

Djelovanje hidrolizata proteina lana tijekom induciranog oksidacijskog stresa u CHO DP-12 stanicama

Vuksan, Lara

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:249332>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-03**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija**

Lara Vuksan
7777/BT

**DJELOVANJE HIDROLIZATA PROTEINA LANA
TIJEKOM INDUCIRANOG OKSIDACIJSKOG
STRESA U CHO DP-12 STANICAMA**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica HRZZ IP-06-2016-3848

Mentor: prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija**

**Djelovanje hidrolizata proteina lana tijekom induciranog oksidacijskog stresa u CHO DP-12
stanicama**

Lara Vuksan, 0058215035

Sažetak:

Pogača lana bogata je proteinima, a industrijski je slabo iskorištena. U posljednje vrijeme postaje sve zanimljivija za istraživanja, što zbog bogatstva bioaktivnim peptidima s potencijalnim antioksidativnim djelovanjem, tako i zbog prisustva ostalih bioaktivnih komponenata. S obzirom na navedeno, hidrolizati proteina pogače lana imaju potencijal primjene u kulturama životinjskih stanica kao dodatak medijima za uzgoj. Pri tome se koriste kao zamjena za dio seruma, ili pak samo kao dodatan sastojak koji zbog bioaktivnih svojstava može blagotvorno djelovati na stanice u kulturi.

U ovom radu cilj je bio ispitati mogu li pripremljeni hidrolizati proteina iz pogače lana imati protektivno djelovanje na CHO DP-12 stanice tijekom induciranog oksidativnog stresa. Tijekom eksperimenata, stanice su naciepljene u mediju za uzgoj s dodatkom različitih koncentracija hidrolizata proteina lana u rasponu 0,1-5 g/L. Stanice su brojane metodom Trypan Blue, vijabilnost im je određivana MTS metodom, a dobiveni podaci statistički su obrađeni. Provedbom eksperimenta, došlo se je do zaključka da hidrolizat lana dobiven enzimom neutraza i dodan u medij u koncentraciji od 0,5 g/L pokazuje najjače protektivno djelovanje na stanice CHO DP-12 izložene oksidacijskom stresu, dok hidrolizat lana dobiven enzimom alkalaza i u medij dodan u koncentraciji od 0,1 g/L pokazuje blago inhibirajući učinak na stanice izložene oksidacijskom stresu. Međutim, da bi se ovi zaključci potvrdili, potrebno je napraviti još istraživanja na istu temu jer je radova za usporedbu u literaturi vrlo malo.

Ključne riječi: pogača lana, hidrolizati proteina, oksidativni stres, CHO DP-12 stanice

Rad sadrži: 28 stranica, 6 slika, 4 tablice, 23 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Pomoć pri izradi: Marijan Logarušić, mag.ing.

Datum obrane: 13. rujan 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Bioengineering
Laboratory for Cell Technology and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

The effect of flaxseed hydrolysates during induced oxidative stress in CHO cells

Lara Vuksan, 0058215035

Abstract:

Flax cake is rich in proteins, but industrially it has been little used. Recently, it has become more and more interesting for research, due to the wealth of bioactive peptides with potential anti-oxidative effect, as well as the presence of other bioactive components. Considering the above, flax cake protein hydrolysates have the potential to be used in animal cell cultures as an addition to culture media. In doing so, they are used as a substitute for part of the serum, or simply as an additional ingredient that, due to its bioactive properties, can have a beneficial effect on cells in culture.

In this work, the aim was to examine whether prepared protein hydrolysates from flax cake can have a protective effect on CHO DP-12 cells during induced oxidative stress. During the experiments, cells were inoculated in culture medium supplemented with different concentrations of flax protein hydrolysates in the range 0.1-5 g/L. Cells were counted using the Trypan Blue method, their viability was determined using the MTS method, and the obtained data were statistically processed. Through the experiment, it was concluded that flax hydrolysate obtained with the enzyme neutrase and added to the medium at a concentration of 0.5 g/L shows the greatest protective effect on CHO DP-12 cells exposed to oxidative stress, while flax hydrolysate obtained with the enzyme alcalase and added to the medium at a concentration of 0.1 g/L, shows a slightly inhibiting effect on cells exposed to oxidative stress. However, in order to confirm these conclusions, it is necessary to do more research on the same topic because there are very few works available for comparison in the literature.

Keywords: flax cake, protein hydrolysates, oxidative stress, CHO DP-12 cells

Thesis contains: 28 pages, 6 figures, 4 tables, 23 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Višnja Gaurina Srček, Ph.D. Full Professor

Technical support and assistance: Marijan Logarušić, mag.ing

Thesis defended: September 13th, 2022

	Sadržaj	
1	UVOD.....	1
2	TEORIJSKI DIO	3
2.1	KULTURA STANICA	3
2.1.1	MEDIJ ZA UZGOJ	3
2.2	OKSIDACIJSKI STRES U KULTURAMA STANICAMA.....	7
2.3	POGAČA LANA	8
3	EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
3.1	MATERIJALI.....	12
3.1.1	KEMIKALIJE.....	12
3.1.2	OTOPINE I PUFERI	12
3.1.3	UREĐAJI I OPREMA	12
3.1.4	CHO DP-12 STANIČNA LINIJA	13
3.1.5	HIDROLIZATI ULJNE POGAČE LANA	15
3.2	METODE RADA	15
3.2.1	UZGOJ CHO DP-12 STANICA.....	15
3.2.2	BROJANJE STANICA METODOM TRYPAN BLUE	16
3.2.3	ODREĐIVANJE UČINAKA HIDROLIZATA PROTEINA LANA NA PROLIFERACIJU CHO DP-12 STANICA MTS METODOM	17
3.2.4	ODREĐIVANJE UČINAKA HIDROLIZATA PROTEINA LANA NA INDUCIRANI OKSIDACIJSKI STRES U CHO DP-12 STANICA MTS METODOM.....	18
3.2.5	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	18
4	REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1	ODREĐIVANJE UČINAKA HIDROLIZATA PROTEINA LANA NA PROLIFERACIJU CHO DP-12 STANICA	19
4.2	ODREĐIVANJE UČINKA VODIKOVOG PEROKSIDA NA PROLIFERACIJU CHO DP-12 STANICA 21	
4.3	ODREĐIVANJE UČINAKA HIDROLIZATA PROTEINA LANA NA INDUCIRANI OKSIDACIJSKI STRES U CHO DP-12 STANICAMA	22
5	ZAKLJUČCI.....	25
6	POPIS LITERATURE	26

1 UVOD

Kultura životinjskih stanica podrazumijeva uzgoj stanica *in vitro* te omogućava njihovu upotrebu u laboratorijskim istraživanjima, kliničkim ispitivanjima i proizvodnji farmaceutskih proizvoda. Pritom, stanicama je potrebno osigurati uvjete što sličnije onima iz njihovog izvornog okoliša, tj. sve nutrijente i uvjete potrebne za njihov normalan rast i metabolizam. Zbog toga, za uzgoj stanica *in vitro* koristi se tzv. hranjivi medij, a stanice se uzgajaju u sterilnim uvjetima u inkubatorima sa kontroliranom temperaturom i atmosferom (za stanice sisavaca to je 37°C i 5% CO₂).

Hranjivi medij sadrži razne osnovne nutrijente, poput šećera, vitamina, minerala, aminokiselina, faktora rasta. Najčešće korišteni izvor proteina i faktora rasta je fetalni teleći serum i čini važan sastojak hranjivog medija za uzgoj stanica sisavaca *in vitro*. Zbog svojeg sastava bogatog aminokiselinama, faktorima rasta, hormonima, vitaminima, elementima u tragovima i drugim, a i pokazane koristi u praksi, u širokoj je primjeni za velik broj različitih stanica, bez obzira na činjenicu da taj sastav nije posve definiran. Međutim, u posljednje vrijeme, regulatorna tijela savjetuju izbjegavanje njegove upotrebe. Naime, serum se dobiva iz krvi životinja, te zbog očitih etičkih razloga i zdravstvene zabrinutosti zbog njegovog porijekla (postojanje priona, virusa, mikoplazmi poskupljuje procese pročišćavanja u industrijskoj proizvodnji), trend je potraga za njegovom alternativom. Kao takvi, nameću se biljni hidrolizati proteina jer ne postoje niti etički niti zdravstveni problemi uz primjenu istih. No, kako je korištenje seruma uhodano i uobičajeno, i dalje njegovo korištenje prevladava te je potrebno intenzivirati istraživanja o mogućnosti zamjene seruma proteinskim hidrolizatima biljaka.

Lan (*Linum usitatissimum* L.) je biljka uljarica koja se koristi za proizvodnju lanenog ulja. Sjeme ima bogat sastav bioaktivnih komponenti, od masnih kiselina i peptida do polisaharida i lignana. Kako je ulje bogato omega-3 masnim kiselinama, prije svega α-linolenskom kiselinom (ALA), sve je češći suplement u ljudskoj prehrani, pa ga se sve više proizvodi. Nastaje na način da se uljni dio istisne iz sjemena pod velikim pritiskom, a za njim zaostaje suhi ostatak poznat kao pogača lana.

Pogača lana također sadrži brojne bioaktivne spojeve s antioksidativnim svojstvima, poput

proteina, polisaharida i oligosaharida, fenolnih spojeva i, najistraživanijih, lignana, a koji su pokazali potencijalno protektivno djelovanje protiv dijabetesa, karcinoma i kardiovaskularnih bolesti. Iako pogača lana ima velik potencijal za primjenu u ljudskoj prehrani, zasada se većinom smatrala otpadom zbog sadržaja cijanogenih glikozida i fitinske kiseline (Bekhit i sur., 2018).

S obzirom na sve navedeno, cilj ovog rada bio je ispitati potiče li dodatak hidrolizata lana pripremljenih enzimskom hidrolizom s enzimima alkalazom, neutrazom i protamexom u medij za uzgoj CHO DP-12 stanica njihov rast. S obzirom da peptidi prisutni u hidrolizatima posjeduju antioksidacijska svojstva, ispitano je i ima li neki od pripremljenih hidrolizata proteina lana protektivno djelovanje na CHO DP-12 stanice tijekom inducirano oksidacijskog stresa vodikovim peroksidom.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 Kultura stanica

Kako je već spomenuto, kultura stanica obuhvaća svaki uzgoj živih stanica van organizma, tj. *in vitro*. Razlikuje se životinjska kultura stanica i biljna kultura stanica, no u svhu ovog rada okrenut ću se opisu kultura životinjskih stanica. Stanice se mogu izolirati iz tkiva ili organa životinja i ljudi te se nastaviti uzgajati u hranjivom mediju. Pritom, stanice koje se izoliraju iz tkiva ili organa nazivaju se primarna kultura stanica te se postupcima supkultiviranja (precjepljivanja) i imortalizacije prevode u besmrtnu staničnu liniju koja se može neograničeno razmnožavati tj. proliferirati. Kada se stanice ne bi prevele u besmrtne stanične linije, nakon par precjepljivanja stanice bi odumrle zbog ulaska u fazu tzv. replikativne senescencije. Stanice u kulturi mogu rasti adherentno ili suspenzijski. Ako rastu adherentno, znači da neće rasti ako se ne prihvate za podlogu. S druge strane, suspenzijski rast ne ovisi o podlozi i puno je pogodniji za primjenu u industriji. Primjenom tehnologije rekombinantne DNA dobivaju se proizvodne stanične linije. Kao takve, primjenjuju se za dobivanje željenih biotehnoloških proizvoda, ponajviše glikoziliranih proteina, poput monoklonskih protutijela, krvnih proteina, hormona, faktora rasta, imunomodulatora, zatim virusnih cjepiva pa čak i stanica koje se dalje koriste u biomedicinskim istraživanjima, tkivnom inženjerstvu za obnovu tkiva i organa, dijagnostici i slično. Uloga hranjivog medija je osigurati okolinu koja je stanicama potrebna za normalan rast i metabolizam. Pritom je bitan pH medija, zatim osmolarnost, tj. koncentracija otopljenih tvari po litri medija, i nutrijenti koji čine medij. Parametri koji su također bitni, a ne čine medij, jesu temperatura i atmosfera za uzgoj (CO₂ i O₂).

2.1.1 Medij za uzgoj

Medij za uzgoj stanica u *in vitro* uvjetima krucijalan je uvjet koji omogućuje funkcioniranje stanica van organizma. Rad koji je pridonio komercijalnom razvoju hranjivih medija bio je onaj iz 1955. godine istraživača Harryja Eaglea. Prema rezultatima istraživanja provedenog na HeLa i stanicama fibroblasta miša uzgojenih *in vitro*, razvio je tzv. EMEM (*engl. Eagle's Minimum Essential Medium*). Prema Eagleu, za rast i održavanje stanica *in vitro* potrebni su: izvor ugljika (glukoza), 7 esencijalnih vitamina (kolin, folna kiselina, nikotinamid, pantotenska kiselina, piridoksal, tiamin i riboflavin), soli (natrijev klorid, kalijev klorid, natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, natrijev hidrogenkarbonat, kalcijev klorid i magnezijev klorid),

13 esencijalnih aminokiselina (arginin, cistein, glutamin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan, tirozin, valin) uz dodatak male količine proteina seruma. Uz to, u medij se po potrebi može dodati antibiotike penicilin i streptomycin kako bi se izbjegla kontaminacija, ali ako to nije potrebno, dobro je i izostaviti kako ne bi došlo do nastanka rezistentnih sojeva bakterija, a i kako se ne bi omele neke funkcije stanica. U Eagleovom eksperimentu primjećeno je da ako je u mediju koji od sastojaka bio ispod minimalne ustanovljene potrebne koncentracije, stanice su u određenom kratkom vremenu odumrle. Bitno je napomenuti da je uočeno kako rast stanica nije bio zabilježen čak ni u prisutnosti svih 13 esencijalnih aminokiselina i svih 7 vitamina i potrebnih soli, ukoliko u konačni bazalni medij nije dodana mala količina dijaliziranog proteinskog seruma. Na ovom mediju, zabilježen je uspješan rast i humanih stanica epidermalnog karcinoma usne šupljine te nekih drugih vrsta tumora, zatim humanih stanica jetre i bubrega, pa humanih embrionalnih crijevnih stanica i humanih stanica leukemije (Eagle, 1955). Kako postoji puno vrsta stanica, logično je i da postoje brojni i različiti uvjeti koji su za rast pojedinih stanica optimalni. Zato je do današnjeg dana, osim EMEM medija razvijen i DMEM medij (*engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium*). DMEM medij je kompleksnijeg sastava od EMEM medija, koji sadrži minimalne koncentracije nutrijenata potrebnih za rast i održavanje stanica, a u odnosu na EMEM medij sadrži do 2 puta više aminokiselina i do 4 puta više vitamina. Osim toga, u sastav mu se dodaju i željezov nitrat, piruvat pa i neesencijalne aminokiseline poput serina i glicina, a koncentracija glukoze koja se dodaje je čak do 4500 mg/L, dok je za EMEM medij koncentracija glukoze 1000 mg/L. DMEM medij također se nadopunjava proteinima seruma, najčešće fetalnog telećeg seruma (FBS), a uspješno se primjenjuje za uzgoj stanica primarnih fibroblasta, zatim neurona, glija stanica, HUVEC (*engl. Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), stanica glatkog mišićja pa i HeLa stanica, Cos-7 stanica, HEK-293 (*engl. Human Embryonic Kidney Cells*) i PC-12 stanica. Što se tiče pH obje vrste medija, ona je blago kisele do blago lužnate vrijednosti, pH oko 6,8 – 7,4 te se podešava dodatkom natrijevog bikarbonata, čija vrijednost tada doseže između pH 7,6 -8,2. Pravilna temperatura tijekom uzgoja osigurava se u inkubatoru, u kojem je također atmosfera plinova prilagođena uzgoju životinjskih stanica (5% CO₂, 95% O₂). Kako je već rečeno, oba bazalna medija nisu kompletna pa je dodatak seruma potreban.

Iako cjeloviti sastav fetalnog telećeg seruma nije poznat, poznato je da su sastojci koje dodatak seruma u bazalni medij osigurava sljedeći: faktori rasta, koji povećavaju proliferaciju stanica, a i stimuliraju pojedine stanične funkcije, zatim inhibitore proteaza α_1 -antitripsin i α_2 -

makroglobulin, koji završavaju proces tripsinizacije, a i štite stanice od lizosomalnih peptidaza. Kao takve, nisu obavezan sastojak medija za uzgoj stanica, ali su poželjne. Nadalje, serum osigurava hormone koji su u njemu prisutni u različitim koncentracijama. Opće je poznato da su hormoni nužni za normalno funkcioniranje stanica te služe za signalizaciju. U uzgoju životinjskih stanica *in vitro* najvažnijim se je pokazao inzulin bez kojeg stanice ne rastu, a sadrži ga serum. Kako serum može sadržavati i neke druge hormone, poput testosterona, estradiola, tiroksina i progesterona, koji mogu imati utjecaj na rast stanica, obavlja se profiliranje hormona. Sljedeće poznate sastavnice seruma jesu elementi u tragovima, zatim proteini, koji su gradivni blokovi unutar stanica, nosioci manjih komponenata, a smatra se da potiču i prijanjanje stanica za podlogu što je vrlo važno za adherentne kulture, te donedavno zanemarivane masne kiseline koje nisu sastojak niti EMEM niti DMEM bazalnog medija, a poznato je da su gradivne komponente membrana stanica, skladište energije u stanici, i osim toga, služe za signalizaciju i transport unutar stanica. Dakle, postoje pozitivni učinci primjene seruma u kulturi životinjskih stanica, a to su: puferiranje medija, zaštita od proteaza, toksičnih agenasa, smičnih sila i agenasa koji bi pokidali monosloj adherentnih stanica (Thermo Fisher Scientific, 2022). Međutim, razlozi za zamjenu seruma s potencijalnim alternativama su brojni: od cijene i dostupnosti seruma te brojnih testova kontrole koje serum mora proći prije primjene (Tablica 1.), do nepotrebne patnje nerođene teladi, pa sezonskih i kontinentalnih varijacija među različitim šaržama seruma, što pak za sobom vuče fenotipske razlike među različitim pasažama istih staničnih kultura, uzrokujući različite rezultate (van der Valk i sur., 2010). Osim toga, tijekom izolacije proizvoda, dolazi do komplikacija u odvajanju proteina seruma od drugih proteina koji su željeni proizvod upravo zbog životinjskog porijekla proteina seruma i njihove sličnosti u svojstvima, što dodatno poskupljuje postupak proizvodnje. Zbog toga, kada bi se tražila zamjena za serum, bilo bi potrebno ili zasebno dodavati navedene nutrijente i pripremiti tzv. CDM, odnosno kemijski definiran medij (*engl. Chemically Defined Medium*) ili dodati pripravke u bazalni medij koji bi osigurali navedene nutrijente koje osigurava dodatak seruma.

Tablica 1. Postupci kontrole koje je potrebno sprovesti prije korištenja seruma (Thermo Fisher Scientific, 2022)

Zahtjev	Opis zahtjeva
9CFR testiranje na viruse	Testiranje na viruse prema Kodeksu saveznih propisa (eng. Code of Federal Regulations, CFR), naslov 9, dio 113.53 (c) [113.46, 113.47]. Detektirano fluorescentnim antitijelima.
Biokemijsko i hormonalno profiliranje	Kvantifikacija biokemijskog i hormonskog profila koji može imati utjecaj na kulturu stanica (estradiol, inzulin, progesteron, testosteron i tiroksin).
BSE status	BSE (eng. bovine spongiform encephalopathy, u prijevodu goveđa spongiformna encefalopatija) je bolest za koju je OIE (eng. The World Organisation for Animal Health, Svjetska organizacija za zdravlje životinja) uspostavila službeno priznanje sanitarnog statusa zemalja i zona. Regije koje imaju zanemariv rizik od goveđe spongiformne encefalopatije (kravljeg ludila) imaju manji biološki rizik za uvoz.
EMA testiranje na viruse	Testiranje na viruse prema Kodeksu saveznih propisa (eng. Code of Federal Regulations, CFR), naslov 9, dio 113.53 (c) [113.46, 113.47]. Detektirano fluorescentnim antitijelima.
Testiranje na endotoksine	Endotoksin je izravno povezan s kvalitetom prikupljanja i obrade seruma, što je viša razina, to je veći unos gram-negativnih bakterija.
Filtracija	Trostruka (0,1 µm) filtracija: Aseptični postupak koji je validiran kako bi se osiguralo da svi proizvodi zadovoljavaju standardnu industrijsku razinu osiguranja sterilnosti od 10 ⁻³ .
Testiranje na hemoglobin	Pokazatelj ispravnog i/ili neispravnog uzimanja i obrade krvi i/ili seruma.
Testiranje na mikoplazme (eng. H–Stain, H-bojanje)	Izravno bojanje kulture i Hoechst bojanje. Testiranje ukazuje na mikoplazme.

Utvrdjivanje podrijetla	Koristi se tehnologija otiska seruma kako bi se potvrdilo podrijetlo FBS-a i eliminirala mogućnost krivotvorenja proizvoda.
Određivanje osmolarnosti	Osmolalnost FBS-a, mjera koncentracije otopljenih tvari poput soli i šećera, trebala bi biti slična mediju za kulturu kako bi se izbjegao osmotski šok, koji može utjecati na održivost stanica.
Određivanje poticanja rasta (eng. Relative growth promotion, RGP)	Test poticanja rasta mjeri sposobnost svake FBS serije da podrži proliferaciju probirljivih ljudskih diploidnih fibroblasta kroz više subkultura.
Određivanje pH	Serum djeluje kao pufer u sustavu stanične kulture; pH se testira kako bi se osigurala točna kvaliteta i izvedba kulture stanica.
Određivanje ukupne količine proteina	FBS je bogat raznim proteinima koji mogu utjecati na uzgojene stanice; ukupni protein u serumu mjeri se provođenjem grupe kemijskih testova na serumu.
Određivanje sljedivosti, eng. traceability	Potpuna sljedivost do izvornog podrijetla. Certifikat ISIA Traceability.

CFR – Code of Federal Regulations; BSE – bovine spongiform encephalopathy (bolest kravljje ludilo); RGP – relative growth promotion; ISIA

– International Serum Industry Association

2.2 Oksidacijski stres u kulturama stanicama

Reaktivne kisikove vrste (eng. Reactive Oxygen Species, ROS), neovisno o tome nastaju li kao produkt normalnih staničnih funkcija ili su im pak stanice izložene iz nekih drugih izvora, predstavljaju opasnost za stanice koje se nalaze u aerobnom okruženju jer izazivaju oštećenja DNA, proteina ili lipida. Reaktivne kisikove vrste uključuju širok spektar djelomično reduciranih kisikovih metabolita, kao što su superoksidni anion, vodikov peroksid, hidroksilni radikali i drugi. Navedeni spojevi nastaju kao nusproizvod metabolizma aerobnih organizama ili kao molekule uključene u prijenos signala unutar stanice (Palmieri i Sblendorio, 2007).

Medij u kojemu stanice rastu u pravilu sadrži manjak molekula sa antioksidacijskim djelovanjem (npr. vitamini C i E) kao i prekursore molekula s antioksidacijskim djelovanjem

(npr. selen). Stanice za svoj rast zahtijevaju ione prijelaznih metala, posebice željezo i bakar. Samo u slučaju da nisu pročišćene, sve laboratorijske otopine, kao i medij za uzgoj stanica, kontaminirani su navedenim ionima. U neke se medije dodaju anorganske soli metala, dok Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sadrži željezov (III) nitrat ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$). U drugim je medijima željezo dodano u obliku vezanom na transferin te u takvom obliku ne može katalizirati reakcije koje uključuju slobodne radikale (Halliwell, 2003).

2.3 Pogača lana

Kako je već spomenuto, pogača lana nastaje kao nusproizvod industrijske proizvodnje lanenog ulja. Točnije, pogača predstavlja kruti dio koji zaostaje nakon prerade sjemenke lana radi dobivanja lanenog ulja. Laneno ulje dobiva se primjenom sile na cijelo zrno lana, sa ili bez prisustva topline. Razlog zbog kojeg se pogača, koja je adekvatno tretirana, ispituje kao zamjena za serum ili pak dodatak u mediju za uzgoj životinjskih stanica je sastav bogat brojnim bioaktivnim komponentama. Sastav sjemenke lana ovisi o genotipu tj. vrsti sjemenke i o okolišu u kojem je uzgajana, ali generalno, cjelovita sjemenka lana bogata je mastima, topljivim i netopljivim vlaknima, tj. polisaharidima, proteinima te sadrži i malu količinu jednostavnih šećera. Osim toga, sadrži i fenolne spojeve poput lignana te neke antinutritivne komponente poput fitinske kiseline, linatina, kadmija i cijanogenih glikozida. Navedene komponente mogu predstavljati zabrinutost glede korištenja pripravaka lana u prehrani, pa čak i korištenja hidrolizata proteina pogače lana u kulturi stanica, pošto pogača ima koncentriraniji sadržaj antinutritivnih komponenti zbog ekstrakcije ulja. Međutim, u literaturi su dostupne opisane metode detoksifikacije pogače pa uz primjeren predtretman, to ne bi trebalo predstavljati problem. Nakon ekstrakcije ulja, dobiva se uljna i suha frakcija. Cijelo sjeme lana je općeprihvaćeno kao zdrava namirnica u prehrani koja ima antikancerogeno djelovanje, a u tu korist postoje brojna istraživanja. Samo neka od njih pokazala su da brašno sjemenka lana smanjuje brzinu rasta tumora mliječnih žlijezda u ženki štakora (Serraino i Thompson, 1991), zatim da lignani iz lana smanjuju rast tumora mliječnih žlijezda u kasnijim fazama karcinogeneze (Thompson i sur., 1996), a jedna studija pokazala je da zamjena ulja kukuruza sa uljem lana ili zamjena pogače kukuruza sa pogačom lana u bazalnoj prehrani smanjuje dijeljenje i veličinu tumora tankog i debelog crijeva u mužjaka Fisher 344 štakora (Bommareddy i sur., 2008). Osim toga, poznato je da konzumacija proizvoda lana smanjuje aterosklerozu. Tako je u jednom takvom istraživanju pokazano da je konzumacija sjemenka lana

od 50 g/dan tijekom 4 tjedna smanjila razinu LDL kolesterola za 8% u mladih odraslih ljudi (Cunnane i sur., 1995). Uljnata frakcija bogata je omega-3 masnom kiselinom α -linolenskom kiselinom (ALA) (52%), a osim nje linolnom, oleinskom, palmitinskom i stearinskom kiselinom u formi triacilglicerida. Uljnu frakciju čine i manji lipidi poput monoacilglicerida, diacilglicerida, tokoferola, sterola, sterol-estera, klorofila, karoteinoida, voskova, slobodnih masnih kiselina i sličnih. Blagotvorno djelovanje ulja većinom se prepisuje α -linolenskoj kiselini, međutim u većini istraživanja dostupnih u literaturi nije dokazano da se zdravstveni benefiti mogu prepisati samo njoj. Kako ulje u manjoj količini sadrži i ciklolinopeptide, koji imaju određena poznata blagotvorna svojstva, vrlo je vjerojatno da neki benefiti, koji su prepisani lanenom ulju zbog sadržaja ALA, zapravo potiču od ciklolinopeptida. Međutim, ciklolinopeptidi su premalo istraženi i većina ispitivanja sa uljem lana nisu usmjerena na njih. Kako god, poznata su istraživanja koja su dokazala da konzumacija ALA tijekom nekog perioda smanjuje razinu kolesterola u serumu, u jednom takvom za čak 17% do 21% kod zlatnih sirijskih hrčaka, te djeluje na razine upalnih posrednika i markera u organizmu (Yang i sur., 2005).

Što se tiče pogače lana, ona obično sadrži vrlo male zaostale količine ulja, a glavni dio čine proteini te ugljikohidrati, od kojih dio čine lignani. Ugljikohidrate lana velikom većinom čine neprobavljivi ugljikohidrati, a u maloj količini probavljivi ugljikohidrati koji su prisutni uglavnom u obliku topljivog šećera. Neprobavljive ugljikohidrate ili tzv. dijetalna vlakna čine topljiva vlakna, koja čine oko četvrtinu ukupnih ugljikohidrata lana, te netopljiva vlakna, koje čine uglavnom celuloza i lignan. Polisaharidi i oligosaharidi lana posjeduju antitumorsko djelovanje, zahvaljujući svojim antioksidativnim svojstvima. Osim toga, kitoooligosaharidi iz lana pokazali su antimikrobno djelovanje prema patogenim bakterijama i gljivama poput *Candida albicans*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium graminearum* i *Aspergillus flavus*, što je svakako pozitivno svojstvo ukoliko se pogača koristi kao dodatak hranjivom mediju za uzgoj stanica (Xu i sur., 2008). Lignani su kompleksni fenolni spojevi netopljivi u mastima i u lanu su poznati kao kompleks lignana lana (eng. flaxseed lignan complex, FLC), kojeg najvećim dijelom čini sekoizolaricirezinol diglukozid (SDG) (34-38%), zatim glukozid cimetine kiseline (15-21%) i hidroksimetilglutarna kiselina (9,6-11%) (Westcott i Paton, 2001). Zabilježeno je pozitivno djelovanje konzumacije FLC tijekom određenog perioda na razine totalnog kolesterola i LDL kolesterola kod hiperkolesterolemičnih osoba te općenito usporavanje uznapredovanja ateroskleroze u ljudi i drugih sisavaca (Prasad, 2005, 2009a, 2009b; Zhang i sur., 2008). SDG proizveden kemijskom hidrolizom pokazuje slična svojstva kompleksu

lignana lana (FLC), sa mogućnošću sprječavanja razvitka ateroskleroze i dijabetesa (Shim i sur., 2014). Osim lignana, u pogači su prisutni i jednostavni fenolni spojevi, a to su fenolne kiseline poput p-hidroksibenzojeve kiseline, ferulične kiseline, kumarinske i klorogenične kiseline. I lignani i fenolne kiseline poznati su kao jaki antioksidativni spojevi sa antimikrobnim, protuupalnim, antitrombotičkim, antialergijskim i antiaterogenim svojstvima. Proteini pogače lana čine glavninu pogače, a prema kromatografiji molekularnog isključivanja, mogu se podijeliti u dvije grupe: frakcija s velikom molekulskom masom ili linin, i frakcija s malom molekulskom masom ili kolinin. Linin čini 64-66% ukupnih proteina lana, a kolinin oko 34-36%. Aminokiselinski sastav lana je bogat i čini ga ukupno preko 36% esencijalnih aminokiselina, zbog čega bi se pogača potencijalno mogla idealno iskoristiti kao izvor proteina u medijama za uzgoj stanica. Aminokiseline koje većinski prevladavaju jesu asparagin, glutaminska kiselina, leucin i arginin, a aminokiseline koje su rijetke jesu metionin i cistein (Bekhit i sur., 2018). Sastav aminokiselina je prikazan u tablici 2.

Poznato je kako bioaktivni peptidi nastaju tek hidrolizom proteina, bilo kemijskom ili enzimskom metodom. Dakle, tek kada se hidrolizom oslobode iz molekule proteina, peptidi dobivaju bioaktivna svojstva, poput antioksidativnih svojstva i slično. U literaturi je dostupno nekoliko primjera u kojima su hidrolizati proteina pogače lana pripremljeni različitim enzimima imali antioksidacijski efekt. Karamać i sur. (2016) su u eksperimentu pripremili hidrolizate lana s 5 različitih enzima – flavourzyme, alkalaza, papain, tripsin i pankreatin te su mjerili antioksidacijska svojstva pripremljenih hidrolizata. Prema njima, hidrolizat pogače lana pripremljen alkalazom pokazao je najveća antioksidacijska svojstva. U literaturi je trend uistinu takav da hidrolizat proteina pogače lana pripremljen alkalazom posjeduje najveća antioksidacijska svojstva. Isti rezultat dobili su i Logarušić i sur. (2020) koristeći enzime alkalazu, neutrazu i protamex. Prema dostupnim saznanjima, čini se kako bi veličina peptida mogla biti povezana s antioksidacijskim svojstvima hidrolizata proteina. Tako je poznato da manje molekule peptida imaju veći antioksidacijski utjecaj na stanice *in vitro* nego one veće, a isto se je pokazalo točnim u navedenom istraživanju.

Tablica 2. Aminokiselinski sastav pogače lana (g/100g proteina) (Bekhit i sur., 2018)

Aminokiselina	Laboratorijski pripremljena pogača lana
Alanin	5,4
Arginin	11,8
Asparagin	12,5
Cistein	3,8
Glutaminska kiselina	26,3
Glicin	7,0
Histidin	2,9
Izoleucin	5,2
Leucin	6,8
Lizin	4,1
Metionin	2,2
Fenilalanin	5,3
Prolin	5,2
Serin	5,8
Treonin	4,9
Triptofan	1,8
Tirozin	2,9
Valin	5,6

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

- Alkalaza[®] (2,4 Au/g), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
- Neutrase[®] (0,8 Au/g) Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
- Protamex[®], Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Sigma, St. Louis, SAD
- FBS (Fetal Bovine Serum), Gibco BRL, SAD
- MTS reagens (The CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent), Promega, Madison, SAD
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Tripin-plavo, Sigma, St. Louis, SAD
- Tripsin-EDTA, Sigma, St. Louis, SAD
- Vodikov peroksid (30%), Gram-mol, Zagreb, RH

3.1.2 Otopine i puferi

- PBS pufer (pH=7,4)

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,4318 g
Kalij dihidrogenfosfat	0,2372 g
Destilirana voda	Do 1000 mL

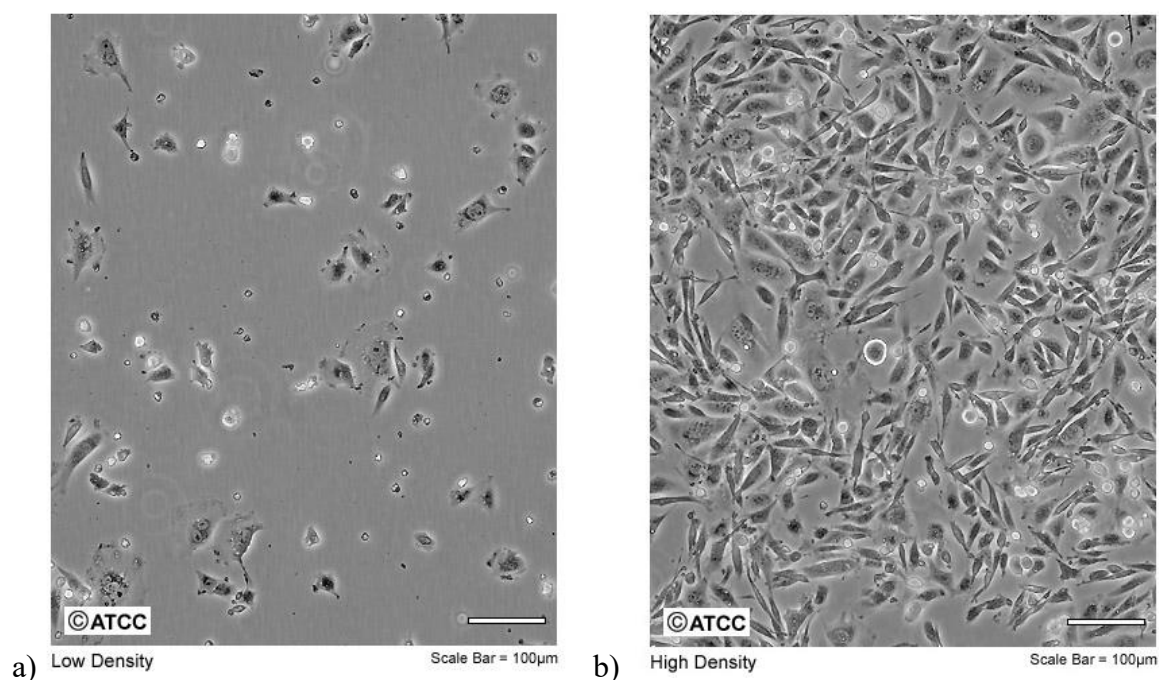
3.1.3 Uređaji i oprema

- Čitač ploča, TECAN, Mannedorf, Švicarska
- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija

- Hladnjak (-80 °C), TT 80 FRYKA, Njemačka
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Iskra PIO, Slovenija
- Komora za sterilni rad (*laminar flow cabinet*), Kambič, Slovenija
- Laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, kivete, epruvete)
- Neubauerova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright - Line, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, Thermo Scientific BioLite, SAD
- Ploče s jažicama, Corning, SAD
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

3.1.4 CHO DP-12 stanična linija

U izradi ovog rada korištena je CHO DP-12 stanična linija koja je adherentna, tj. tijekom rasta se prihvaća za podlogu (Slika 1.). Stanična linija nabavljena je iz banke stanica *American Type Cell Collection* (ATCC) i ima sposobnost proizvodnje rekombinantnih humanih monoklonskih protutijela IL-8. Prema tipu stanice, CHO DP-12 stanice su fibroblastne, a potječu iz ovarija ženke hrčka. Prema uputama dobavljača, stanice je potrebno čuvati smrznute na -80°C, a prilikom primjene u istraživanjima, potrebno ih je držati u kompletnom DMEM mediju sa serumom za što veću vijabilnost stanica, koji se također priprema prema uputama dobavljača. Medij za rast sadržava rekombinantni humani inzulin, koji potiče rast stanica, zatim metotreksat (MTX), koji vrši selektivni pritisak na stanice, pa elemente u tragovima A i B, koji osiguravaju sve ione i minerale potrebne za rast stanica, zatim antibiotik koji služi za zaštitu stanica od kontaminacija, pa fetalni teleći serum koji osigurava aminokiseline, faktore rasta, elemente u tragovima, pa čak i neke potrebne soli za normalan rast i održavanje stanica, a kao zadnji sastojak dodaje se DMEM medij kao bazni medij. Za pripremu 50 ml kompletnog DMEM medija za rast CHO DP-12 adherentnih stanica, omjer sastojaka prikazan je u Tablici 3.



Slika 1. CHO DP-12 stanična linija pod inverznim mikroskopom; a) niska gustoća rasta, b) visoka gustoća rasta (ATCC, 2022)

Tablica 3. Omjer sastojaka za pripremu 50 mL kompletnog DMEM medija za uzgoj CHO DP-12 adherentne stanične linije

Sastojak	Volumen
Rh inzulin	10 µL
MTX	5µL
Elementi u tragovima A	50 µL
Elementi u tragovima B	50 µL
Antibiotik (1%)	500 µL
FBS (5%)	2,5 mL
DMEM	46,9 mL

MTX – metotreksat; FBS – *fetal bovine serum*, fetalni teleći serum

3.1.5 Hidrolizati uljne pogače lana

Hidrolizati uljne pogače lana koji su korišteni u radu pripravljeni su u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF, Zagreb, iz prethodno pripravljenog proteinskog izolata lana korištenjem enzima mikrobnog porijekla alkalaze, neutraze i protamex. Pripravljene su izvorne, stock otopine hidrolizata lana sljedećih koncentracija: hidrolizat lana dobiven enzimom alkalaza koncentracije 69 g/L, hidrolizat lana dobiven enzimom neutraza koncentracije 65.5 g/L, i hidrolizat lana dobiven enzimom protamex u koncentraciji 67 g/L. Dobiveni hidrolizati su za potrebe eksperimenta razrjeđivani u otopine sljedećih koncentracija: od 0,1 g/L, 0,5 g/L, 2,5 g/L i 5 g/L.

3.2 Metode rada

3.2.1 Uzgoj CHO DP-12 stanica

Stanice CHO DP-12 uzgajaju se u inkubatoru pri 37° C s kontroliranom atmosferom CO₂. Čuvaju se u hladnjaku na -80°C u ampulama od 1 mL, u koncentraciji od $1 \cdot 10^7$ st/mL, a uzgoj započinje njihovim odmrzavanjem. Ampula sa stanicama prvo se stavi u vodenu kupelj na 30°C, a zatim se odmrznuti sadržaj ampule sterilno prebaci u kivetu u koju se doda 5 do 10 mL medija za uzgoj CHO DP-12 stanica. Da bi se uklonio medij za zamrzavanje, suspenzija se centrifugira. Nakon centrifugiranja, supernatant se ukloni, a talog stanica resuspendira se u mediju za uzgoj kojem se doda 5% (v/v) seruma (FBS). Nakon toga, suspenzija stanica u mediju sa serumom naciepljuje se u T-boce i stavlja u inkubator. Stanice će se tijekom uzgoja prihvatiti za podlogu, što je pod mikroskopom vidljivo kao izduživanje stanica. Naime, dok stanice slobodno plivaju u mediju, one su okruglog oblika. Tijekom uzgoja bitno je svakodnevno provjeravati izgled stanica, izgled hranjivog medija, koji je ružičaste boje, a promjena boje medija na žuto ukazuje na kontaminaciju. Osim toga, bitno je redovito prihranjivati stanice, tj. mijenjati stari medij, u kojem su potrošene hranjive tvari, za svježi medij kako bi stanice mogle normalno rasti. Stanice se uzgajaju u istoj T-boci sve dok ne prekriju njenu površinu. Tada je potrebno raditi precjepljivanje. Kada stanice izgledaju dobro i prihvaćene su za podlogu, može se raditi precjepljivanje uz primjerene metode.

Precjepljivanje se vrši na način da je stanice prvo potrebno tretirati tripsinom. Tripsin odvaja stanice od podloge, ali isto tako ako bi djelovao predugo, mogao bi naštetiti stanicama. Zato se

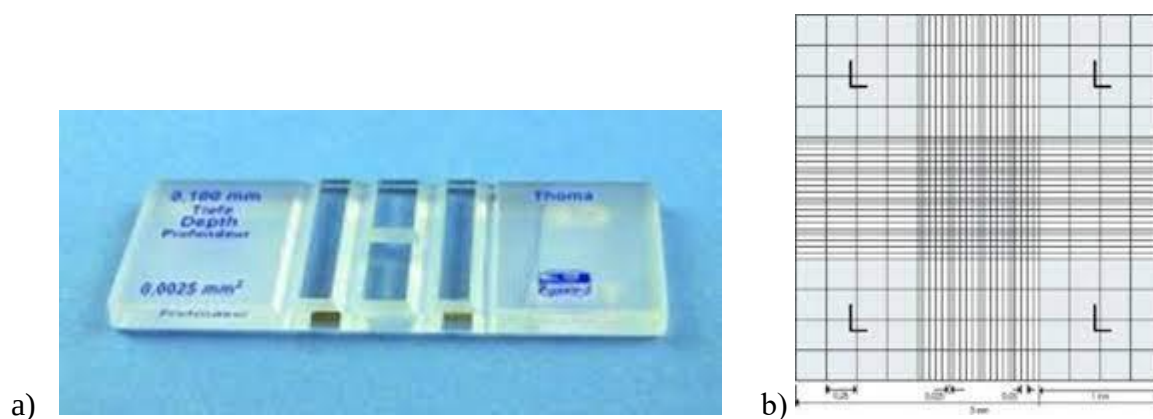
ostavlja da djeluje 5 do 10 minuta, dovoljno da odvoji stanice od podloge. Za to, prvo je potrebno ukloniti sav medij i isprati T-bocu sa PBS-om da ukloni ostatke medija (koji sadrži serum), tako da prekrije površinu boce. Zatim se ukloni PBS i dodaje tripsin, također u količini tek tolikoj da prekrije površinu boce. T-boca stavlja se u inkubator na 5 do 10 minuta, nakon čega se pod inverzim mikroskopom provjerava da li su se stanice odvojile od površine, tj. zaokružile se. Ako jesu, u T-bocu dodaje se medij sa serumom kako bi se spriječilo daljnje djelovanje tripsina. Uzme se inokulum, izbroje se stanice u Neubauerovoj komorici koje se mogu dalje uzgajati ili koristiti za određivanje učinaka hidrolizata.

3.2.2 Brojanje stanica metodom Trypan Blue

Metoda brojanja stanica Trypan Blue omogućuje razlikovanje živih i mrtvih stanica, a temelji se na tome da žive stanice imaju funkcionalnu membranu, koja je s time selektivnija prolazu molekula kroz nju, za razliku od mrtvih stanica čija membrana više nije funkcionalna i s time nije selektivna. Zbog toga, prilikom bojanja stanica bojom Trypan Blue, žive stanice ostaju neobojene jer boja ne može ući u stanicu, a mrtve stanice se oboje plavo. Brojanje se provodi na način da se suspenzija stanica prvo dobro resuspendira kako bi broj stanica po cijelom volumenu suspenzije bio reprezentativan, i zatim se uzima uzorak od 10 μ L, koji se pomiješa sa 10 μ L boje Trypan Blue. Dobivena obojena suspenzija se dobro resuspendira i zatim nanosi na Neubauerovu komoricu (Slika 2. a) na koju je već položeno pokrovno stakalce te se gledaju stanice kroz svjetlosni mikroskop. Neubauerova komorica ima 4 velika kvadrata koji omeđuju iscrtkano polje u obliku križa (Slika 2. b). Svaki veliki kvadrat sastoji se od 16 malih kvadratića, a kada se stanice izbroje u sva 4 velika kvadrata zasebno, uzima se srednja vrijednost broja stanica te se koncentracija stanica u suspenziji računa prema formuli:

$$\text{broj stanica po mL} = \bar{x} * 5000$$

Prilikom provođenja metode, bitno je paziti da se iz posude s bojom ne povlači talog boje jer je tada teško vidjeti stanice na mikroskopu.



Slika 2. a) Neubauerova komorica, b) mreža komorice (KEFO Croatia, 2022)

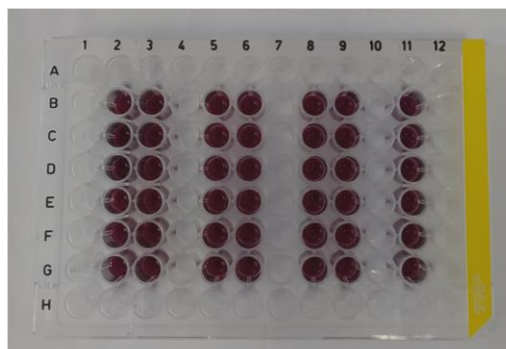
3.2.3 Određivanje učinaka hidrolizata proteina lana na proliferaciju CHO DP-12 stanica MTS metodom

Tetrazolijevu sol koja je dio MTS reagensa reduciraju žive CHO stanice i pritom nastaje formazan koji je obojan i topljiv u hranjivom mediju. Pritom je količina stanica proporcionalna jačini obojenja medija. CHO DP-12 stanice nacijepljene su u ploči s 96 jažica u početnoj koncentraciji od 5×10^4 st/mL. Nakon 24 sata uzgoja u kompletnom mediju za uzgoj dodani su proteinski hidrolizati lana, u koncentracijama kako je prikazano u tablici 4.

Tablica 4. Ispitivane koncentracije hidrolizata proteina lana pripravljene različitim enzimima

Enzim	Koncentracija hidrolizata (mg/mL)			
alkalaza	0,1	0,5	2,5	5,0
neutraza	0,1	0,5	2,5	5,0
protamex	0,1	0,5	2,5	5,0

Izlaganje stanica proteinskim hidrolizatima trajalo je 72 sata, a nakon tretmana, u svaku je jažicu dodano 10 μ L MTS-a. Inkubacija je trajala 4 sata nakon čega je određen intenzitet obojenja pri 492 nm na čitaču ploča (Slika 3.).



Slika 3. CHO DP-12 stanice u kompletnom DMEM mediju sa serumom i dodanim hidrolizatima nakon dodatka MTS-a i spektrofotometrijskog mjerenja (vlastita fotografija)

Preživljenje stanica izraženo je tako što su u odnos stavljene dobivene vrijednosti apsorbancije za tretirane i netretirane stanice.

3.2.4 Određivanje učinaka hidrolizata proteina lana na inducirani oksidacijski stres u CHO DP-12 stanica MTS metodom

Nakon što je utvrđeno koji hidrolizat proteina lana posjeduje stimulirajući učinak na proliferaciju CHO DP-12 stanica, ispitan je njegov eventualni protektivni učinak na inducirani oksidacijski stres s H_2O_2 . Stanice su najprije bile izložene djelovanju vodikovog peroksida u rasponu koncentracija 200-1000 μM kako bi se utvrdila koncentracija koja izaziva oksidativni stres u stanicama. Nakon toga, stanice su nacijepljene u ploče s 96 jažica, predtretirane 4 h s odabranim hidrolizatima proteina lana te su nakon toga 18 h bile izložene djelovanju 800 μM vodikovog peroksida. Vijabilnost stanica nakon tretmana određena je MTS metodom na način kako je opisano u poglavlju 3.2.3.

3.2.5 Statistička obrada podataka

Podaci su obrađeni statistički u excelu i prikazani su ako standardna devijacija i srednja vrijednost, koji se računaju prema sljedećim formulama:

Srednja vrijednost :
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

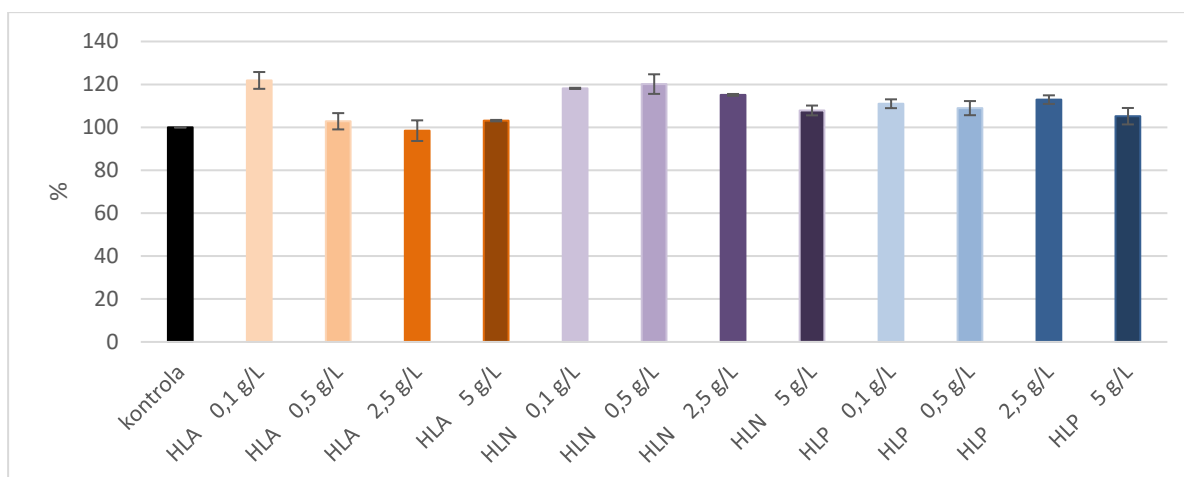
Standardna devijacija:
$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

4 REZULTATI I RASPRAVA

Za uzgoj kultura životinjskih stanica koristi se hranjivi medij koji sadrži osnovne nutrijente poput šećera, aminokiselina, soli, hormona, faktora rasta i dr. Kao najčešće korišteni izvor faktora rasta koristi se fetalni teleći serum. Zbog svojeg sastava bogatog aminokiselinama, faktorima rasta, hormonima, vitaminima, elementima u tragovima i dr., fetalni teleći serum pogodan je za uzgoj velikog broja različitih stanica, bez obzira na činjenicu da njegov sastav nije u potpunosti definiran. Međutim, u posljednje vrijeme, regulatorna tijela savjetuju izbjegavanje upotrebe seruma u biofarmaceutskoj proizvodnji pa je u trendu potraga za njegovom zamjenom. Kao jedna od mogućnosti njegove zamjene su biljni hidrolizati proteina budući da ne postoje niti etički niti zdravstveni problemi primjene istih. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati potiče li dodatak hidrolizata proteina lana pripremljenih enzimima alkalazom, neutrazom i protamexom u medij za uzgoj CHO DP-12 stanica njihov rast. S obzirom da peptidi prisutni u hidrolizatima posjeduju antioksidacijska svojstva, ispitano je i pokazuje li neki od pripremljenih hidrolizata proteina lana protektivno djelovanje na CHO DP-12 stanice tijekom inducirano oksidacijskog stresa vodikovim peroksidom.

4.1 Određivanje učinaka hidrolizata proteina lana na proliferaciju CHO DP-12 stanica

Na početku eksperimenta, bilo je potrebno ispitati učinke dobivenih hidrolizata lana na rast CHO DP-12 stanica. Uvjeti eksperimenta bili su takvi da su stanice najprije uzgajane 24 sata u kompletnom DMEM mediju s dodatkom 5% seruma, a nakon 24 sata, stanicama su dodani hidrolizati u rasponu koncentracija 0,1-5 g/L, a kontrolne stanice su uzgajane samo uz dodatak 5% seruma. Stanice su uzgajane u tim uvjetima kroz 72 sata, u tri paralelna uzorka. Nakon toga, pristupilo se mjerenju vijabilnosti stanica MTS metodom, koja je opisana ranije u poglavlju 3.2.3. Rezultati određivanja vijabilnosti stanica prikazani su na slici 4.

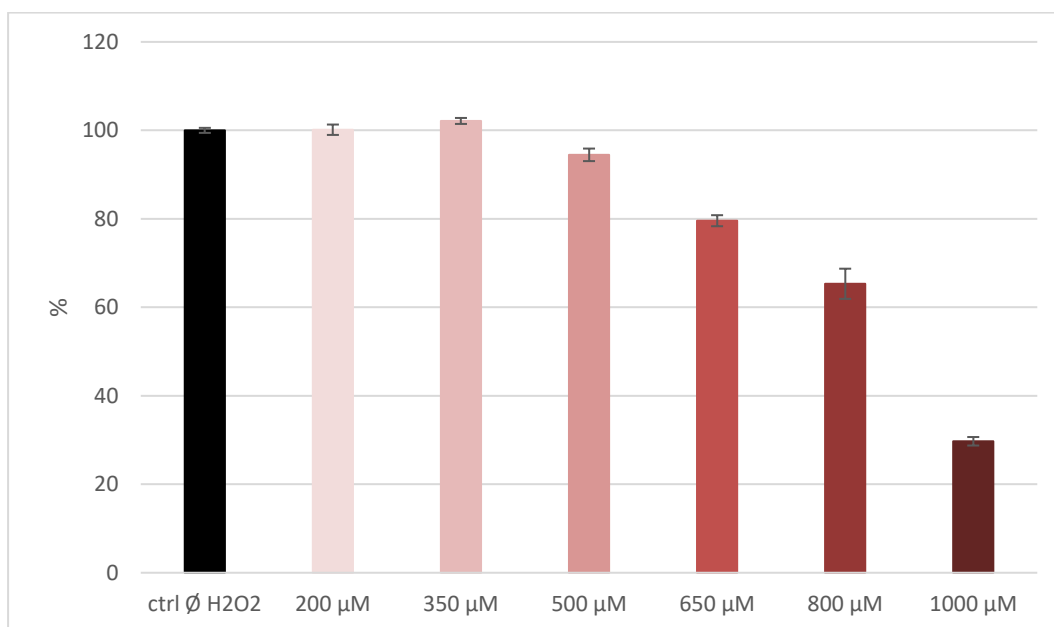


Slika 4. Vijabilnost stanica CHO DP-12 u ovisnosti o koncentraciji pripremljenih hidrolizata lana; HLA – hidrolizat lana dobiven alkalazom, HLN – hidrolizat lana dobiven neutrazom, HLP – hidrolizat lana dobiven protamexom

Na temelju dobivenih rezultata može se vidjeti kako je dodatak hidrolizata lana pripremljen enzimom alkalazom u koncentraciji 0,1 g/L rezultirao stimulirajućim rastom od 21,85% u odnosu na kontrolne stanice. Hidrolizat lana dobivenog alkalazom u koncentraciji od 2,5 g/L pokazao je vrlo blag inhibirajući učinak. Hidrolizat lana dobiven neutrazom u koncentraciji od 0,5 g/L pokazao je stimulacijski učinak od 20,15% u odnosu na kontrolu. Hidrolizat dobiven enzimom protamex imao je najpovoljnije djelovanje od 12,91% pri koncentraciji od 2,5 g/L. Dobiveni rezultati djelomično su u skladu s rezultatima istog eksperimenta koji su proveli Logarušić i sur. (2021). Naime, u njihovom eksperimentu, najbolji utjecaj na rast stanica pokazao je dodatak hidrolizata pripremljenog alkalazom u koncentraciji od 0,5 g/L. U istom radu, dodatak hidrolizata proteina lana pripremljenog enzimom neutrazom i protamexom pokazao je najbolji učinak u koncentraciji od 0,1 g/L za razliku od naših dobivenih rezultata. Različita istraživanja koja su provedena u svrhu ispitivanja stimulacijskog učinka proteinskih hidrolizata iz različitih biljnih izvora upućuju da parametri poput porijekla ishodne sirovine, odabira enzima i trajanja vremena hidrolize proteina imaju ključnu ulogu u dobivanju biološki aktivnih proteinskih hidrolizata. Općenito, kada se hidrolizati koriste kao dodatak mediju za uzgoj, od iznimne je važnosti odrediti njegovu optimalnu koncentraciju koja će doprinijeti rastu i vijabilnosti stanica budući da visoke koncentracije hidrolizata mogu imati inhibitoran utjecaj na rast stanica zbog narušavanja ravnoteže hranjivih tvari u mediju uslijed vrlo visoke koncentracije aminokiselina i oligopeptida (Chun i sur., 2007).

4.2 Određivanje učinka vodikovog peroksida na proliferaciju CHO DP-12 stanica

Tijekom ovog eksperimenta nastojalo se je ispitati koja koncentracija vodikovog peroksida ima citotoksičan učinak na proliferaciju CHO DP-12 stanica. Stanice su naciepljene u ploče s jažicama i nakon 24 h od naciepljivanja tretirane su 24 h vodikovim peroksidom u rasponu koncentracija 200-1000 μM . Kontrolne stanice su uzgajane u DMEM mediju s 5% seruma. Vijabilnost stanica određena je MTS metodom, a rezultati su prikazani na slici 5.

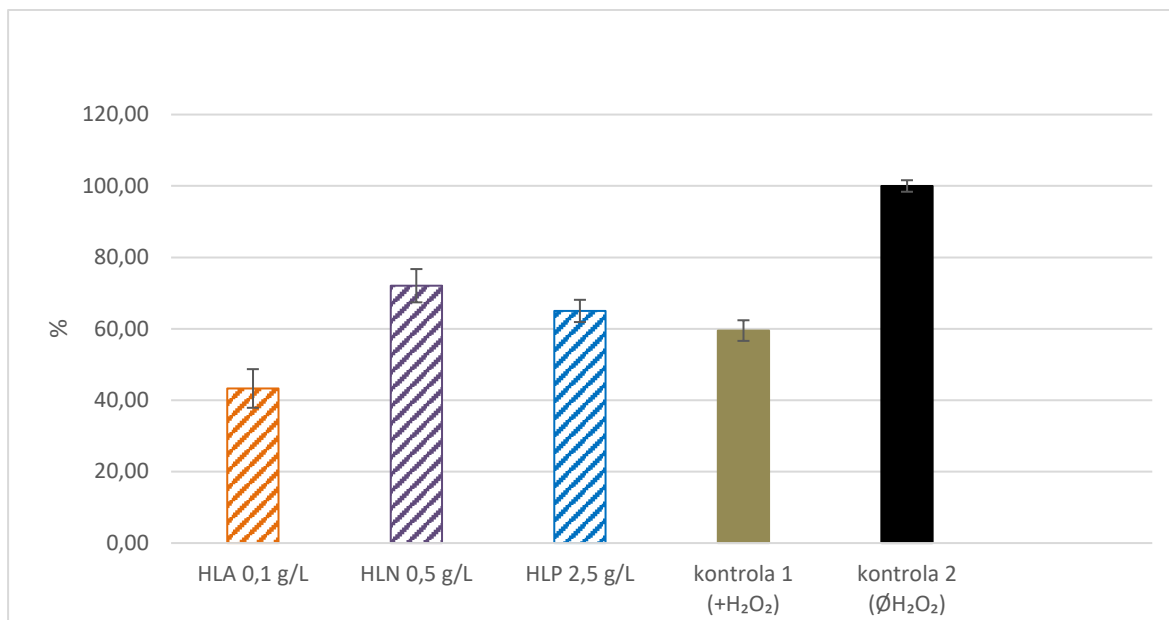


Slika 5. Vijabilnost CHO DP-12 stanica tretiranih vodikovim peroksidom u koncentracijama 200-1000 μM .

Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da koncentracije vodikovog peroksida od 200 μM i 350 μM ne pokazuju inhibirajuće djelovanje na rast stanica. Tek povećanjem koncentracije na 500 μM dolazi do lagane inhibicije rasta stanica (5,5% u odnosu na kontrolu). Očekivano, značajnije inhibirajuće djelovanje započinje od 650 μM , gdje je preživljenje stanica manje za 20,4% u odnosu na kontrolu. Kod koncentracije vodikovog peroksida od 800 μM , preživljenje stanica je manje za 34,7% u odnosu na kontrolu. Najveća inhibicija rasta je kod koncentracije vodikovog peroksida od 1000 μM , gdje je preživljenje stanica iznosilo tek 29,7%. Sličan učinak ovisan o koncentraciji dodanog vodikovog peroksida na proliferaciju PC-12 stanica objavili su Zhang i sur. (2012) budući da vodikov peroksid prolazi kroz staničnu membranu i izaziva oštećenja i smrt stanica.

4.3 Određivanje učinaka hidrolizata proteina lana na inducirani oksidacijski stres u CHO DP-12 stanicama

U skopu ovog dijela eksperimenata, nastojalo se ispitati imaju li dodaci hidrolizata proteina lana u koncentracijama koje su pokazale stimulacijske učinke na proliferaciju stanica (0,1 g/L za hidrolizat lana dobiven enzimom alkalaza; koncentracija 0,5 g/L za hidrolizat lana dobiven enzimom neutraza i 2,5 g/L za hidrolizat lana dobiven enzimom protamex) protektivno djelovanje na stanice CHO DP-12 izložene oksidativnom stresu. Stanicama su nakon 24 sata uzgoja u DMEM mediju sa 5% seruma dodani hidrolizati u gore navedenim koncentracijama te je tretman trajao 4 sata. Nakon toga, stanice su tretirane vodikovim peroksidom u koncentraciji od 800 μ M tijekom 18 sati. Nakon toga, u medij sa stanicama dodan je MTS reagens, koji je ostavljen da djeluje 4 sata te je izmjerena apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 492 nm. Tijekom ovog eksperimenta, postojale su dvije kontrole: prva kontrola bile su stanice u DMEM mediju sa serumom i uz dodatak 800 μ M vodikovog peroksida, dok su druga kontrola stanice uzgojene u DMEM mediju sa serumom bez dodatka vodikovog peroksida, a obje su služile kao provjera validnosti dobivenih rezultata. Grafički prikaz ovisnosti vijabilnosti stanica uz dodatak hidrolizata pri oksidacijskom stresu prikazan je na slici 6.



Slika 6. Utjecaj odabranih koncentracija proteinskih hidrolizata lana tijekom oksidacijskog stresa u CHO DP-12 stanicama

HLA – hidrolizat lana dobiven enzimom alkalaza, HLN – hidrolizat lana dobiven enzimom neutraza, HLP – hidrolizat lana dobiven enzimom protamex; Ø H₂O₂ – DMEM medij sa 5% seruma bez vodikovog peroksida, + H₂O₂ – DMEM medij sa 5% seruma i 800 µM vodikovog peroksida

Iz dobivenih rezultata, može se vidjeti da je vijabilnost kontrolnih stanica uz dodatak 800 µM vodikovog peroksida slična vrijednosti u eksperimentu opisanom u poglavlju 4.2. Što se tiče djelovanja hidrolizata na rast stanica u oksidacijskom stresu, hidrolizat lana dobiven enzimom neutraza u koncentraciji od 0,5 g/L pokazao je najveće protektivno djelovanje na stanice CHO DP-12, uz 12,57 % veće preživljenje stanica u odnosu na kontrolne stanice. Nešto manje protektivno djelovanje pokazao je hidrolizat lana dobiven enzimom protamex u koncentraciji od 2,5 g/L, uz preživljenje stanica veće tek za 5,5% u odnosu na kontrolne stanice. Hidrolizat lana dobiven enzimom alkalaza u koncentraciji od 0,1 g/L pokazao je pak inhibirajuće djelovanje na rast CHO DP-12 stanica u oksidacijskom stresu, sa smanjenim preživljenjem od čak 16,22% u odnosu na stanice iz kontrole 1. U literaturi ne postoje podaci koji istražuju protektivno djelovanje hidrolizata lana na CHO DP-12 stanice. Istraživanje djelovanja hidrolizata lana tijekom oksidacijskog stresa na HeLa i HaCaT stanicama, objavili su Logarušić i sur. (2020). Prema toj studiji, najveće djelovanje na vijabilnost HaCaT stanica u oksidacijskom stresu pokazao je hidrolizat lana dobiven alkalazom što ukazuje na različitost

djelovanja istog hidrolizata na različitim staničnim linijama. Istraživanja koja su proveli Zhang i sur. (2012) pokazala su protektivni učinak hidrolizata pšenice tijekom induciranog oksidacijskog stresa u PC-12 stanicama na način da su kao i u našem istraživanju povećali preživljenje stanica.

Pozitivni učinci biljnih hidrolizata na rast različitih staničnih linija su evidentirani i neosporni. U daljnjim istraživanjima trebalo bi se usredotočiti na utvrđivanje bioaktivnih komponenti koje potiču rast stanica kako bi se mogle koristiti kao sastojak medija za uzgoj sa ciljem poboljšanja rasta i produktivnosti industrijski značajnih staničnih linija. Također, pozitivan učinak koji imaju biljni hidrolizati u biotehnološkoj primjeni stanica može poslužiti kao smjernica i za iskorištavanje (otpadnih) sirovina biljnog porijekla te na taj način doprinijeti njihovoj valorizaciji.

5 ZAKLJUČCI

1. Svi ispitani hidrolizati proteina lana pokazali su stimulacijski učinak na proliferaciju CHO DP-12 stanica. Hidrolizat lana pripremljen enzimom alkalazom u koncentraciji od 0,1 g/L pokazao je najveće stimulatorno djelovanje na rast CHO DP-12 stanica (+21,85%).
2. Prilikom tretmana CHO DP-12 stanica vodikovim peroksidom, koncentracija od 800 μ M izaziva inhibiciju rasta od 34,7% i odabrana je za indukciju oksidacijskog stresa u stanicama.
3. Najveće protektivno djelovanje na CHO DP-12 stanice izložene oksidacijskom stresu pokazao je hidrolizat lana dobiven enzimom neutraza u koncentraciji od 0,5 g/L.
4. Učinci biljnih hidrolizata u biotehnološkoj primjeni stanica mogu poslužiti kao smjernica za iskorištavanje (otpadnih) sirovina biljnog porijekla te na taj način doprinijeti njihovoj valorizaciji.

6 POPIS LITERATURE

- Bekhit, A.E.A.; Shavandi, A.; Jodjaja, T.; Birch, J.; Teh, S.; Mohamed Ahmed, I.A. i sur. (2018) Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **13**, 129-132. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1878818117306059>
- Bommareddy, A.; Zhang, X.; Schrader, D.; Kaushik, R.S.; Zeman, D.; Matthees, D.P. i sur. (2008) Effects of Dietary Flaxseed on Intestinal Tumorigenesis in Apc^{Min} Mouse. *Nutrition and Cancer* **61**, 2, 276-283. <https://doi.org/10.1080/01635580802419764>
- Chun, B.H.; Kim, J.H.; Lee, H.J.; Chung, N. (2007) Usability of size-excluded fractions of soy protein hydrolysates for growth and viability of Chinese hamster ovary cells in protein-free suspension culture. *Bioresource Technology* **98**, 1000-1005.
- Cunnane, S.C.; Hamadeh, M.J.; Liede, A.C.; Thompson, L.U.; Wolever, T.M.; Jenkins, D.J. (1995) Nutritional attributes of traditional flaxseed in healthy young adults. *The American Journal of Clinical Nutrition* **61**, 1, 62-68. <https://doi.org/10.1093/ajcn/61.1.62>
- Eagle, H. (1955) Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture. *Science* **122**, 3168, 501-504. <https://www.jstor.org/stable/1751011>
- Halliwell, B. (2003) Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Lett.* **540**, 3-6.
- Karamać, M.; Kosinska-Cagnazzo, A; Kulczyk, A. (2016) Use of Different Proteases to Obtain Flaxseed Protein Hydrolysates with Antioxidant Activity. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 1027, 5-6. <https://www.mdpi.com/1422-0067/17/7/1027/htm>
- Logarušić, M.; Gaurina Srček, V.; Berljavac, S.; Leboš Pavunc, A.; Radošević, K.; Slivac, I. (2021) Protein Hydrolysates from Flaxseed Oil Cake as a Media Supplement in CHO Cell Culture. *Resources* **10**, 59, 7. <https://www.mdpi.com/2079-9276/10/6/59>
- Logarušić, M.; Radošević, K.; Bis, A.; Panić, M.; Slivac, I.; Gaurina Srček, V. (2020) Biological Potential of Flaxseed Protein Hydrolysates Obtained by Different Proteases. *Plant Foods for Human Nutrition* **75**, 521. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11130-020-00841-z>
- Palmieri, B., Sblendorio, V., (2007) Oxidative stress tests: overview of reliability and use. *Eur.Rev. Med. Pharmacol.* **11**, 309-342.

- Serraino, M.; Thompson, L.U. (1991) The effect of flaxseed supplementation on early risk markers for mammary carcinogenesis. *Cancer Letters* **60**, 2, 135-142. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(91\)90220-C](https://doi.org/10.1016/0304-3835(91)90220-C)
- Shim, Y.Y.; Gui, B.; Arnison, P.G.; Wang, Y.; Reaney, M.J.T. (2014) Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends in Food Science and Technology* **38**, 5-10.
- van der Valk, J.; Brunner, D.; De Smet, K.; Fex Svenningsen, A.; Honegger, P.; Knudsen, L.E. i sur. (2010) Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro* **24**, 1054–1057. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0887233310000809?via%3Dihub>
- Thermo Fisher Scientific (2022) Understand the Basics of Fetal Bovine Serum (FBS). <https://tinyurl.com/4czwwze8>. Pristupljeno 28.kolovoza 2022.
- Thompson, L.U.; Seidl, M.M.; Rickard, S.E.; Orcheson, L.J.; Fong, H.H.S. (1996) Antitumorigenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed. *Nutrition and Cancer* **26**, 2, 159-165. <https://doi.org/10.1080/01635589609514472>
- Westcott, N. D., & Paton, D. (2001). Complex containing lignan, phenolic and aliphatic substances from flax and process for preparing. Patent US6264853.
- Xu,Y.; Hall 3rd, C.; Wolf-Hall, C. (2008) Antifungal activity stability of flaxseed protein extract using response surface methodology. *Food Science* **73**, M9-M14.
- Yang, L.; Leung, K.Y.; Cao, Y.; Huang, Y.; Ratnayake, W.M.N.; Chen, Z.Y. (2005) α-Linoleic acid but not conjugated linolenic acid is hypocholesterolaemic in hamsters. *British Journal of Nutrition* **93**, 433-438.
- Prasad, K. (2005) Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. *Atherosclerosis* **179**, 2, 269-275. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.11.012>
- Prasad, K. (2009a) Flax Lignan Complex Slows Down the Progression of Atherosclerosis in Hyperlipidemic Rabbits. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* **14**, 1, 38-38. <https://doi.org/10.1177/1074248408330541>
- Prasad, K. (2009b) Flaxseed and cardiovascular health. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **54**, 369-377.

Zhang, W.; Wang, X.; Liu, Y.; Tian, H.; Flickinger, B.; Empie, M.W. i sur. (2008) Dietary flaxseed lignan extract lowers plasma cholesterol and glucose concentrations in hypercholesterolemic subjects. *British Journal of Nutrition* **99**, **6**, 1301-1309. <https://doi.org/10.1017/S0007114507871649>

Zhang, Q.X.; Ling, Y.F.; Sun, Z.; Zhang, L.; Yu, H.X.; Kamau, S.M.; Lu, R.R. (2012) Protective effect of whey protein hydrolysates against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on PC12 cells. *Biotechnol Lett.* **34**, 2001-2006.

Izjava o izvornosti

Ja Lara Vuksan izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Lara Vuksan

Vlastoručni potpis