. Thorrez, L., Vandeburgh, H. (2019.): Challenges in the quest for "clean meat". *Nature Biotechnology*, 37:215-6.
170. Troy, A., Cadwallader, A. B., Fedorov, Y., Tyner, K., Tanaka, K. K., Olwin, B. B. (2012.): Coordination of satellite cell activation and self-renewal by Par-complex dependent asymmetric activation of p38alpha/beta MAPK. *Cell Stem Cell*, 11(4), 541-553.
171. Tuomisto, H., de Mattos, M. (2011.): Environmental impacts of cultured meat production. *Environmental Science and Technology*, 45:6117-6123.

172. Urciuolo, A., Quarta, M., Morbidoni, V., Gattazzo, F., Molon, S., Grumati, P., Bonaldo, P. (2013.): Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration. *Nature Communications*, 19-64.
173. Vandeburgh, H., Shansky, J., Benesch-Lee, F., Barbata, V., Reid, J., Thorrez, L., Valentini, R., Crawford, G. (2008.): Drug-screening platform based on the contractility of tissue-engineered muscle. *Muscle Nerve*, 37(4): 438-447.
174. Van Elen, W., van Kooten, W., Westerhof, W. (1999.): Industrial production of meat from in vitro cell cultures, WO/1999/031223: Patent.
175. Van Wezel, A. L. (1967.): Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. *Nature*, 216(5110):64-5.
176. Verbruggen, S., Luining, D., van Essen, A., Post, M. J. (2018.): Bovine myoblast cell production in a microcarriers-based system. *Cytotechnology*, 70(2):503-512.
177. Volpato, G., Fontefrancesco, M. F., Gruppuso, P., Zocchi, D. M., Pieroni, A. (2020.): Baby pangolins on my plate: Possible lessons to learn from the COVID-19 pandemic. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 16(1), 19.
178. Vukičević, S., Kleinman, H. K., Luyten, F. P., Roberts, A. B., Roche, N. S., Reddi, A. H. (1992.): Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Experimental Cell Research*, 202(1), 1-8.
179. Wang, Y. X., Dumont, N. A., Rudnicki, M. A. (2014.): Muscle stem cells at a glance. *Journal of Cell Science*, 127(21), 4543-4548.
180. Wang, Z., Cheung, D., Zhou, Y., Han, C., Fennelly, C., Criswell, T., Soker, S. (2014.): An in vitro culture system that supports robust expansion and maintenance of in vivo engraftment capabilities for myogenic progenitor cells from adult mice. *Bioresearch Open Access*, 3(3), 79-87.
181. Warnock, J. N., Al-Rubeai, M. (2006.): Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 45, 1-12.
182. Watson, E. (2019.): FDA Approves Color Additive Petition For Impossible Foods Soy leghemoglobin As It Gears Up For Sept Retail Launch. *Crawley: FOOD Navigator USA*. (izvor: <https://www.foodnavigator-usa.com/Article/2019/07/31/FDA-gives-green-light-to-color-additive-petition-for-Impossible-Foods-soy-leghemoglobin>.)
182. Werinrich, R., Strack, M., Neugebauer, F. (2020.): Consumer acceptance of cultured meat in Germany. *Meat Science*, 162, 107924.

183. West, A. R., Oates, P. S. (2008.): Mechanisms of heme iron absorption: Current questions and controversies. *World Journal of Gastroenterology*, 14:4101-10.
184. Williams, P. (2007.): Nutritional composition of red meat. *Nutrition and Dietetics*, 64:5-7.
185. Wilschut, K. J., Haagsman, H. P., Roelen, B. A. (2010.): Extracellular matrix components direct porcine muscle stem cell behavior. *Experimental Cell Research*, 316(3), 341-352.
186. Yablonka-Reuveni, Z., Quinn, L. S., Nameroff, M. (1987.): Isolation and clonal analysis of satellite cells from chicken pectoralis muscle. *Developmental biology*, 119(1), 252-259.
187. Yin, H., Price, F., Rudnicki, M. A. (2013.): Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiological Reviews*, 93(1), 23-67.
188. Yue, Y., Zhang, L., Zhang, X., Li, X., Yu, H. (2018.): De novo lipogenesis and desaturation of fatty acids during adipogenesis in bovine adipose-derived mesenchymal stem cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal.*, 54:23-31.
189. Xu. X., Sharma. P., Shu. S., Lin. T. S., Ciais. P., Tubiello. F. N., Smith. P., Campbell. N., Jain. A. K. (2021.): Global greenhouse gas emissions from animal-based foods are twice those of plant-based foods. *Nature Food* 2, 724-732.
190. Zhang, H., Hussain, I., Brust, M., Butler, M. F., Rannard, S. P., Cooper, A. L. I. (2005.): Aligned two and three-dimensional structures by directional freezing of polymers and nanoparticles. *Nature Materials*, 4(10): 787-793.
191. Zhu, M. J., Ford, S. P., Nathansielz, P. W., Du, M. (2004.): Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biology of Reproduction.*, 71:1968-1973.

Internet izvori:

<https://www.bbc.com/news/science-environment-23576143> (datum pristupa: 10.12.2021.).

<https://www.theworldcounts.com/challenges/consumption/foods-and-beverages/world-consumption-of-meat/story> (datum pristupa: 13.12.2021.).

https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_05_59_2010.html (datum pristupa: 14.12.2021.).

<https://www.cnbc.com/2019/10/10/future-meat-technologies-a-lab-grown-meat-start-up-raises-14-million-dollars.html> (datum pristupa: 14.12.2021.).

<https://www.meatpoultry.com/articles/22509-memphis-meats-sets-sights-on-building-a-pilot-plant> (datum pristupa: 14.12.2021.).

<https://www.theguardian.com/environment/2021/sep/13/meat-greenhouses-gases-food-production-study> (datum pristupa: 17.12.2021.).

<https://population.un.org/wup/Publications/Files/WUP2> (datum pristupa: 19.12.2021.)

13. SAŽETAK

U posljednjih 30 godina zbog rasta populacije, produljenja životnog vijeka, ali i promjena u prehranbenim navikama stanovništva proizvodnja mesa se udvostručila, a pretpostavlja se da će do 2050. ta brojka doseći 570 milijuna tona. Sve veću potražnju za mesom neće biti moguće zadovoljiti konvencionalnom proizvodnjom kakvu poznajemo danas, najvećim dijelom zbog velikog udjela obradivih površina koju zauzimaju domaće životinje za proizvodnju mesa, no također i zbog stakleničkih plinova, kojeg su i glavni proizvođači, a koji bi se trebali smanjiti u cilju usporavanja klimatskih promjena koje uzrokuju. Kao jedna od alternativa konvencionalnoj proizvodnji mesa predlaže se i proizvodnja mesa iz matičnih stanica domaćih životinja. Ovakva proizvodnja mesa nudi brojne prednosti u odnosu na konvencionalnu, a to se prije svega odnosi na dobrobit životinja i održivost proizvodnje, no isto tako za nju i dalje postoje brojna pitanja, izazovi i nedostaci, koje tek treba premostiti. U diplomskom radu definirana je proizvodnja mesa iz matičnih stanica, te su opisane tehnologije i postupci koji se pri tome koriste, kao i najnovija postignuća u novoj vrsti poljoprivrede nazvanoj "stanični inženjering". Za prikupljanje informacija korištena je relevantna literatura, članci i internetski podaci, a korištene metode su deskripcije, sinteze, dedukcije i analize.

14. SUMMARY

Due to the increase in world population, but also of life span and changes in feeding habits, the meat production has doubled in the last 30 years and it is assumed that it will reach 570 million tons by 2050. This meat demand will not be possible to satisfy by conventional livestock production, mostly due to the large share of soil that livestock occupies, but also because of the greenhouse gases, which the livestock is the main producer of and which need to be decreased to slow down the climate change. Cellular meat, grown from stem cells in a laboratory, has been proposed as one of the alternatives to conventional meat production. This kind of meat production offers several advantages over conventional one, predominantly in animal welfare and production sustainability issues, although still a number of questions, challenges and downsides still exist. In this graduate thesis, cellular meat is defined and technologies of its production are described, together with the newest achievements in the new direction of Animal breeding called “cell engineering”. For the gathering of information relevant literature, papers and internet data have been used and description, synthesis, deduction and analysis were used as methods.

15. POPIS SLIKA

Slika 1. Formiranje skeletnog mišića iz paraksijalnog mezoderma tijekom ljudskog embrionalnog razvoja (Lim i sur., 2021.).

Slika 2. Put miogene diferencijacije mišićnih satelitskih stanica s ekspresirajućim markerima (Hong i sur., 2021.).

Slika 3. Prikaz kvantifikacije broja satelitskih stanica u različitim dijelovima skeletnih mišića (Ding i sur., 2017.).

Slika 4. Prikaz Percoll plus otopine za centrifugiranje (Thermo Fisher Scientific, lijevo) te gradijenata i karakteristika mišićnih stanica svinja odmah nakon njihove izolacije (Miersch i sur., 2018., desno)

Slika 5. Polje arboriziranih i okruglih stanica nakon 2 dana u citohalasinu B (5,4 g/ml). Može se primjetiti da se okrugle stanice skupljaju (Sanger, 1974.).

Slika 6. Prikaz protokola za krioprezervaciju

(izvor: <https://www.stemcell.com/cryopreservation-basics-protocols-and-best-practices-for-freezing-cells>).

Slika 7. Shematski prikaz sustava kulture mišićnog vlakna koji prikazuje sekvencijalnu aktivaciju (plava), proliferaciju (žuta), samoobnavljanje (zelena) i diferencijaciju (ljubičasta) satelitskih stanica (Rayagiri i sur., 2018.).

Slika 8. Shematski prikaz proizvodnje staničnog mesa (Seah i sur., 2021.).

Slika 9. Prikaz tri moguća sustava velikih razmjera za uzgoj goveđeg mesa. Tri metode koje uključuju stanice na mikronosačima u bioreaktoru s mehaničkim miješalom, agregirane stanice u bioreaktoru s mehaničkim miješalom ili upotreba bioreaktora s nabijenim slojem (Moritz i sur., 2015.).

Slika 10. Dostupni materijali nosača koji se koriste za obradu staničnog mesa (Seah i sur. 2021.).

Slika 11. Shemarski prikaz bioreaktora. Preuzeto i prilagođeno (Mrabet Y., 2009.).

Slika 12. Prvi hamburger na svijetu uzgojen u laboratoriju, London 5.8.2013 (izvor: <https://www.bbc.com/news/science-environment-23576143>).

Slika 13. Svinjske mišićne matične stanice uzgajane u 10% FBS-a koji sadrži minimalni esencijalni medij (MEM). Mišićne matične stanice izolirane iz mišića bicepsa femoris 3 dana starosti (Choi i sur. 2020.).

Slika 14. Miogeni potencijal matičnih stanica mišića svinja uzgojenih u SB203580 s dodatkom SkGM-2 (Choi i sur. 2020.).

Slika 15. Izazovi zbog kojih je uzgojeno meso održiva opcija. Preuzeto i prilagođeno prema Jairath i sur. 2021.

Slika 16. Prikaz porasta svjetske proizvodnje mesa od 1961. do 2018 godine. (izvor: <https://ourworldindata.org/meat-production#global-meat-production> (2018.))

Slika 17. Globalne emisije stakleničkih plinova iz hrane životinjskog podrijetla (metričke tone) (Xu i sur. 2021.).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Diplomski sveučilišni studij Zootehnika, smjer Specijalna zootehnika

Diplomski rad

Nove tehnologije u proizvodnji mesa: meso proizvedeno iz matičnih stanica domaćih životinja
Petar Raič

Sažetak:

U posljednjih 30 godina zbog rasta populacije, produljenja životnog vijeka, ali i promjena u prehrambenim navikama stanovništva proizvodnja mesa se udvostručila, a pretpostavlja se da će do 2050. ta brojka doseći 570 milijuna tona. Sve veću potražnju za mesom neće biti moguće zadovoljiti konvencionalnom proizvodnjom kakvu poznajemo danas, najvećim dijelom zbog velikog udjela obradivih površina koju zauzimaju domaće životinje za proizvodnju mesa, no također i zbog stakleničkih plinova, kojeg su i glavni proizvođači, a koji bi se trebali smanjiti u cilju usporavanja klimatskih promjena koje uzrokuju. Kao jedna od alternativa konvencionalnoj proizvodnji mesa predlaže se i proizvodnja mesa iz matičnih stanica domaćih životinja. Ovakva proizvodnja mesa nudi brojne prednosti u odnosu na konvencionalnu, a to se prije svega odnosi na dobrobit životinja i održivost proizvodnje, no isto tako za nju i dalje postoje brojna pitanja, izazovi i nedostaci, koje tek treba premostiti. U diplomskom radu definirana je proizvodnja mesa iz matičnih stanica, te su opisane tehnologije i postupci koji se pri tome koriste, kao i najnovija postignuća u novoj vrsti poljoprivrede nazvanoj "stanični inženjering". Za prikupljanje informacija korištena je relevantna literatura, članci i internetski podaci, a korištene metode su deskripcije, sinteze, dedukcije i analize.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Ivona Djurkin Kušec

Broj stranica: 66

Broj grafikona i slika: 17

Broj tablica: -

Broj literaturnih navoda: 191

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: meso, matične stanice, stanični inženjering

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof.dr.sc. Goran Kušec, predsjednik
2. Izv.prof.dr.sc. Ivona Djurkin Kušec, mentor
3. Izv.dr.sc. Mislav Đidara, član
4. Izv.prof.dr.sc. Dalida Galović, zamjenski član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Vladimira Preloga 1, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
University Graduate Studies Zootehnics, Course Special Zootehnics

Graduate thesis

New technologies in meat production: meat produced from livestock stem cells

Petar Raič

Abstract:

Due to the increase in world population, but also of life span and changes in feeding habits, the meat production has doubled in the last 30 years and it is assumed that it will reach 570 million tons by 2050. This meat demand will not be possible to satisfy by conventional livestock production, mostly because of the large share of soil that livestock occupies, but also because of the greenhouse gases, which the livestock is the main producer of and which need to be decreased to slow down the climate change. Cellular meat, grown from stem cells in a laboratory, has been proposed as one of the alternatives to conventional meat production. This kind of meat production offers several advantages over conventional one, predominantly in animal welfare and production sustainability issues, although still a number of questions, challenges and downsides still exist. In this graduate thesis, cellular meat is defined and technologies of its production are described, together with the newest achievements in the new direction of Animal breeding called “cell engineering”. For the gathering of information relevant literature, papers and internet data have been used and description, synthesis, deduction and analysis were used as methods.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: Assoc.prof.dr.sc. Ivona Djurkin Kušec

Number of pages: 66

Number of figures: 17

Number of tables: -

Number of references: 191

Original in: Croatian

Key words: terrorism, agroterrorism, agents, competent institutions

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. Prof.dr.sc. Goran Kušec, president
2. Assoc.prof.dr.sc. Ivona Djurkin Kušec, supervisor
3. Assoc.prof.dr.sc. Mislav Đidara
4. Assoc.prof.dr.sc. Dalida Galović, substitute member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1