

Hidrogelovi od pektina i proteina lana kao stanični nosači

Maltarski, Matija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:762428>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, veljača 2024.

Matija Maltarski

**HIDROGELOVI OD PEKTINA I
PROTEINA LANA KAO STANIČNI
NOSAČI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Igora Slivca.

Od srca se zahvaljujem mentoru, prof. dr. sc. Igoru Slivcu, na stručnim savjetima, pomoći pri provedbi istraživanja te iskazanom povjerenju.

Također, zahvaljujem svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na izrazitoj susretljivosti i ugodnoj radnoj atmosferi.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju i podršci tijekom studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

HIDROGELOVI OD PEKTINA I PROTEINA LANA KAO STANIČNI NOSAČI

Matija Maltarski, univ. bacc.ing. biotechn.
0058206653

Sažetak: Zbog važnosti staničnih nosača u različitim granama znanosti, medicine i industrije došlo je do porasta interesa za pronalaskom nosača koji bi se mogli izraditi jednostavnim metodama korištenjem jeftinih sirovina. Pritom je velika pozornost posvećena hidrogelovima budući da pokazuju iznimno dobra fizikalno-kemijska i biološka svojstva koja ih čine potencijalno superiornima u odnosu na druge oblike nosača. Cilj ovog rada bila je izrada hidrogelova od pektina i proteina lana, uz dodatak hidrolizata kolagena, koji bi se potencijalno mogli koristiti kao stanični nosači. Hidrogelovi su dobiveni termičkom obradom otopine pektina (5 %, w/v) s dodatkom proteina lana i/ili hidrolizata kolagena (5,3 %, w/v), uz naknadno geliranje pomoću kalcijevih iona. Rezultati analize izrađenih gelova pokazali su da dodatak proteina lana i hidrolizata kolagena ima negativan utjecaj na mehanička svojstva hidrogelova, ubrzava njihovo isušivanje i usporava bubrenje, a nema utjecaja na citoadhezivna svojstva. Izrađeni hidrogelovi nisu citotoksični, ali se zbog loših citoadhezivnih svojstava ne mogu koristiti kao stanični nosači.

Ključne riječi: *hidrogel, pektin, proteini lana, HaCaT stanična linija*

Rad sadrži: 46 stranica, 14 slika, 4 tablice, 45 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Igor Slivac

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Igor Slivac (mentor)
3. prof. dr. sc. Dubravka Novotni (član)
4. izv. prof. dr. sc. Teuta Murati (zamjenski član)

Datum obrane: 26. veljače 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Culture Technology and Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

PECTIN AND FLAXSEED PROTEIN HYDROGELS AS CELL SCAFFOLDS

Matija Maltarski, univ. bacc.ing. biotechn.
0058206653

Abstract: Due to the importance of cell scaffolds in various branches of science, medicine and industry, there has been a growing interest in finding scaffolds that could be made using simple methods and cheap raw materials. Great attention is paid to hydrogels since they exhibit exceptionally good physico-chemical and biological properties that make them potentially superior to other forms of scaffolds. The aim of this study was to produce pectin and flaxseed protein hydrogels, with the addition of collagen hydrolysate, which could potentially be used as cell scaffolds. The hydrogels were made by thermal treatment of pectin solutions (5 %, w/v), with addition of flaxseed proteins and/or collagen hydrolysate (5.3 %, w/v), and by subsequent gelling using calcium ions. The results of the analysis of the made gels showed that the addition of flaxseed protein and collagen hydrolysate has a negative effect on the mechanical properties of hydrogels, accelerates their drying, slows swelling, and has no effect on cell-adhesive properties. The produced hydrogels are not cytotoxic, but due to poor cell-adhesive properties, they cannot be used as cell scaffolds.

Keywords: *hydrogel, pectin, flaxseed protein, HaCaT cell line*

Thesis contains: 46 pages, 14 figures, 4 tables, 45 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Igor, Slivac, PhD, Full professor

Reviewers:

1. Višnja, Gaurina Srček, PhD, Full professor (president)
2. Igor, Slivac, PhD, Full professor (mentor)
3. Dubravka, Novotni, PhD, Full professor (member)
4. Teuta, Murati, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: February 26th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. NOSAČI ZA UZGOJ STANICA	3
2.2. HIDROGELOVI.....	5
2.2.1. Pektinski hidrogelovi	7
2.2.2. Proteinski hidrogelovi.....	10
2.2.3. Proteini u sastavu hidrogelova	11
2.2.3.1. <i>Proteini lana</i>	11
2.2.3.2. <i>Kolagen</i>	12
2.3. HaCaT STANIČNA LINIJA.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Kemikalije	16
3.1.2. Uređaji i oprema	17
3.1.3. Sirovine	18
3.1.4. HaCaT stanična linija.....	18
3.2. METODE.....	18
3.2.1. Izolacija proteina iz uljane pogače lana	18
3.2.2. Određivanje udjela proteina metodom po Kjeldahlu.....	19
3.2.3. Proteinska elektroforeza.....	20
3.2.4. Priprema hidrogelova	21
3.2.5. Reološka karakterizacija	23
3.2.6. Praćenje bubrenja.....	23
3.2.7. Uzgoj stanične linije i nacjepljivanje hidrogelova	24
3.2.8. Praćenje vijabilnosti stanica MTT testom	25
3.2.9. Fluorescencijska mikroskopija.....	26
3.2.10. Obrada podataka	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA PROTEINA	29
4.1.1. Izolacija proteina iz uljane pogače i udjeli proteina.....	29
4.1.2. Analiza veličine proteina	30
4.1. FIZIKALNA SVOJSTVA HIDROGELOVA.....	31
4.1.1. Reološka karakterizacija hidrogelova.....	31
4.1.1. Svojstva bubrenja hidrogelova.....	34

4.2. RAST STANICA NA HIDROGELOVIMA	35
5. ZAKLJUČCI.....	41
6. LITERATURA	42

1. UVOD

Velika većina stanica u tkivima i primarnoj staničnoj kulturi zahtjeva čvrstu površinu za prihvaćanje kako bi došlo do njihovog rasta i diobe. Takve stanice nazivaju se adherentnim stanicama i rastu samo prihvaćene na čvrstu podlogu, a njihov rast je najčešće ograničen kontaktom s okolnim stanicama. Budući da rast adherentnih stanica započinje tek nakon prihvaćanja na podlogu, jedan od najvažnijih koraka uzgoja je konstrukcija prikladnih nosača. Nosači bi trebali omogućiti vezanje i rast stanica, a ujedno imati poželjna mehanička svojstva kako bi se mogli koristiti za neku određenu svrhu. Za izradu nosača koriste se najčešće polimerni materijali koji fizikalno-kemijskim svojstvima oponašaju potpurnu strukturu koju nalazimo u tkivu, tzv. izvanstanična matrica. Ti materijali mogu biti prirodni poput ugljikohidrata i proteina, ili sintetski poput dugolančanih ugljikovodika i polimera (derivata) organskih kiselina ili aminokiselina.

Jedan od prirodnih materijala za izradu nosača je pektin. To je ugljikohidrat vrlo složene strukture koji može formirati hidrogelove prikladne za uzgoj adherentnih stanica, a dobiva se ekstrakcijom iz poljoprivrednog otpada. U prošlosti je glavni izvor njegove komercijalne proizvodnje bila kora jabuka, ali se posljednjih godina sve više dobiva iz kore citrusa. Obje sirovine čine biootpad nastao pri industrijskoj proizvodnji soka, a za ekstrakciju pektina se mogu upotrijebiti i drugi otpadni biljni materijali (Brejnholt, 2010). Koristi se u kulinarstvu, kod proizvodnje džemova, marmelada i drugih sličnih proizvoda, kao sredstvo za geliranje, zgušnjavanje i stabilizaciju. Zbog niske cijene, dobrih mehaničkih svojstava, biokompatibilnosti te netoksičnosti predstavlja idealan materijal za konstrukciju staničnih nosača. Lako formira gelove, a u strukturu gela moguće je uklopiti druge polimere ili različite bioaktivne tvari koje mogu poboljšati svojstva samog nosača. Osim ugljikohidrata, hidrogelove mogu formirati proteini izolirani iz različitih biljaka. Dugački polipeptidni lanci nakon razmotavanja formiraju mrežu pri čemu nastaje hidrogel. Mnogi proteini imaju bioaktivno djelovanje prema različitim stanicama što se može iskoristiti za modifikaciju bioloških svojstava hidrogela, a također se dobivaju iz jeftinih i lako dostupnih poljoprivrednih sirovina. Hidrogelovi pektina i biljnih proteina stoga predstavljaju idealne nosače za uzgoj adherentnih stanica. Više znanstvenih radova opisuje postupke proizvodnje i svojstva pektinskih hidrogelova koji se mogu usaditi u ljudski organizam medicinskim postupkom kako bi ubrzali zacjeljivanje, regulirali rast stanica ili kontrolirano ispuštali bioaktivne tvari

(Belousov i sur., 2023; Neves i sur., 2014). Nadalje, ovakvi hidrogelovi mogu se koristiti pri konstrukciji tzv. "umjetnog mesa". Globalni prehrambeni sustav pod velikim je pritiskom klimatskih promjena, sve većeg stanovništva i sve veće potražnje za proizvodima životinjskog podrijetla. Tradicionalni načini uzgoja stoke troše velike količine različitih resursa i uskoro neće biti dovoljni za dobivanje potrebnih količina mesa. Kako bi tržište mesa moglo zadovoljiti potrebe rastuće svjetske populacije potrebno je pronaći alternative. Smatra se da će umjetni analozi mesa biti rješenje koje će omogućiti zadovoljavanje tržišnih potreba za mesom i smanjenje emisije stakleničkih plinova, uz istovremeno dobivanje proizvoda bolje nutritivne vrijednosti (Dutta i sur., 2022). Meso dobiveno tradicionalnim metodama je namirnica siromašna vlaknima i antioksidansima. Uzgojem mišićnih, masnih i drugih stanica na nosačima od pektina i biljnih proteina dobiva se namirnica bogata vlaknima i antioksidansima te stoga ima bolja nutritivna svojstva od mesa dobivenog konvencionalnim metodama.

Glavni izvori za dobivanje pektina i biljnih proteina su nusproizvodi prehrambene industrije, odnosno biootpad. To je značajan doprinos rastućem trendu održivosti poljoprivrede i tehnologija proizvodnje hrane. Korištenjem pektina za pripremu hidrogelova smanjuje se količina nastalog otpada, a mogu se proizvesti različiti proizvodi visoke vrijednosti. Pektin se izolira iz kora citrusa i jabuka, a primjer industrijskih nusproizvoda iz kojih se mogu izolirati biljni proteini su uljane pogače zaostale nakon ekstrakcije ulja iz sjemenki lana. Uljane pogače sjemenki lana sadrže značajne koncentracije proteina i biološki aktivnih spojeva koji imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje (Ye i sur., 2022). Stoga su ciljevi ovog rada bili sljedeći:

- (i) izolacija i karakterizacija proteina iz uljane pogače lana,
- (ii) priprava i fizikalna karakterizacija hidrogelova od pektina i proteina lana, sa ili bez dodatka hidrolizata kolagena,
- (iii) praćenje rasta HaCaT stanica na pripremljenim hidrogelovima.

2. TEORIJSKI DIO

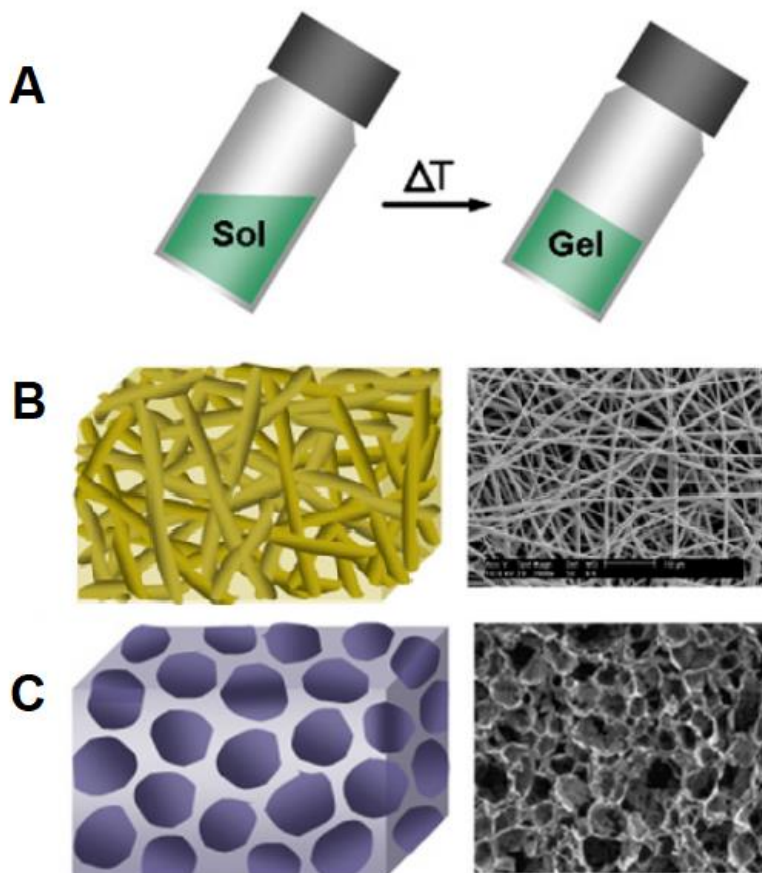
2.1. NOSAČI ZA UZGOJ STANICA

Osnovna primjena staničnih nosača je u tkivnom inženjerstvu, interdisciplinarnom području inženjerskih i biomedicinskih znanosti usmjerenom ka razvoju biološkog materijala za obnovu, održavanje i/ili unaprijeđenje funkcije tkiva (Langer i Vacanti, 1993). Ono se u užem smislu bavi razvojem i primjenom različitih molekula, stanica, tkiva i organa koji zamjenjuju ili održavaju funkcije oštećenih, oboljelih, ostarjelih ili genetički deficijernih dijelova tijela. Uključuje uporabu specifičnih tkiva i stanica koje se najepljuju na prikladne nosače te kao takve zamjenjuju živo tkivo organizma. Životinjske i ljudske stanice uzgajaju se na nosačima i zbog drugih razloga, npr. konstrukcije organoida za različita istraživanja i toksikološke testove, ili pak konstrukcije “umjetnog mesa” za prehrambenu industriju. Ovisno o ulozi konačnog konstrukta, za rast stanica mogu se koristiti nosači različite strukture i svojstava.

Idealni nosači za uzgoj stanica trebali bi osigurati prihvaćanje stanica na površinu, njihovu migraciju, diferencijaciju i proliferaciju. Za većinu primjena staničnih nosača najprikladnija je visoko porozna 3D struktura koja omogućuje rast stanica po cijelom volumenu nosača, ali i dozvoljava difuziju nutrijenata do svih stanica te otpadnih metabolita u okolinu. Za neke primjene, npr. kod dobivanja konstrukata sa epitelnim stanicama, prikladni su nosači koji podržavaju rast stanica samo na površini, tzv. 2D rast. Nadalje, nosači bi trebali biti biokompatibilni kako bi stanice na njima iskazivale normalne biološke funkcije te kako ne bi izazvali imunološku reakciju nakon unosa u organizam. Ako se koriste u regenerativnoj medicini poželjno je da budu biorazgradivi kako bi ih stanice s vremenom razgradile i sintetizirale vlastitu izvanstaničnu matricu. Također bi trebali imati mehanička svojstva takva da oblikom i integritetom odgovaraju anatomiji mjesta gdje se usađuju te kako bi mogli nepromijenjeni izdržati fizičke manipulacije tijekom upotrebe. Kako bi proizvodnja bila komercijalno isplativa nužno je da nosači budu podložni proizvodnji u malim šaržama, odnosno prijenosu iz laboratorijske proizvodnje u komercijalnu. Stoga je za svaki nosač potrebno izabrati primjerenu metodu proizvodnje i primjereni materijal (Jones, 2005). Pritom je moguće koristiti sintetske ili prirodne polimere. Najčešće korišteni sintetski polimeri u tkivnom inženjerstvu su poliglukolna kiselina (PGA), polimljična kiselina (PLA), polietilen

glikol (PEG) i različiti anorganski materijali poput keramike, hidroksiapatita i raznih metala. Prednosti ovih materijala su visoka reproducibilnost izrade i izražena mogućnost podešavanja mehaničkih svojstava potrebnih za određenu upotrebu. Prirodni polimeri koji se koriste za konstrukciju nosača su proteini i ugljikohidrati. Prednosti upotrebe prirodnih polimera su biokompatibilnost, biorazgradivost, visoka dostupnost i niska cijena. Nedostaci njihove primjene su varijacije među šaržama, mogućnost imunološke reakcije zbog prisutnih nečistoća te manja mogućnost finog podešavanja mehaničkih svojstava. Najčešće korišteni proteini su kolagen, fibrin i fibroin svile, a najčešće korišteni ugljikohidrati alginat, agaroza, hijaluronska kiselina, kitozan i pektin. Budući da svaki od navedenih materijala ima određena ograničenja, sve se više upotrebljavaju kompoziti više materijala različitih svojstava (Hutmacher, 2000). Nijedan od navedenih polimera, osim kolagena, nema funkcionalne skupine koje omogućuju prijanjanje stanica, odnosno adhezivnost. Stoga se na polimernu osnovu nosača često kemijskim putem vežu peptidne skupine koje im osiguravaju adhezivnost. Najčešće je riječ o tripeptidu Arg-Gly-Asp (tzv. RGD sekvenca) koji je karakterističan za strukturu fibronektina te osigurava vezanje stanica za izvanstaničnu matricu u živim tkivima.

Za funkciju staničnih nosača, odabrani polimeri najčešće se priređuju kao hidrogelovi, nanovlaknaste mreže ili čvrsti mikroporozni nosači (slika 1). Svaka od navedenih struktura zahtjeva poseban protokol pripreme te nosi drugačije karakteristike izrađenom nosaču. U ovom radu opisana je primjena hidrogelova pa će u nastavku biti više riječi o njima.



Slika 1. Vrste polimernih nosača za stanice: A) hidrogel, B) nanovlaknaste mreže i C) čvrsti mikroporozni nosači (*prema* Chung i Park, 2007)

2.2. HIDROGELOVI

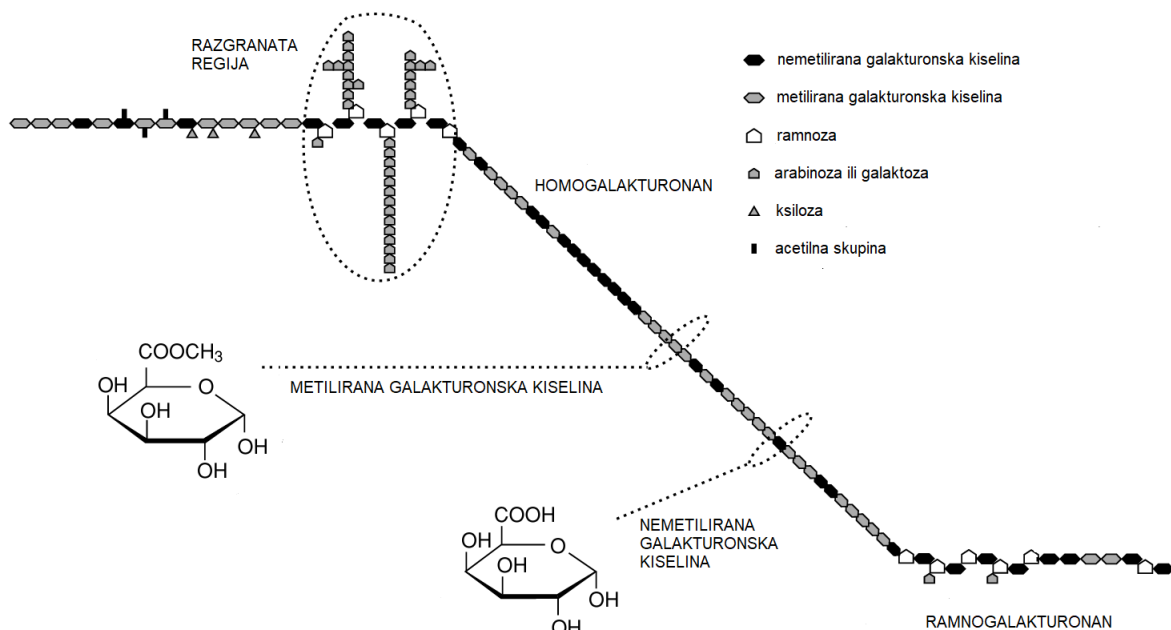
Hidrogelovi su visoko hidratirane strukture sastavljene od prirodnih ili sintetskih hidrofilnih polimernih lanaca, a njihov strukturni integritet ovisi o fizikalnim i/ili kemijskim vezama između tih lanaca. Mogu se definirati i kao polimerni materijali sa sposobnošću bubrenja i zadržavanja velike količine vode unutar vlastite strukture, pri čemu se sami ne otapaju u vodi. Sposobnost vezanja vode posljedica je velikog broja hidrofilnih skupina vezanih na polimernu osnovu gela, a otpornost prema otapanju posljedica je veza između polimernih lanaca. Razlikuju se od ostalih gelova po visokoj hidrofilnosti, netopivosti u vodi te važnosti molekula vode za održanje strukture samog gela. Molekule vode čvrsto su vezane za polimer vodikovim vezama i čine veći dio mase hidrogela. Kao i drugi oblici nosača, mogu ih graditi prirodni ili sintetski polimeri. Posljednjih nekoliko desetljeća prirodni hidrogelovi sve

se više zamjenjuju sintetskim zbog njihove dugotrajnosti, višeg kapaciteta zadržavanja vode i boljih mehaničkih svojstava (Ahmed, 2015). Sintetski hidrogelovi imaju dobro definiranu strukturu, poznati kemijski sastav te visoku mogućnost modifikacije fizikalnih svojstava kako bi bili što funkcionalniji za određenu svrhu. Upotrebljavaju se u različitim granama industrije i medicine: kod formulacija higijenskih proizvoda, lijekova i različitih dodataka prehrani, u poljoprivredi, kod proizvodnje umjetnog snijega, u tkivnom inženjerstvu i regenerativnoj medicini te medicinskoj dijagnostici (Kashyap i sur., 2005). Određeni hidrogelovi mogu reagirati na vanjske podražaje i mijenjati svoja fizikalno-kemijska svojstva. Naime, mnogi gelovi mijenjaju se pri promjeni temperature, ionske jakosti ili pri izlaganju vanjskom magnetskom ili električnom polju što se može iskoristiti za finiju modifikaciju njihovih svojstava. Reakcija na vanjski podražaj može biti bubrenje, smanjivanje, promjena oblika ili degradacija hidrogela, a takvi sustavi nazivaju se "pametnim gelovima". Osobito su prikladni za unos bioaktivnih tvari i lijekova u organizam budući da se oslobađanje tih tvari može potaknuti određenim podražajem. Za primjenu u medicini značajna su njihova mukoadhezivna i bioadhezivna svojstva koja su preduvjet za korištenje hidrogelova kao sustava za unos i kontrolirano ispuštanje lijekova u organizmu (Bashir i sur., 2020).

Zbog visokog udjela vode imaju brojna fizikalno-kemijska svojstva slična izvanstaničnoj matrici od kojih su najznačajnija viskoelastična i difuzivna svojstva (Neves i sur., 2014). Ova sličnost omogućava njihovu upotrebu u tkivnom inženjerstvu i regenerativnoj medicini, ali i drugim područjima koja koriste analoge izvanstanične matrice, odnosno nosače za rast stanica. Budući da je za rast stanica važno svojstvo biokompatibilnosti, prirodni hidrogelovi često imaju prednost pred sintetskim. Osim bolje biokompatibilnosti, važne prednosti prirodnih polimera su niža cijena, dostupnost i biorazgradivost. Prirodni polimeri najčešće korišteni za formulacije hidrogelova su polisaharidi i polipeptidi, no moguća je upotreba polimera drukčije kemijske strukture, npr. polifenola. Prirodni polimeri koji formiraju gelove mogu se dobiti iz različitih izvora te imati funkcionalne skupine različitih naboja, a često se miješaju sa sintetskim kako bi se dobili gelovi boljih svojstava (Bashir i sur., 2020). Primjeri prirodnih polimera koji formiraju hidrogelove su kolagen, škrob, alginat, agaroza i neki biljni proteini.

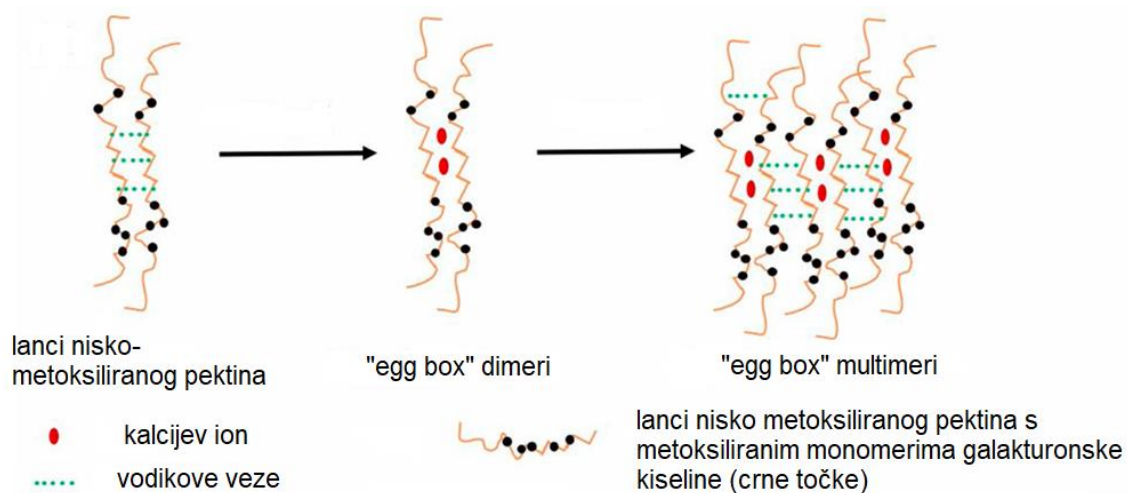
2.2.1. Pektinski hidrogelovi

Pektin je heteropolisaharid prisutan u staničnoj stijenci biljnih stanica. To je anionski polimer čiju osnovu čine monomeri D-galakturonske kiseline povezani α -1,4 glikozidnom vezom, a čije karboksilne skupine mogu biti esterificirane, najčešće metoksilirane. U određenim regijama dolazi i do acetil esterifikacije na O-2 i/ili O-3 položaju. Stupanj metilacije jedinica galakturonske kiseline (DM, engl. *degree of methylation*) definiran je kao udio metoksiliranih jedinica galakturonske kiseline u lancu. S obzirom na stupanj metilacije pektini se dijele u dvije skupine: nisko-metoksilirani pektini (LMP, engl. *low-methoxyl pectins*) čija je DM vrijednost niža od 50 % i visoko-metoksilirani pektini (HMP, engl. *high-methoxyl pectins*) koji su definirani DM vrijednošću višom od 50 %. Pektini se, osim po stupnju metoksilacije, razlikuju po duljini i razgranatosti lanaca te udjelu različitih monosaharida, a posljedično i po funkcionalnim svojstvima (Vo i sur., 2022). Udio galakturonske kiseline može znatno varirati, ali mora iznositi minimalno 65 % po definiciji pektina kao prehranbenog aditiva (FAO/WHO, 2016). U strukturi polisaharidnog lanca prisutni su i mnogi drugi monosaharidi (slika 2). Jedinice D-galakturonske kiseline i u manjoj mjeri L-ramnoze karakteristične su za glavni lanac, a na glavni lanac mogu biti vezani pobočni lanci u razgranatim regijama pektina. Različiti neutralni monosaharidi vežu se na ramnozu u glavnom lancu. To mogu biti L-arabinoza, D-galaktoza, D-ksiloza i mnogi drugi (Cao i sur., 2020). Molekule pektina imaju regije različitih kemijskih struktura. Tako su homogalakturonanske regije građene samo od monomera galakturonske kiseline, dok ramnogalakturonanske regije sadrže različite monosaharide i znatno su kraće, a mogu biti razgranate ili nerazgranate. Pektini iz različitih izvora razlikuju se po udjelu različitih šećera i po obrascu metoksilacije. Tako je za pektine iz jabuke specifična vrlo visoka koncentracija ksiloze i nasumičan raspored metoksiliranih monomera galakturonske kiseline, dok je za citrusne pektine karakteristična metoksilacija većeg broja uzastopnih monomera (Flutto, 2003).



Slika 2. Shematski prikaz strukture pektina (prema Flutto, 2003)

Karboksilne skupine galakturonske kiseline disocirane su pri pH vrijednostima višim od 3,5 te je pri tim pH vrijednostima omogućeno ionsko povezivanje lanaca pektina pomoću dvovalentnih kationa kao što su Ca^{2+} . Pri tome nastaju tzv. “egg-box” veze (slika 3) i dolazi do geliranja (Vo i sur., 2022). Budući da su za veze potrebne slobodne disocirane karboksilne skupine, pomoću Ca^{2+} iona moguće je gelirati samo nisko-metoksilirane pektine. Smatra se da se geliranje odvija prema tzv. “shifted egg-box” modelu u dva koraka. U prvom koraku dva antiparalelna lanca pektina vežu se u regijama s najmanje 6 do 20 uzastopnih nemetoksiliranih monomera galakturonske kiseline pri čemu nastaje dimer pektinskih lanaca koji se vežu pod određenim, vrlo malim, kutem. U drugom koraku dolazi do agregacije dimera pri čemu najznačajniju ulogu imaju vodikove veze (Braccini i Perez, 2001). Zbog nasumične distribucije nemetoksiliranih monomera geliranje započinje trenutno pri dodatku Ca^{2+} te ne postoji kritična vrijednost koncentracije Ca^{2+} potrebna za inicijaciju geliranja (Cao i sur., 2020). Visokometoksilirani pektini geliraju drukčijim mehanizmom, u prisutnosti kiselina i šećera, pri čemu nastaje ljepljivi gel manje čvrstoće te zbog toga nisu primjereni za konstrukciju staničnih nosača.



Slika 3. Shematski prikaz mehanizma geliranja nisko-metoksiliranog pektina pomoću Ca^{2+} iona (prema Cao i sur., 2020)

Zbog iznimnih gelirajućih svojstava, biokompatibilnosti te biorazgradivosti pektin se često upotrebljava u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. U prehrambenoj se industriji koristi kao modifikator reoloških svojstava proizvoda, a u farmaceutskoj industriji najčešće kao hidrokolidni sustav za sporo ispuštanje lijekova na točno određenom mjestu te kao zaštita za površinske ozljede tkiva (Markov i sur., 2017). Najveći problemi upotrebe pektina u biomedicinske i terapijske svrhe su visoka kemijska varijabilnost pektina iz različitih izvora, ali i različitih šarži istog izvora, te niska čistoća komercijalno dostupnih pektina izoliranih iz poljoprivrednog otpada. U pektinu su prisutne druge tvari poput biljnih proteina, polifenola i endotoksina koji mogu značajno utjecati na biološka svojstva hidrogela (Neves i sur., 2014). Ipak, nakon dodatnog pročišćavanja pektinski se hidrogelovi često koriste kao 2D "flasteri" za tretman oštećenog kožnog tkiva. Pružaju mehaničku podršku za rast novih stanica, sprječavaju isušivanje rane, a mogu biti dodatno tretirani antimikrobnim tvarima. Često se koriste i kao 3D porozni nosači za regeneraciju drugih tkiva. Ako se koriste kao nosači za uzgoj stanica potrebno ih je kombinirati s drugim molekulama koje iskazuju citoadhezivna svojstva i omogućavaju prijanjanje stanica. 2D hidrogelovi najčešće se dobivaju izlijevanjem i sušenjem ili elektroispredanjem, a 3D hidrogelovi liofilizacijom ili ekstruzijom (bioprintanjem).

2.2.2. Proteinski hidrogelovi

Proteini su polimeri koji imaju vrlo raznolika fizikalno-kemijska svojstva, ovisno o aminokiselinskom sastavu. Budući da imaju složeniju strukturu nego polisaharidi, njihova svojstva se izraženije mijenjaju s promjenom fizikalno-kemijskih uvjeta te se stoga biokemijska i mehanička svojstva proteinskih gelova lakše dizajniraju i prilagođavaju određenoj svrsi. Ipak, većina proteinskih hidrogelova je vrlo slabe stabilnosti i mehaničkih svojstava te je stoga njihova primjena ograničena (Tang i sur., 2022). Samo neki proteini i proteinski izolati mogu formirati hidrogelove budući da je za njihovu formaciju važan izrazit hidrofilni karakter polimera. Proteini i peptidi izrazito hidrofobnog karaktera ne tvore hidrogelove, ali se također mogu koristiti kod formulacija staničnih nosača u obliku filmova ili gelova. Sam proces geliranja započinje denaturacijom proteina, najčešće zagrijavanjem ili promjenom pH, pri čemu dolazi do odmatanja globularne strukture proteina i izlaganja različitih funkcionalnih skupina. Nakon toga denaturirajući se uvjeti prekidaju pri čemu se denaturirane molekule proteina preslaguju i međusobno povezuju disulfidnim mostovima, vodikovim vezama te hidrofobnim i van der Waalovim interakcijama. Time se formira proteinska 3D mreža te nastaje gel ili hidrogel. Biljni proteini uobičajeno imaju slabiji gelirajući kapacitet nego životinjski zbog niže topljivosti i više temperaturne stabilnosti (Liang i Tang, 2013). Unatoč tome, mnoge industrije pokušavaju zamijeniti životinjske proteine biljnima zbog rastuće potrebe za održivim korištenjem ograničenih resursa.

Unatoč lošijim mehaničkim svojstvima, proteinski hidrogelovi često imaju prednost pred sintetskim i polisaharidnim polimerima kada je riječ o ciljanom otpuštanju lijekova i bioaktivnih tvari. Velik broj kiselih i bazičnih skupina u proteinskim lancima može djelovati kao donor, odnosno akceptor elektrona pri promjeni pH pri čemu se mijenja sama struktura gela. Posljedično, otpuštanje bioaktivnih tvari moguće je jednostavno regulirati promjenom pH vrijednosti (Reddy i Yang, 2011). Zbog toga je osnovna svrha dosad konstruiranih proteinskih hidrogelova kontrolirano oslobađanje lijekova i nutrijenata nakon unosa oralnim putem. Proteinski hidrogelovi konstruirani za druge svrhe, npr. uzgoj stanica, najčešće se sastoje od nekog drugog polimera boljih mehaničkih svojstava pomiješanog s proteinima ili proteinskim hidrolizatima. Hidrolizati se često koriste zbog svojih brojnih bioloških svojstava karakterističnih samo za hidrolizate, a ne i za native i denaturirane proteine. Ianovici i sur. (2022) konstruirali su umjetni analog mesa uzgojem mišićnih stanica u poroznom nosaču od proteinskog izolata soje i alginata funkcionaliziranih RGD sekvencama, pri čemu je dodatak

biljnih proteina pokazao pozitivan utjecaj na proliferaciju uzgajanih stanica. Proteini se često pri konstrukciji hidrogelova miješaju s pektinom. Objavljeno je više radova koji opisuju jednostavne postupke pripreve pektinskih hidrogelova s dodatkom kolagena, fibroina ili proteinskog izolata soje, a pokazuju vrlo dobra mehanička i biološka svojstva (Kim i sur., 2021). Drugi pristup dobivanju proteinskih gelova boljih mehaničkih svojstava je korištenje kemijskih agensa (npr. aldehida, polifenola, genipina i drugih) ili enzima (npr. lakaze ili transglutaminaze) za stvaranje kovalentnih veza između peptidnih lanaca.

2.2.3. Proteini u sastavu hidrogelova

2.2.3.1. Proteini lana

Lan (*Linum usitatissimum* L.) je jednogodišnja biljka koja se već stoljećima koristi u svrhu ekstrakcije ulja, a uzgaja se i u tekstilne svrhe te za proizvodnju sjemena. Sjemenke lana sadrže 3 – 4 % pepela, 30 – 41 % masnoće, 20 – 35 % prehrambenih vlakana te 18 – 30 % proteina. Najvažnija industrijska sirovina lana je laneno ulje koje čini 32 – 45 % mase sjemenki i sadrži visoki udio (~ 55 %) α -linolenske kiseline, ω -3 polinezasićene masne kiseline vrlo korisne za ljudsko zdravlje (Lan i sur., 2020). Lanene sjemenke sadrže velik broj drugih bioaktivnih komponenata, uključujući oleinsku i linoleinsku kiselinu te fenolske kiseline, lignane, cikličke peptide, cijanogene glikozide, topljiva i netopljiva vlakna te lanene proteine (Akbar, 2020). Lanene sjemenke, kao i mnoge druge sjemenke, imaju visok udio globulina (~ 80 %) i sadrže protein sličan albuminu koji čini ~ 20 % ukupnih proteina. Proteini lana bogati su argininom, asparaginom i glutaminom, dok su limitirane aminokiseline lizin, metionin i cistein (Gutiérrez i sur., 2010).

Laneno ulje dobiva se toplim ili hladnim prešanjem, a kao nusproizvod prešanja zaostaju tzv. uljane pogače. Prema kemijskom sastavu lanena pogača sadrži 11 - 14 % vode, 30 – 34 % proteina, 6 - 9 % masti, 31 - 35% ekstrahiranih tvari bez dušika i 9 - 10 % celuloze. Pogača lana se uglavnom koristi kao stočna hrana te kao aditiv u pekarskim proizvodima, a ima i veliki potencijal u ljudskoj prehrani te može služiti za izolaciju lignana, proteina i različitih polisaharida. S obzirom na to da sadrži značajne koncentracije proteina, vlakana i biološki aktivnih spojeva, sve se više ispituje njen potencijal u industriji i znanstvenoj zajednici, pa tako i kao zamjena za serum ili dodatak hranjivom mediju u tehnologiji životinjskih stanica (Logarušić i sur., 2019).

Proteini lana iskazuju brojne funkcionalne karakteristike slične proteinima drugih uljarica, npr. sposobnost adsorpcije vode/ulja te stabilizacije emulzija i pjena. Na funkcionalne karakteristike znatno utječe velik broj faktora kao što su temperatura, pH, ionska jakost, metoda izolacije proteina, sadržaj nečistoća i veličina agregata proteina (Ye i sur., 2022). Rezultati brojnih istraživanja upućuju na izrazitu biološku aktivnost proteina lana. Pokazano je da proteini lana imaju antibakterijska i antihipertenzivna svojstva te znatan antioksidativni kapacitet. Smatra se da su ta svojstva posljedica jedinstvenog aminokiselinskog sastava koji omogućava vezanje određenih proteina sa drugim molekulama, npr. α -lipoičnom kiselinom te različitim šećerima i fenolnim spojevima (Mohamed i sur., 2020). Lan je bogat kraćim peptidima od kojih su najviše istraženi ciklolinopeptidi jer iskazuju mnoga specifična biološka svojstva. Riječ je o peptidima duljine 8 – 10 aminokiselinskih ostataka za koje je dokazano da u visokim koncentracijama imaju imunosupresivno i antimalarično djelovanje te inhibiraju diferencijaciju nekih stanica (Wu i sur., 2019).

Unatoč brojnim pozitivnim karakteristikama, primjena proteina lana kod formulacije hidrogelova nije detaljnije istražena. Razlog tome su izrazito loša tehnološka svojstva proteina lana kao što su niska topljivost u vodi te vrlo visoka temperaturna stabilnost. Ova svojstva otežavaju denaturaciju koja je potrebna za geliranje te stoga sam proteinski izolat ne iskazuje zadovoljavajuća gelirajuća svojstva bez primjene kemijskih agensa ili enzima. Ipak, konstruirani su gelovi u kojima su proteini lana uklopljeni u polimernu mrežu polisaharida. Min i sur. (2022) konstruirali su meki prehrambeni gel škroba zlatnog graha (*Vigna radiata* L.) i proteina lana pri čemu je uočeno da se proteini lana u obliku djelomično denaturiranih granula uklopljuju u mrežu škroba te je stoga dobiveni gel imao lošija mehanička svojstva od gela čistog škroba.

2.2.3.2. Kolagen

Kolagen je osnovna komponenta izvanstanične matrice čvrstih životinjskih tkiva i posljedično najzastupljeniji protein u organizmu. Primarna uloga mu je strukturna, sudjeluje u održavanju čvrstoće, elastičnosti i izdržljivosti izvanstanične matrice, ali i u regulaciji staničnog metabolizma. Prevladava u strukturi tetiva, kože, krvnih žila i rožnice, a uz znatnu količinu minerala gradi kosti, zube te hrskavicu. vlakna kolagena imaju strukturu trostruke uzvojnice, tri polipeptidna lanca superzavijena su oko zajedničke središnje osi. Svaki treći aminokiselinski ostatak je glicin čime se osigurava čvrsta struktura vlakna. Ostale

aminokiseline koje grade kolagen su često biokemijski modificirane, a najčešće su hidroksiprolin i različite iminokiseline koje sudjeluju u vezanju sa specifičnim ligandima i receptorima (Brodsky i Persikov, 2005).

Kolagen se izolira iz različitih materijala životinjskog porijekla djelovanjem kiselina i enzima, a primjenjuje se u različite svrhe već dugi niz godina i smatra se jednim od najkorisnijih bioloških materijala. Izvrсна biokompatibilnost, sigurnost primjene i biorazgradivost čine ga zasad nezamjenjivim materijalom u brojnim medicinskim postupcima. Koristi se pri konstrukciji nosača za uzgoj primarnih staničnih kultura, različitih gelova za unos lijekova, spužvi za tretiranje rana i opekline, oftamoloških štitova, peleta i tableta za unos bioaktivnih tvari, nanočestica, te u tkivnom inženjerstvu za dobivanje “umjetnih” kostiju, kože, krvnih žila te zalistaka (Lee i sur., 2001). Mnoge od navedenih primjena koriste kolagen u obliku hidrogelova. Hidrogelovi čistog kolagena imaju izvrsnu rastezljivost ali nezadovoljavajuća ostala mehanička svojstva, ukoliko se pri njihovoj konstrukciji ne koriste kemijski agensi za formiranje kovalentnih veza između lanaca.

Hidrolizat kolagena skupina je različitih peptida niske molekulske mase (najčešće 3 – 6 kDa) nastala enzimskom razgradnjom kolagena u kiselim ili lužnatim uvjetima. Izvor kolagena je najvažniji faktor koji utječe na svojstva kolagena i kolagenskog hidrolizata, od kojih su bitnija molekulska masa, topljivost i biološka aktivnost. Hidrolizati se koriste u biomedicinske svrhe te u različitim industrijama: prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i kožarskoj. Za razliku od nativnog kolagena, hidrolizati pokazuju bolja antimikrobna i antioksidativna svojstva, a dokazano je da vežu ione metala i povećavaju njihovu biodostupnost. Zbog niske molekulske mase ne mogu samostalno tvoriti hidrogelove ni filmove, ali se mogu koristiti za njihovu konstrukciju u kombinaciji s drugim polimerima veće molekulske mase (León-López i sur., 2019).

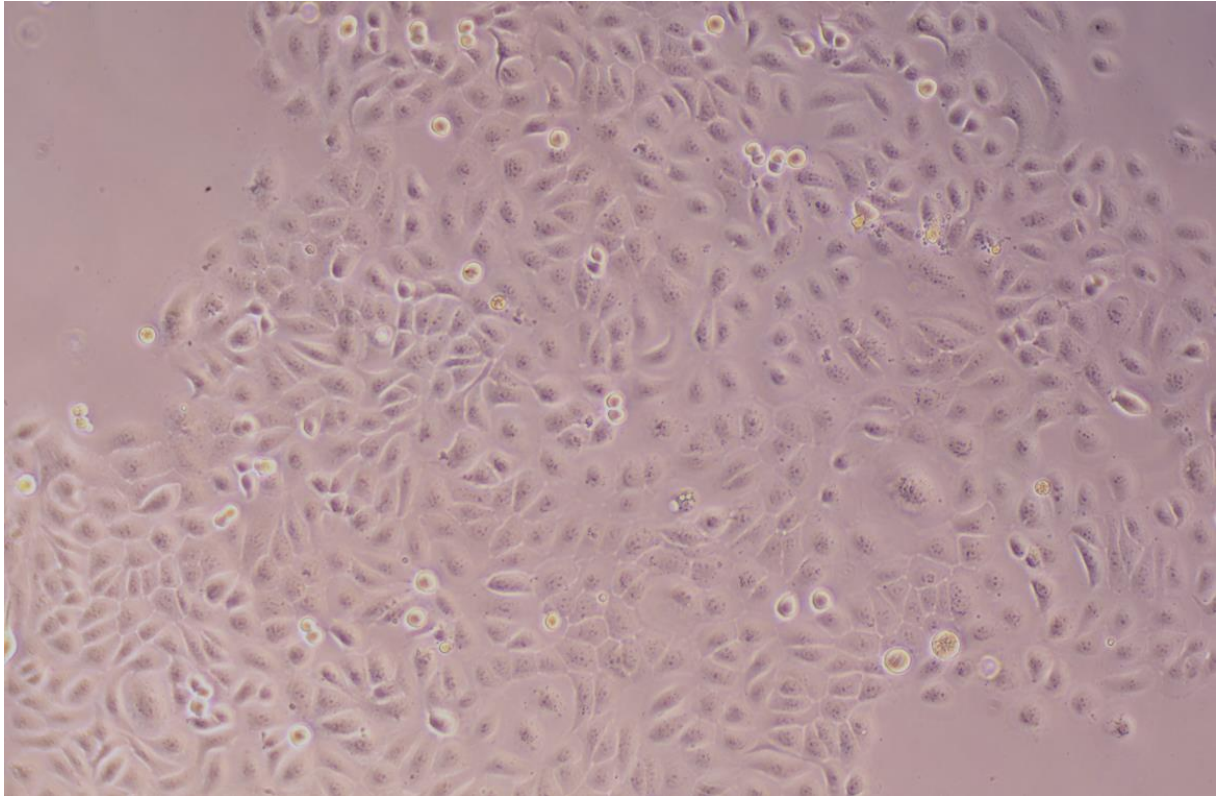
2.3. HaCaT STANIČNA LINIJA

HaCaT stanice (slika 4) su besmrtna, kontinuirano kultivirana linija ljudskih keratinocita koja je dobivena *in vitro* mutacijom keratinocita kirurški odstranjenih iz periferije melanoma (Boukamp i sur., 1988). Riječ je o netumorigenim stanicama koje iskazuju skoro potpuni diferencijacijski kapacitet, a do imortalizacije je došlo spontanom kromosomskim aberacijama. Unatoč neograničenoj mogućnosti diobe zadržale su sposobnost diferencijacije i ekspresije različitih specifičnih keratina. Diferencijaciju HaCaT stanica moguće je potaknuti promjenom

koncentracije stanica ili promjenom koncentracije kalcijevih iona u mediju. Pri tipičnim uvjetima uzgoja imaju djelomično do skoro potpuno diferencirani fenotip zbog relativno visoke koncentracije kalcija u većini medija za uzgoj, a dediferencijaciju je moguće potaknuti uzgojem u mediju siromašnom kalcijem. Prosječna veličina im je 20 – 25 μm , a generacijsko vrijeme 28 h.

Zbog jedinstvenih osobina često se koriste u istraživanjima biologije kože i mehanizama diferencijacije. Bile su ključne pri otkrivanju mehanizama uključenih u epidermalnu homeostazu, različitih patofizioloških mehanizama i objašnjenja uloge T limfocita u različitim kroničnim dermatološkim bolestima. U novije vrijeme intenzivno se koriste pri konstrukciji analoga kože za toksikološka ispitivanja. Takvi *in vitro* sustavi imaju brojne prednosti pred konvencionalnim ispitivanjima na koži živih životinja ili korištenjem ljudskih primarnih staničnih kultura. Zbog jednolikih svojstava HaCaT stanica rezultati su vrlo reproducibilni. Pri korištenju druge dvije metode velik utjecaj na rezultate imaju genotipske i fenotipske varijacije među jedinkama, ali i genetička nestabilnost primarne kulture. Nadalje, uzgoj stanica je mnogo jeftiniji i jednostavniji, ali i etički prihvatljiviji od korištenja pokusnih životinja. Ipak, veliki problem ove metode je nesposobnost provođenja krajnjih koraka diferencijacije kod HaCaT stanica kao posljedica imortalizacije, što uzrokuje određene metaboličke razlike u odnosu na stanice u ljudskom kožnom tkivu (Boelsma i sur., 1999).

Budući da se pektin često koristi za tretiranje kožnih rana i opekline, nekoliko istraživanja koristilo je pektinske hidrogelove kao nosače za rast HaCaT stanica. Pereira i sur. (2018) konstruirali su hidrogel kovalentnim povezivanjem lanaca pektina tiol-norbornen reakcijom. Pektin je bio funkcionaliziran RGD-sekvencama i pokazao se kao izvrstan nosač za uzgoj stanica, dok pektin koji nije funkcionaliziran peptidima ne pokazuje adhezivnost dovoljnu za prijanjanje i uzgoj HaCaT stanica. Nadalje, dokazan je utjecaj različitih biljnih ekstrakata koji se koriste u kozmetologiji na metabolizam i ekspresiju gena u HaCaT stanica. Lee i sur. (2020) dokazali su utjecaj bioaktivnih tvari iz turice (*Agrimonia* sp.), slatkog korijena (*Glycyrrhiza* sp.), božura (*Paeonia* sp.) i drugih komercijalnih biljaka na ekspresiju različitih gena, prvenstveno gena koji kodiraju različite citokine. Logarušić i sur. (2020) ispitali su antioksidativni kapacitet hidrolizata proteina lana i utjecaj na rast HaCaT stanica. Primijećeno je da hidrolizati proteina lana dobiveni enzimom alkalaza imaju pozitivan učinak na rast HaCaT stanica te zaštitu od oksidativnog stresa.



Slika 4. HaCaT stanice (vlastita slika)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- Antibiotik/Antimikotik (100x), Capricorn Scientific, Njemačka
- Borna kiselina (H_3BO_3), Kemika, Hrvatska
- Bromfenol plavo, Kemika, Hrvatska
- Deionizirana voda, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Hrvatska
- DMEM - High Glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Capricorn Scientific,

Njemačka

- Dimetil sulfoksid (DMSO), Carlo Erba Reagents, Španjolska
- Etanol, 96%, Kemika, Hrvatska
- Fetalni goveđi serum (FBS), Sigma-Aldrich, SAD
- Fluorescein diacetat (FDA), Sigma-Aldrich, SAD
- Fosfatni pufer (PBS), Sigma-Aldrich, Velika Britanija
- Gel za elektroforezu 4–20% Mini-PROTEAN TGX Precast Gel, Bio-Rad, SAD
- Glicin, Fisher Scientific, UK
- Hidrolizat kolagena, $\geq 90\%$, FC40337, Biosynth, Švicarska
- IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium), Gibco, SAD
- Kalcijev klorid ($CaCl_2$), Kemika, Hrvatska
- Kjeldahl tablete, OPSIS, Švedska
- Klorovodična kiselina (HCl), Kemika, Hrvatska
- MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolijev bromid), Sigma-Aldrich, SAD
- Natrijev dodecil sulfat (SDS), LKB, Švedska
- Natrijev hidroksid (NaOH), Kemika, Hrvatska
- Octena kiselina, Kemika, Hrvatska
- Pektin nisko-metoksilirani, DuPont, SAD
- Propidij jodid (PI), Abcam, SAD
- Proteinski marker za elektroforezu ProSieve QuadColor, Lonza, SAD
- Sumporna kiselina (H_2SO_4), koncentrirana

- Tripan-plavo boja, Sigma-Aldrich, SAD
- Tripsin-EDTA, Sigma-Aldrich, SAD
- Tris(hidroksimetil)aminometan (Tris), Sigma-Aldrich, SAD

3.1.2. Uređaji i oprema

- Automatska destilacijska jedinica Kjeltex 2100, FOSS, Danska
- Automatske pipete (0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1000 µL, 1000 – 5000 µL) i nastavci, Eppendorf, Njemačka
- Blok za spaljivanje DS-6 (1007 Digester), Gemini, Nizozemska
- Centrifuga, ECEN-205, MRC Lab, Izrael
- Hladnjak (4 °C, -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Memmert, Njemačka
- Inverzni fluorescencijski mikroskop, Fluid Cell Imaging Station, Thermo Scientific, SAD
- Inverzni svjetlosni mikroskop Axiovert 25, Carl Zeiss, Njemačka
- Jedinica za provođenje elektroforeze EPS 3500, Pharmacia Biotech, Švedska
- Komora za sterilni rad (laminar flow cabinet), Kambič, Slovenija
- Kružna tresilica PSU-10i, Biosan, Latvija
- Laboratorijska vaga, Boeco, Njemačka
- Laboratorijski pribor (epruvete, menzure, laboratorijske čaše, kivete, odmjerne tikvice, boce štrcaljke i dr.)
- Liofilizator Alpha 1-2 LDplus, Martin Christ, Njemačka
- Magnetska mješalica s grijanjem Ika-Combimag Ret, IKA, Njemačka
- Membrana za dijalizu - SnakeSkin Dialysis Tubing 10K MWCO, Thermo Scientific, SAD
- Neubauerova komorica za brojanje stanica, Reichart Bright-line, SAD
- pH metar SevenCompact pH/Ion, Mettler-Toledo, SAD
- Plastične, sterilne Petrijeve zdjelice za uzgoj staničnih kultura, Corning, SAD
- Ploče s 24 jažice i sa 6 jažica, Corning, SAD
- Reometar Anton Paar MCR 92, Anton Paar GmbH, Austrija
- Spektrofotometar Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, SAD
- Sterilni filter CHROMAFIL Xtra RC (13 mm, 0,22 µm), Macherey-Nagel, Njemačka
- Sustav za okomitu elektroforezu Mini-PROTEAN 2D Electrophoresis Cell, BIO-RAD,

SAD

- Svjetlosni mikroskop Axiostar 1122-100, Carl Zeiss, Njemačka
- Vodena kupelj SUB14, Camlab, UK
- Vrtložna mješalica, IKA, Njemačka
- Zamrzivač (-80 °C), TT 80 FRYKA, Njemačka

3.1.3. Sirovine

- Brašno uljane pogače lana, *Laneno brašno*, Nutrimedica, Hrvatska

3.1.4. HaCaT stanična linija

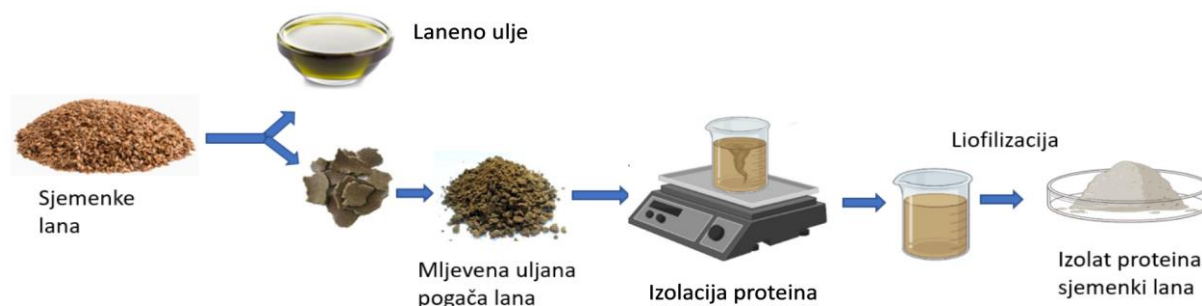
• HaCaT stanice (CLS #300493) nabavljene su iz banke stanica Cell Lines Service (CLS) kao adherentna stanična linija. Za njihov uzgoj korišten je hranjivi medij DMEM s dodatkom 10 % (v/v) FBS-a i 1 % (v/v) antibiotika/antimikotika. Uzgajane su u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C uz odgovarajući stupanj vlažnosti i sastava atmosfere (95 % zraka + 5 % CO₂).

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija proteina iz uljane pogače lana

Za pripremu proteinskog izolata lana prema protokolu Udenigwe i sur. (2009), uz manje modifikacije, korišteno je brašno uljane pogače lana (slika 5). Brašno uljane pogače lana dodano je u deioniziranu vodu (5 % w/v) temperature 37 °C nakon čega je pH vrijednost smjese podešena na 5,0 pomoću 2 M HCl. U smjesu je dodan enzim celulaza (1 % w/v) kako bi započela hidroliza celuloze. Temperatura i pH vrijednost smjese su održavane stalnima. Nakon 5 sati miješanja na magnetskoj mješalici smjesa je ohlađena i ostavljena preko noći u hladnjaku pri 4 °C. Idući dan otopina je ugrijana na sobnu temperaturu (21 °C), a pH vrijednost joj je podešena na 10,0 pomoću 2 M NaOH. Smjesa je potom miješana 2 h te centrifugirana (5000 g, 30 min, 10 °C). Izuzetom supernatantu pH vrijednost je podešena na 4,0 pomoću 2 M NaOH. Nakon 30 min miješanja, smjesa je ponovno centrifugirana (8000 g, 30 min, 10 °C) te je izdvojeni talog ispran sa zakiseljenom vodom (pH 4,0) i ostavljen preko noći u hladnjaku (pri 4 °C). Idući dan je centrifugiran (8000 g, 30 min, 10°C). Dobiveni

proteinski talog resuspendiran je u deioniziranoj vodi te nakon što je smjesa homogenizirana, podešena joj je pH vrijednost na 7,0 s 2 M NaOH. Prije liofilizacije suspenzija je dijalizirana pomoću SnakeSkin Dialysis Tubing, 10K MWCO tijekom 6 h pri sobnoj temperaturi, uz izmjenu vode. Odvagani proteinski izolati su nakon liofilizacije pohranjeni i čuvani pri sobnoj temperaturi.



Slika 5. Shema postupka izolacije proteina iz sjemenki lana (vlastita slika)

3.2.2. Određivanje udjela proteina metodom po Kjeldahlu

Određivanje udjela proteina provedeno je u tri koraka: digestija (mokro spaljivanje), destilacija i titracija prema metodi ASN 3105 opisanoj u propisu proizvođača opreme (FOSS Analytical AB, 2003). U epruvetu za digestiju odvažano je približno 0,5 g praškastog uzorka uljane pogače lana, odnosno proteinskog izolata lana. Dodane su po dvije Kjeldahl tablete i 15 mL koncentrirane sumporne kiseline. Epruvete za spaljivanje složene su u blok za spaljivanje i spojene na vakuum pumpu. Spaljivanje je provedeno postupnim povišenjem temperature i zadržavanjem na maksimalnoj temperaturi približno 2 h. Završeno je kada je otopina postala potpuno bistra i bez tamnih tragova. Uzorci su zatim ohlađeni 20 min i razrijeđeni s 80 mL demineralizirane vode, a epruvete su gumenim adapterom spojene na automatsku destilacijsku jedinicu. Na pomičnu platformu stavljena je prijemna Erlenmeyerova tikvica s 25 mL otopine borne kiseline (4 % (v/v) borne kiseline s indikatorima bromkrezol zeleno i metil crveno). Postolje je podignuto tako da destilacijska cijevčica bude uronjena u otopinu i pokrenuta je destilacija. Destilacijska jedinica automatski dozira 50 mL 40 %-tne natrijeve lužine i destilira uzorak 4 min. Nastali amonijak se hladi u sustavu i uvodi u otopinu borne kiseline u Erlenmeyerovoj tikvici. Nakon završetka destilacije destilat je bio zelene boje te je titriran s klorovodičnom kiselinom ($c(HCl) = 0,1 \text{ mol/L}$) do promjene boje u ružičastu. Pri tome je određena količina nastalog amonijaka, odnosno dušika. Odziv slijepe probe određen je istim

postupkom, ali bez ikakvog uzorka u epruveti. Postotak dušika u uzorku izračunat je prema formuli:

$$\%N = \frac{V(HCl) \cdot c(HCl) \cdot Ar(N)}{m} \cdot 100$$

gdje je $\%N$ postotak dušika u uzorku, $V(HCl)$ razlika volumena otopine klorovodične kiseline utrošene pri titracijama uzorka i slijepa probe (mL), $c(HCl)$ molarna koncentracija otopine klorovodične kiseline (mol/L), $Ar(N)$ relativna atomska masa dušika (-), a m masa uzorka (mg). Postotak dušika preračunat je u postotak proteina množenjem s faktorom $F = 6,25$.

3.2.3. Proteinska elektroforeza

SDS poliakrilamidna elektroforeza proteina (SDS PAGE) provedena je kako bi se odredile molekulske mase proteina korištenih za pripremu hidrogelova. Ista otopina proteina lana priređena je za SDS PAGE kao i za kuhanje hidrogelova. Prah proteinskog izolata lana dobiven prethodno opisanim postupkom suspendiran je u deioniziranoj vodi u koncentraciji 10 % (w/v) pri 25 °C te je pH suspenzije namješten na 8,0 pomoću 2,0 M NaOH. Suspenzija je miješana na magnetnoj miješalici 20 min kako bi se otopili svi proteini topljivi pri opisanim uvjetima. Otopina je zatim centrifugirana 10 min pri 10 000 rpm kako bi se istaložili i uklonili neotopljeni proteini (i nečistoće). Dobivenom supernatantu određena je koncentracija proteina metodom po Bradford koja se temelji na interakciji proteina i boje Coomassie Brilliant Blue G-250 u kiselim uvjetima (Ninfa i sur., 2008). Za provođenje mjerenja izvorni supernatant razrijeđen je 100 ×. 1,25 mL Bradford reagensa pomiješano je s 0,025 mL razrijeđenog uzorka, odnosno 0,025 mL deionizirane vode (slijepa proba). Nakon kratkog miješanja izmjerena je apsorbancija pri 595 nm. Iz razlike apsorbancije uzorka i slijepa probe izračunata je koncentracija proteina, pomoću prethodno konstruiranog baždarnog dijagrama. Određena je koncentracija proteina u izvornoj otopini 53 g/L, što znači da je 53 % mase proteinskog izolata bilo otopljeno pri pH 8,0 i temperaturi 25 °C. Za SDS PAGE i pripremu hidrogelova pripravljena je i otopina hidrolizata kolagena iste koncentracije (53 g/L) otapanjem praškastog hidrolizata u deioniziranoj vodi. Uzorci za provođenje SDS PAGE dobiveni su razrijeđenjem obiju otopina proteina 25 ×. 24 μL uzorka pomiješano je s 6 μL 5 × Laemmli-jevog pufera za uzorke nakon čega je smjesa 3 minute grijana u vodenoj kupelji pri 100 °C. Za elektroforezu

su korišteni komercijalni gel s gradijentom koncentracije poliakrilamida 4 – 20 % Mini-PROTEAN® TGX gel (BIO-RAD, SAD), sustav za elektroforezu Mini-PROTEAN 2D Electrophoresis Cell (BIO-RAD, SAD) i jedinica Electrophoresis Power Supply EPS 3500 (Pharmacia Biotech, Švedska). Spremnik i prostor između gelova napunjeni su 1 × SDS puferom za elektroforezu koji je pripremljen razrjeđivanjem prethodno pripremljenog 10 × SDS pufera za elektroforezu (tablica 1) deioniziranom vodom. U jednu jažicu dodano je 5 μL proteinskog standarda (ProSieve™ QuadColor™ Protein Marker), dok je u ostale jažice nanoseno po 20 μL denaturiranih uzoraka. U prazne jažice dodano je 3 μL 5 x Laemmlijevog pufera za uzorke. Elektroforeza je provedena pri naponu od 180 V u trajanju od približno 55 minuta. Po završetku, gel je obojan otopinom Coomassie plavo tijekom jednog sata, a odbojavanje gelova provedeno je pomoću 7 %-tne otopine octene kiseline na kružnoj tresilici.

Tablica 1. Sastav 10 × SDS pufera za elektroforezu

Kemikalija	Masa ili volumen
Tris baza	29 g
Glicin	144 g
SDS	10 g
Deionizirana voda	Do 1000 mL

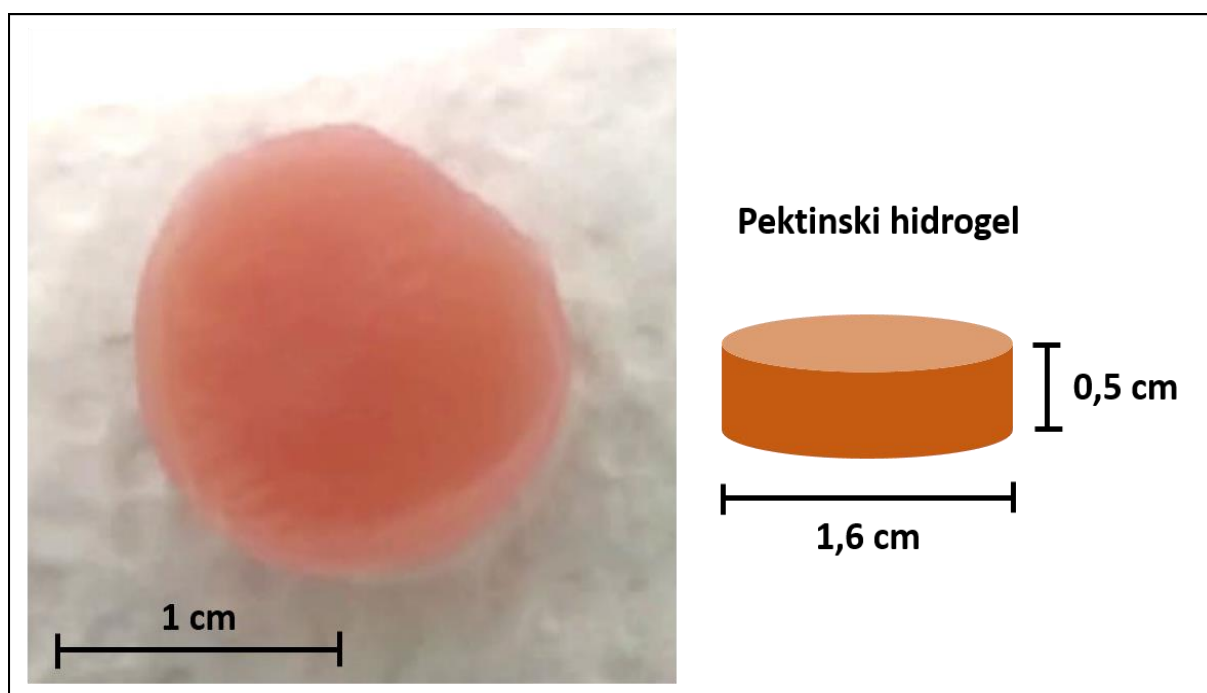
3.2.4. Priprema hidrogelova

Osnovna komponenta hidrogelova korištenih u ovom radu je niskometilirani pektin, i izrada hidrogelova temelji se na njegovim gelirajućim svojstvima. Radi potencijalnog poboljšanja citokompatibilnosti pektinskog hidrogela korištene su otopine proteina lana i hidrolizata kolagena koncentracije 53 g/L pripremljene prethodno opisanim postupkom. U Falcon epruvete dodano je 0,25 g praška nisko-metoksiliranog pektina i 5 mL otopine proteina, odnosno deionizirane vode, tako da je koncentracija pektina u svim hidrogelovima bila 5 % (w/v). Za hidrogel P dodano je 5 mL deionizirane vode, za hidrogel PL 5 mL otopine proteina lana, a za hidrogel PK 5 mL otopine hidrolizata kolagena. Hidrogel PLK pripremljen je tako da je na prašak pektina dodano 2,5 mL otopine proteina lana i 2,5 mL otopine hidrolizata kolagena. Otopine su nakratko promiješane špatulom kako bi se ubrzalo močenje pektina te su kuhane u vodenoj kupelji tijekom 1 h pri 95 °C, uz miješanje na vortex mješalici svakih 15 min. Po 200 μL vruće otopine je zatim otpipetirano u jažicu sterilne ploče s 24 jažice. Ploče su stavljene na smrzavanje 15 min pri – 80 °C, a neposredno nakon smrzavanja u jažice je dodano

po 300 μL 0,2 M otopine kalcijeva klorida (CaCl_2). Ploče su zatim ostavljene u inkubatoru pri 37 °C tijekom 1 h kako bi došlo do geliranja. Smrzavanje je provedeno kako bi površine formiranih hidrogelova bile što pravilnije, budući da geliranje ionima kalcija započinje trenutno. Nakon formiranja hidrogelova uklonjen je višak otopine, a dobiveni hidrogelovi korišteni su za praćenje bubrenja i uzgoj HaCaT stanica. Udjeli pojedinih polimera u različitim hidrogelovima prikazani su u tablici 2. Izgled i veličina pektinskog hidrogela prikazani su na slici 6.

Tablica 2. Koncentracije (w/v) polimera u pojedinim hidrogelovima

Hidrogel	Koncentracija (w/v) / %			
	Pektin	Proteini lana	Hidrolizat kolagena	Ukupni polimeri
P	5	0	0	5
PL	5	5,3	0	10,3
PK	5	0	5,3	10,3
PLK	5	2,65	2,65	10,3



Slika 6. Primjer hidrogela od pektina koji je testiran kao nosač za uzgoj HaCaT stanica.

3.2.5. Reološka karakterizacija

Reološka mjerenja provedena su reometrom Anton Paar MCR 92 (Anton Paar GmbH, Austrija), a dobiveni podaci obrađeni su programom Rheocompass. Reološka svojstva hidrogelova određena su oscilacijskim testovima pomoću mjernog sustava s dvije paralelne ploče. Pritom gornja ploča oscilira lijevo – desno djelovanjem vanjske sile što uzrokuje smično naprezanje u uzorku. Budući da za precizna mjerenja dimenzije uzoraka trebaju odgovarati dimenzijama mjernog sustava, postupak pripreme hidrogelova za reološku karakterizaciju je modificiran. Koncentracije polimera i vrijeme kuhanja nisu promijenjeni, ali su otopine gelirane u pločama sa 6 jažica. U svaku jažicu dodano je po 3 mL otopine, a smrzavanje je trajalo 50 min pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Neposredno nakon smrzavanja u jažice je dodano po 3,5 mL 0,2 M otopine CaCl_2 , te su ploče ostavljene preko noći pri sobnoj temperaturi kako bi došlo do geliranja. Idući dan višak otopine je uklonjen, a hidrogelovi su stavljeni u IMDM medij do provođenja reoloških testova. Test promjene amplitude (engl. *Amplitude Sweep*) proveden je kako bi se utvrdile granične vrijednosti smične deformacije kod kojih dolazi do narušavanja unutarnje strukture uzorka, odnosno kako bi se definiralo linearno viskoelastično područje u kojem viskoelastični moduli smicanja (G' i G'') ne ovise o smičnoj deformaciji. Test je proveden pri konstantnoj frekvenciji 1 Hz, u rasponu amplituda smične deformacije od 0,01 % do 100 %. Na osnovu dobivenih vrijednosti proveden je test promjene frekvencije (engl. *Frequency Sweep*) pri konstantnoj vrijednosti amplitude smične deformacije iz prethodno određenog linearnog viskoelastičnog područja, pri čemu je praćena ovisnost modula smicanja o kutnoj frekvenciji u rasponu frekvencija od 1 Hz do 100 Hz. Test promjene amplitude proveden je na jednom uzorku, a test promjene frekvencije na po dva uzorka svakog gela. Oba testa provedena su pri temperaturi $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i udaljenosti između ploča 1,00 mm.

3.2.6. Praćenje bubrenja

Za praćenje bubrenja korišteni su hidrogelovi pripremljeni u ploči s 24 jažice prethodno opisanim postupkom (Poglavlje 3.2.4.). Neposredno nakon uklanjanja viška otopine CaCl_2 , hidrogelovi su isprani deioniziranom vodom i obrisani suhim papirom. Ostavljeni su na suhom u hladnjaku pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom noći. Idući dan su izvagani i stavljeni u medij IMDM prethodno zagrijan na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. IMDM je korišten za praćenje bubrenja budući da ima sastav i svojstva slična izvanstaničnoj tekućini. Hidrogelovi su stavljeni u inkubator na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ te su u određenim

vremenskim intervalima vađeni iz medija, nježno obrisani papirom i izvagani. Nakon vaganja vraćeni su u medij u inkubatoru, a postupak je ponavljan do potpunog bubrenja, odnosno do ustaljenja mase hidrogela. Mjerenja su provedena u triplikatu.

3.2.7. Uzgoj stanične linije i nacjepljivanje hidrogelova

Za provođenje eksperimenta upotrijebljena je stanična linija ljudskih keratinocita, HaCaT. Stanice su uzgajane u plastičnim Petrijevim zdjelicama u DMEM mediju s 10 % (v/v) fetalnog telećeg seruma (FBS-a) i 1 % (v/v) antibiotika/antimikotika. Kultura stanica inkubirana je pri 37 °C u CO₂ inkubatoru uz odgovarajući stupanj vlažnosti i sastava atmosfere (95 % zraka + 5 % CO₂). Pod svjetlosnim mikroskopom svakodnevno se vršila provjera morfologije stanica, njihove konfluentnosti te općeg stanja kulture, a pasažiranje se provodilo kada je konfluentnost dosegla približno 90 %. Pritom je medij uklonjen, a stanice su isprane fosfatnim puferom (PBS-om). Enzim tripsin korišten je za odvajanje stanica od podloge. Odvajanje stanica praćeno je inverznim svjetlosnim mikroskopom, a vidljivo je i golim okom kao zamućenje otopine enzima u Petrijevoj zdjelici. Kada su stanice odvojene, dodan je 4-5 puta veći volumen DMEM medija (s 10 % FBS-a i 1 % antibiotika) nego što je dodano tripsina, kako bi se enzim inaktivirao ionima metala prisutnima u mediju. Potom je dobivenoj suspenziji određena koncentracija stanica metodom tripan plavo. Pomiješani su jednaki volumeni bojila tripan plavo i homogenizirane suspenzije stanica te je 10 µL dobivene obojane suspenzije otpipetirano pod pokrovnicu Neubauerove komorice. Plavo obojane, žive stanice izbrojane su u mrežici hematocitometra. Žive stanice izbrojane su u sva četiri velika kvadrata Neubauerove komorice, a koncentracija stanica u izvornoj suspenziji izračunata je množenjem ukupnog broja izbrojanih živih stanica sa 5000, faktorom koji uzima u obzir volumen same komorice i razrjeđenje suspenzije bojom. Nakon izračuna, koncentracija stanica razrijeđena je svježim medijem na koncentraciju potrebnu za nacjepljivanje hidrogelova, a dio izvorne suspenzije stanica vraćen je u Petrijevu zdjelicu kako bi se nastavio uzgoj stanica. Hidrogelove je prije nacjepljivanja bilo potrebno sterilizirati. Neposredno nakon geliranja i uklanjanja viška otopine CaCl₂ u jažicu je dodano 500 µL DMEM medija s 4 % (v/v) antibiotika/antimikotika te su ploče ostavljene u inkubatoru pri 37 °C preko noći. Idući dan medij s visokom koncentracijom antibiotika je uklonjen te je u jažice dodano 1 mL svježeg DMEM medija s 1 % antibiotika (i 10 % FBS-a) kako bi se gelovi isprali od antibiotika. Nakon 4 h medij je uklonjen, a hidrogelovi su nacjepljeni suspenzijom HaCaT stanica. U svaku jažicu s

hidrogelom dodano je 500 μ L prethodno homogenizirane suspenzije stanica koncentracije 100 000 stanica po mL, a istim volumenom naciepljena je i jažica bez gela kao kontrolni uzorak. Ploče s naciepljenim nosačima inkubirane su pri 37 °C u CO₂ inkubatoru uz odgovarajući stupanj vlažnosti i sastava atmosfere (95 % zraka + 5 % CO₂), a opće stanje stanica svakodnevno je provjeravano svjetlosnim mikroskopom. Izmjena medija također je provođena svakodnevno. Pritom je približno 450 μ L medija oprezno uklonjeno, kako bi stanični agregati ostali u jažici i kako ne bi došlo do oštećenja površine hidrogela, te je u jažicu dodano 500 μ L svježeg medija istog sastava.

3.2.8. Praćenje vijabilnosti stanica MTT testom

Vijabilnost HaCaT stanica određivana je MTT testom, neizravnom metodom koja se temelji na redukciji topljive tetrazolijeve soli u netopivi formazan djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolijev bromid (MTT) je žuta topljiva sol koja se prevodi u ljubičaste kristale formazana. Kristali formazana otapaju se u dimetilsulfoksidu (DMSO), a intenzitet nastalog obojenja određuje se kolorimetrijski i izravno je proporcionalan količini nastalog formazana. Signal je stoga proporcionalan broju tretiranih živih stanica, ali i njihovoj metaboličkoj aktivnosti. Prvi MTT test proveden je 24 sata nakon naciepljivanja hidrogelova. Za provođenje testa korišten je IMDM medij (bez FBS-a i antibiotika) s dodatkom ishodne otopine MTT-a (0,1 mL ishodne otopine MTT/mL medija). Ishodna otopina MTT-a priređena je otapanjem 25 mg MTT-a u 5 mL PBS-a. Iz jažica s gelovima pažljivo je uklonjeno 480 μ L medija, kako bi stanični agregati ostali u jažici, te je dodano 300 μ L radne otopine MTT-a u IMDM-u. Isti postupak proveden je za kontrolni uzorak, kao i za slijepu probu (hidrogelove bez stanica), nakon čega su ploče vraćene u inkubator na 37 °C i inkubirane 3,5 h kako bi došlo do redukcije MTT-a. Po završetku inkubacije 480 μ L medija pažljivo je uklonjeno te je dodano 1 mL DMSO-a kako bi se kristali formazana otopili. Ploče su zatim premještene na kružnu tresilicu i miješane 10 min pri 70 rpm, nakon čega su vraćene u inkubator na 30 min. Otopine su po isteku vremena dodatno promiješane automatskim pipetama te je iz svake jažice izuzeto 800 μ L DMSO-a, prebačeno u kivetu i spektrofotometrom je izmjerena apsorbancija pri 570 nm. Signal stanica koje rastu na gelu definiran je kao razlika apsorbancije uzorka sa stanicama na gelu i uzorka gela bez stanica, a signal kontrolnih stanica definiran je kao razlika apsorbancije kontrolnog uzorka stanica i čistog DMSO-a. Vijabilnost za pojedine uzorke izražena je kao postotni udio signala

stanica određenog uzorka u odnosu prema signalu kontrolnih stanica. Mjerenje je ponovljeno 96 h (4. dan uzgoja) i 168 h (7. dan uzgoja) od naciepljivanja, a signal kontrolnih stanica određen je samo prvog dana i korišten kao referentna vrijednost za sva mjerenja.

3.2.9. Fluorescencijska mikroskopija

Posljednji dan uzgoja stanice su obojane fluorescentnim bojama koje omogućuju razlikovanje živih od mrtvih stanica kako bi se vizualizirala vijabilnost stanica u staničnim agregatima i na hidrogelovima. Korištene su boje fluorescein diacetat (FDA) i propidij jodid (PI). FDA prodire u žive stanice i tamo se katalitičkom aktivnošću esteraza konvertira u zeleno fluorescentni metabolit fluorescein, dok kod mrtvih stanica ne dolazi do konverzije. PI je crveno fluorescentna boja koja ne prolazi kroz stanične membrane živih stanica, ali prolazi kroz oštećene membrane mrtvih stanica i boji njihove jezgre vezanjem na DNA. Protokol za bojanje stanica preuzet je sa stranica Ibidi® cells in focus (Ibidi®, 2015). Radna otopina za bojanje pripravljena je miješanjem medija IMDM (bez FBS-a i antibiotika), otopine FDA u acetonu (5 mg/mL) te komercijalne otopine PI u PBS-u (2 mg/mL) prema tablici 3. Iz jažica je pažljivo uklonjeno 480 μ L medija i u mraku dodano 250 μ L radne otopine za fluorescentno bojanje. Ploče su vraćene u inkubator i inkubirane 5 min pri 37 °C, nakon čega je većina otopine pažljivo uklonjena. Gelovi su nježno isprani s 1 mL PBS-a, nakon čega je većina volumena PBS-a pažljivo uklonjena (kako bi stanični agregati ostali u jažici) te je u jažice dodano 300 μ L čistog PBS-a. Ploča je čuvana u mraku do provođenja fluorescencijske mikroskopije na inverznom mikroskopu Fluid Cell Imaging Station (Thermo Scientific, SAD). Slike stanica obojanih FDA, odnosno PI, dobivene su zasebnim snimanjem pri određenoj valnoj duljini ekscitacije i primjenom filtera za zelenu (FITC), odnosno crvenu (Texas Red) svjetlost. Tako dobivene slike programski su spojene u jednu sliku kako bi se bolje vidjela raspodjela živih i mrtvih stanica.

Tablica 3. Radna FDA/PI otopina za bojanje (prema Ibidi®, 2015)

Komponenta	Volumen
Medij bez seruma	5 mL
FDA (5 mg/mL)	8 μ L
PI (2 mg/mL)	50 μ L

3.2.10. Obrada podataka

Svi dobiveni rezultati obrađeni su koristeći Microsoft Excel (v16.0). Podaci prikazani u tekstu, slikama i tablicama izraženi su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (\pm SD). Trake pogreške (engl. *error bars*) na slikama prikazuju SD, a nisu prikazane na slikama kod kojih bi uzrokovale nepreglednost.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Posljednjih nekoliko desetljeća intenzivno se razvijaju nove metode konstrukcije staničnih nosača zbog njihove važnosti u različitim granama znanosti, medicine i industrije. Nagli razvoj tkivnog inženjerstva, regenerativne medicine, prehrambene industrije i laboratorijske dijagnostike uzrokovao je porast interesa za pronalaskom staničnih nosača koji bi se mogli izraditi korištenjem jeftinih sirovina, jednostavnim i brzim metodama te uz što manju količinu nastalog otpada. Pritom je velika pozornost posvećena hidrogelovima budući da pokazuju iznimno dobra fizikalno–kemijska i biološka svojstva koja ih čine potencijalno superiornima u odnosu na druge oblike nosača, a moguće ih je konstruirati iz jeftinih sirovina. Cilj ovog rada bila je izrada hidrogelova od pektina i proteina lana, uz dodatak hidrolizata kolagena, koji bi se mogli koristiti kao stanični nosači. Budući da se sirovine korištene u izradi takvih hidrogelova dobivaju iz poljoprivrednog otpada, njihova uspješna konstrukcija predstavljala bi značajan doprinos rastućem trendu održivosti poljoprivrede i proizvodnje hrane. Nadalje, pri njihovoj izradi nisu korišteni kemijski reagensi niti enzimi kako bi proces bio što jednostavniji, jeftiniji te primjereniji industrijskoj proizvodnji. Nosači su testirani na kulturi humanih keratinocita (HaCaT) kao standardnom modelu za provjeru citokompatibilnosti i bioaktivnosti materijala za potencijalnu primjenu u terapiji obnove oštećene kože.

Proces pripreme hidrogelova započeo je izolacijom i karakterizacijom proteina iz uljane pogače lana. Određeni su udjeli proteina u uljanoj pogači i proteinskom izolatu, a proteini su okarakterizirani pomoću SDS PAGE. Priređenim hidrogelovima određena su reološka svojstva i svojstva bubrenja budući da su ta svojstva ključna za definiranje postupaka njihove potencijalne primjene i skladištenja. Ispitana su i biološka svojstva priređenih hidrogelova, odnosno adhezivnost i toksičnost, pomoću MTT metode te svjetlosne i fluorescencijske mikroskopije. Svi dobiveni rezultati, kao i njihove međusobne usporedbe za hidrogelove različitog sastava, prikazani su grafički i tablično u sljedećim potpoglavljima i detaljno raspravljani.

4.1. IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA PROTEINA

4.1.1. Izolacija proteina iz uljane pogače i udjeli proteina

Nakon postupka izolacije proteina (Poglavlje 3.2.1.) iz brašna uljane pogače lana dobiven je proteinski izolat lana. Metodom po Kjeldahlu određeni su udjeli proteina u brašnu uljane pogače lana i proteinskom izolatu lana preračunavanjem udjela dušika u udio proteina pomoću faktora konverzije F . Točan faktor ovisi o podrijetlu samog uzorka, metodama pročišćavanja i izolacije te udjelu drugih tvari s dušikom. Budući da za brašno uljane pogače lana i proteinski izolat lana ne postoji propisan specifičan faktor F , rezultati su dobiveni korištenjem standardnog faktora konverzije udjela dušika u udio proteina $F = 6,25$. Iz dobivenih rezultata izračunati su udio dobivene mase proteinskog izolata lana u odnosu na masu brašna i u odnosu na masu proteina u brašnu lana, te udio dobivenih proteina u odnosu na masu proteina u brašnu [%]. Rezultati su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Prikaz udjela mase proteinskog izolata, odnosno mase proteina, u odnosu na masu uljane pogače, odnosno masu proteinskog izolata

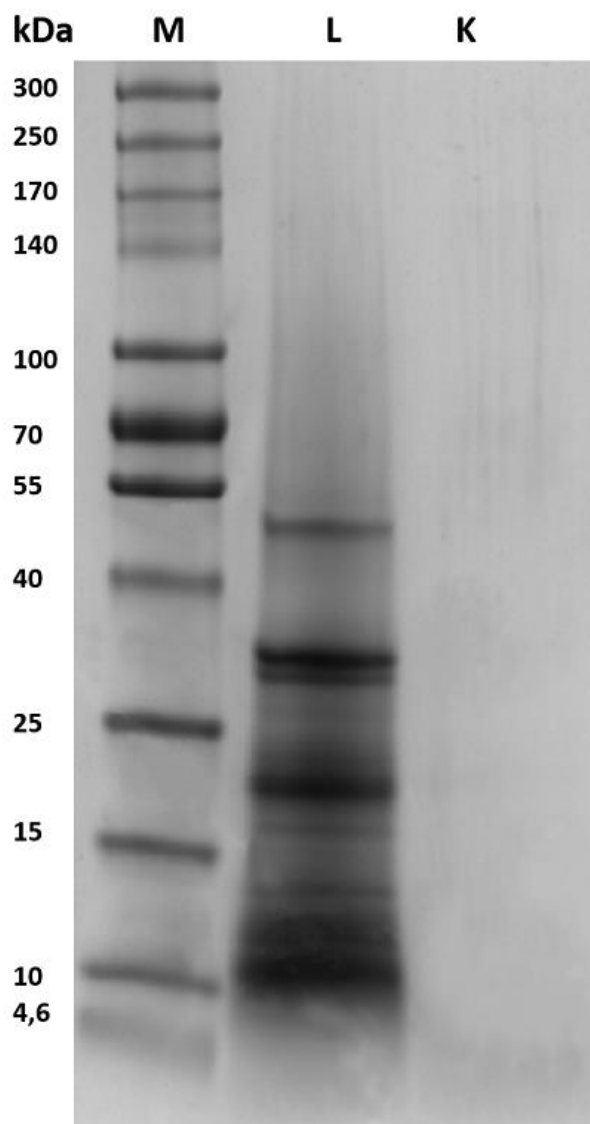
Udio proteina u brašnu uljane pogače lana [%]	$37,80 \pm 0,17$
Udio proteina u proteinskom izolatu lana [%]	$67,54 \pm 0,10$
Udio dobivene mase proteinskog izolata lana u odnosu na masu brašna lana [%]	11,43
Udio dobivene mase proteinskog izolata lana u odnosu na masu proteina u brašnu lana [%]	$30,24 \pm 0,14$
Udio mase izoliranih proteina u odnosu na masu proteina u brašnu lana [%]	$20,42 \pm 0,12$

Iz početne mase uljane pogače lana dobiveno je 11,43 % proteinskog izolata što je vrlo slično vrijednostima dobivenim u prethodnim istraživanjima koje su iznosile 13,4 % i 11,5 % (Logarušić, 2023; Lan i sur., 2020). Određeni udio proteina u proteinskom izolatu od $67,54 \pm 0,10$ % nešto je niži od vrijednosti dobivenih u prethodnim istraživanjima koje su iznosile 78,9 % – 90,6 % (Logarušić 2023; Udenigwe i sur., 2009). Utvrđeno je da je svega 20ak % mase proteina iz uljane pogače izolirano u proteinski izolat lana. Korištena metoda pročišćavnja,

odnosno izolacije (Poglavlje 3.2.1.), ne koristi skupe kemikalije, detergente ni kromatografske kolone te bi stoga mogla biti isplativa na industrijskoj razini, iako je iskoristivost relativno niska. Iskoristivost bi se mogla povećati prethodnim određivanjem točne izoelektrične točke proteina lana u uljanoj pogači te taloženjem pri tom pH, kako bi se kiselinom istaložila maksimalna količina proteina.

4.1.2. Analiza veličine proteina

Sadržaj i molekulske mase peptida u hidrolizatu kolagena te proteina lana korištenih u pripremi hidrogelova procijenjene su pomoću SDS PAGE. Za pripremu hidrogelova i elektroforezu korištena je frakcija proteina proteinskog izolata lana topljiva pri pH 8,0 i temperaturi 25 °C (Poglavlje 3.2.3.). Na dobivenom gelu (slika 7) najizraženije su vrpce proteina lana približnih molekulskih masa: 50 kDa, 30 kDa, 20 kDa i 10 - 13 kDa. Profili molekulskih masa proteina lana određeni prethodnim istraživanjima vrlo su slični (Logarušić, 2023; Lan i sur., 2020). Proteini lanenog sjemena sastoje se od 20 % albumina, koji je protein male molekulske mase (1,6S i 2S), te 80 % globulina koji je protein velike molekulske mase (11S i 12S). Može se pretpostaviti da vrpca pri 10 kDa predstavlja albumin dok vrpca pri 50 kDa predstavlja globulin. Također, vidljive su i vrpce pri 20 kDa i 30 kDa koje se mogu identificirati kao bazna (β) i kisela (α) podjedinica 11S globulina (Lan i sur., 2020). Kod hidrolizata kolagena nije vidljiva vrpca što upućuje na vrlo nisku molekulsku masu hidrolizata, nižu od 4,5 kDa.



Slika 7. Prikaz gela nakon provedene SDS PAGE za proteinske markere (M), proteine lana (L) i hidrolizat kolagena (K) uz prikaz molekularnih masa proteinskih markera. Za provedbu SDS PAGE, koncentracije uzoraka proteina svedene su na približno 50 g/L, a u svaku jažicu (L i K) unijeto je 20 μ L uzoraka.

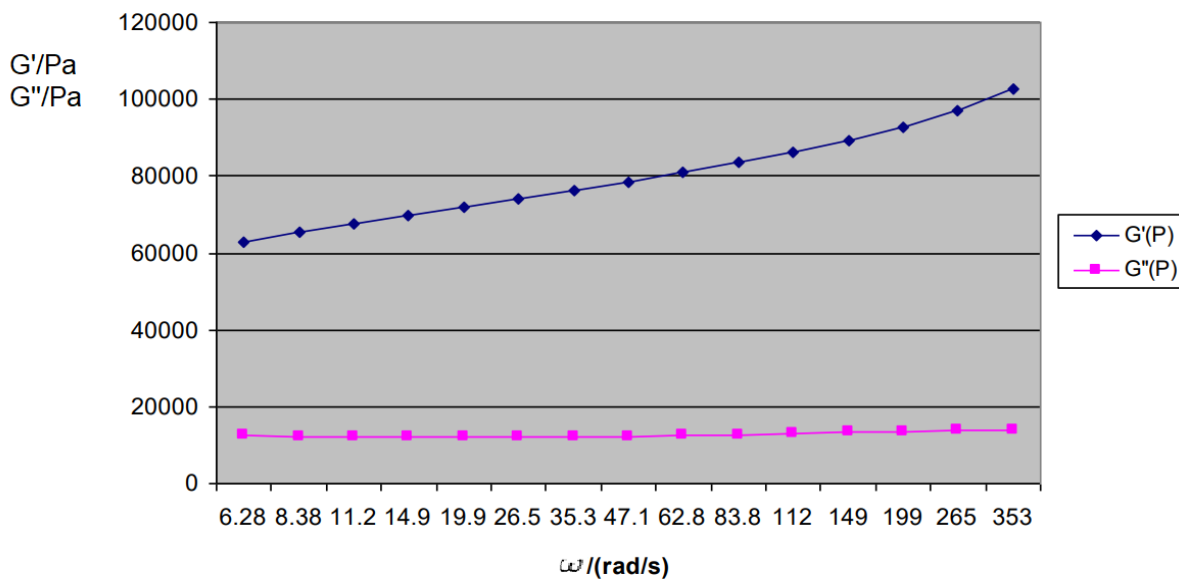
4.1. FIZIKALNA SVOJSTVA HIDROGELOVA

4.1.1. Reološka karakterizacija hidrogelova

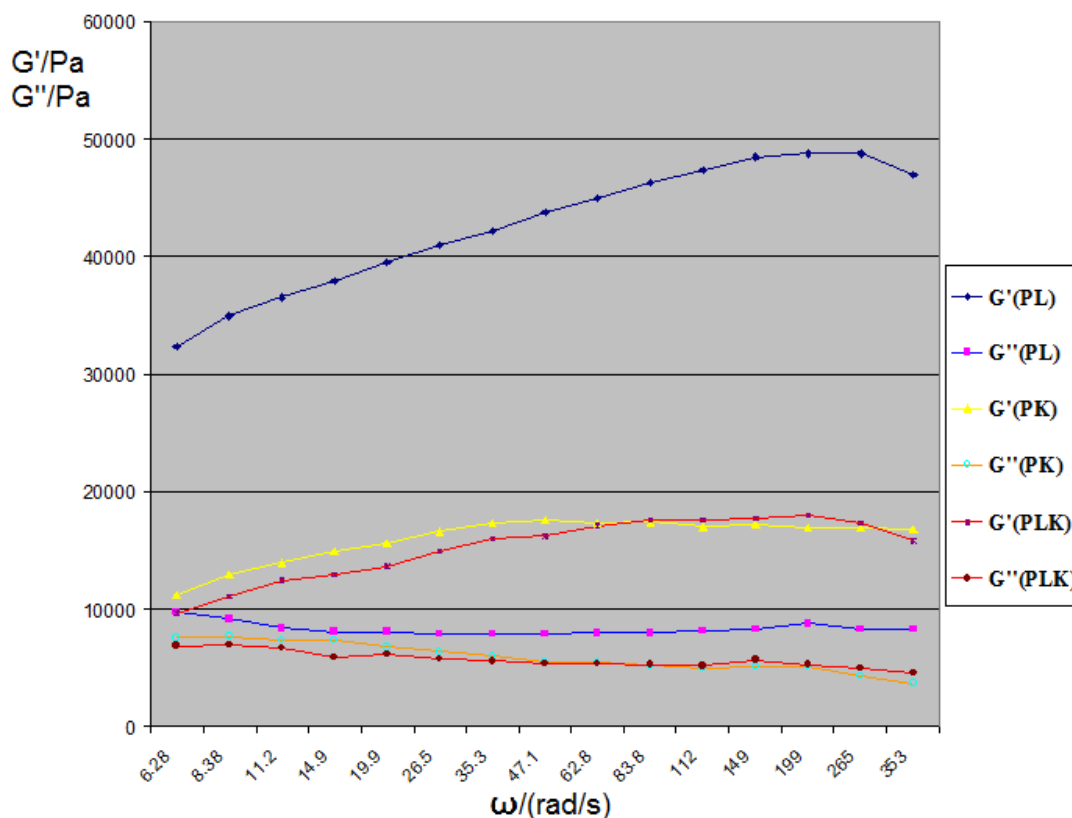
Kako bi se usporedila čvrstoća i stabilnost izrađenih hidrogelova provedeni su oscilacijski reološki testovi. Testom promjene amplitude određene su vrijednosti smične deformacije kod kojih dolazi do narušavanja unutarnje strukture uzoraka te je definirano

linearno viskoelastično područje u kojem viskoelastični moduli smicanja (G' i G'') ne ovise o smičnoj deformaciji, pri frekvenciji 1 Hz. Za hidrogel P određena je granična amplituda smične deformacije $\gamma = 0,05$ %, dok je za ostale hidrogelove (PL, PK i PLK) određena vrijednost $\gamma = 0,01$ %. Testovi promjene frekvencije provedeni su pri prethodno određenoj graničnoj amplitudi smične deformacije. Rezultati pokazuju da je kod svih uzoraka modul pohrane (G') viši od modula gubitka (G''), a njihove krivulje ovisnosti o kutnoj frekvenciji su relativno paralelne, što dokazuje nastanak gel sustava u svih hidrogelova (slike 8 i 9). Faktor gubitka $\tan \delta$ definiran je omjerom modula G'' i G' te je također važan pokazatelj čvrstoće, a njegova ovisnost o kutnoj frekvenciji tijekom provođenja testa promjene frekvencije prikazana je na slici 10. Vrijednosti viskoelastičnih modula su najniže, a faktora gubitka najviše, za uzorke s hidrolizatom kolagena (PK i PLK). Vrijednosti se ne razlikuju značajnije između uzoraka PK i PLK te se može zaključiti da prisutnost hidrolizata kolagena značajno smanjuje čvrstoću gela. Posljedica je to vrlo niske molekulske mase hidrolizata u odnosu na polimere koji grade gelove, ali i vrlo slabih veza između pektina i kolagena. Molekule hidrolizata kolagena sterički ometaju formiranje “egg box” veza, a nemaju dovoljno duge lance koji bi omogućili formiranje stabilne 3D strukture. Vrijednosti modula pohrane (G') za uzorke s proteinima lana počinju padati pri kutnim frekvencijama višim od 200 rad/s što upućuje na nižu stabilnost tih hidrogelova u usporedbi s hidrogelom P. Rezultati testa promjene amplitude i promjene frekvencije te izračunate vrijednosti faktora gubitka jednoznačno potvrđuju da hidrogel P ima najveću čvrstoću i stabilnost, iako je koncentracija polimera najniža. Ionske veze između iona kalcija i karboksilnih skupina galakturonske kiseline u pektinu jače su od veza između molekula proteina i pektina, odnosno između različitih molekula proteina. Riječ je o hidrofobnim interakcijama, vodikovim vezama, van der Waalsovima interakcijama te, u manjoj mjeri, ionskim vezama. Polipeptidni lanci stoga sterički ometaju stvaranje “egg box” veza, a vežu se (međusobno i s pektinom) slabijim vezama te je zbog toga 3D struktura mješovitog gela manje stabilna, iako je ukupna koncentracija polimera viša. Unatoč tome, mehanička svojstva svih izrađenih hidrogelova bolja su od svojstava gelova dobivenih umrežavanjem čistih proteina, bez upotrebe enzima, u dosad objavljenim radovima. Gelove proteina graška znatno nižih izmjerenih vrijednosti viskoelastičnih modula Zhu i sur. (2021) su okarakterizirali kao čvrste gelove iznimno dobrih mehaničkih svojstava za primjenu u proizvodnji čvrstih prehrambenih proizvoda. Stoga se može zaključiti da, iako dodatak proteina lana i hidrolizata kolagena ima negativan utjecaj na mehanička svojstva hidrogelova,

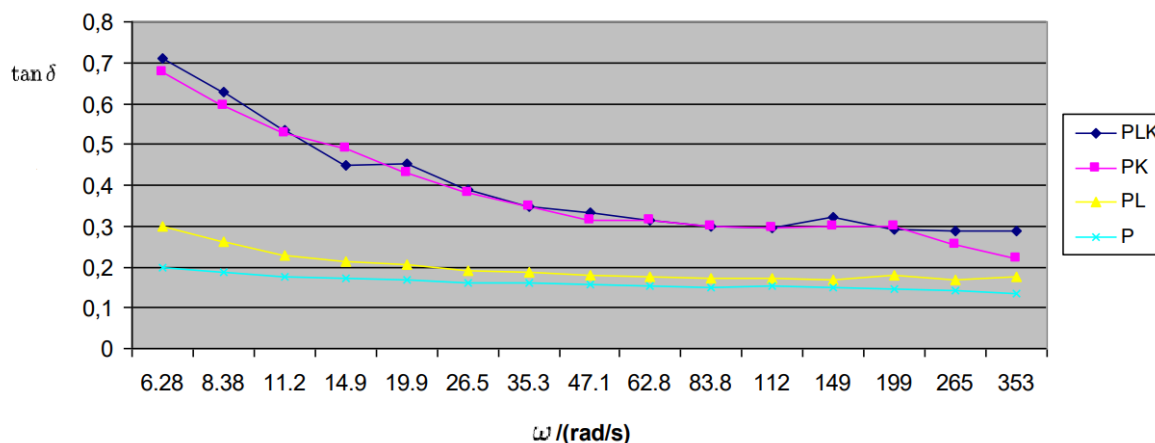
oni su i dalje dovoljno čvrsti i stabilni za upotrebu u prehrambenoj industriji i regenerativnoj medicini.



Slika 8. Ovisnost viskoelastičnih modula G' i G'' o kutnoj frekvenciji za hidrogel P



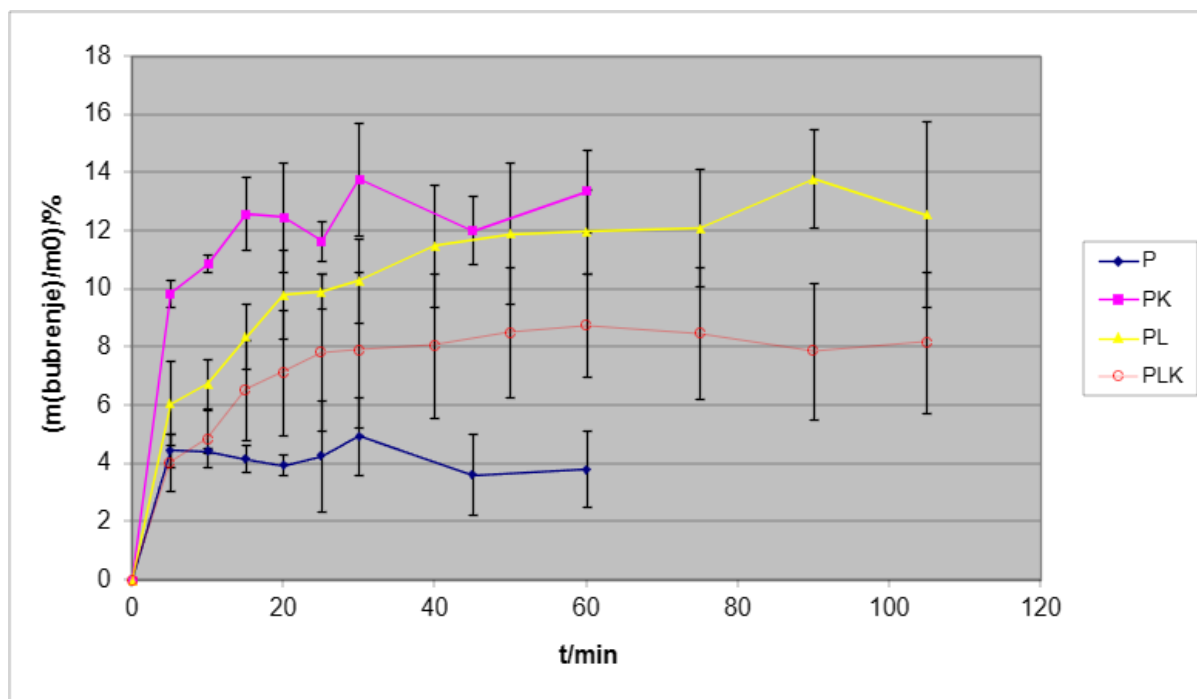
Slika 9. Ovisnost viskoelastičnih modula G' i G'' o kutnoj frekvenciji za hidrogelove PL, PK i PLK



Slika 10. Ovisnost faktora gubitka o kutnoj frekvenciji za hidrogelove P, PL, PK i PLK

4.1.1. Svojstva bubrenja hidrogelova

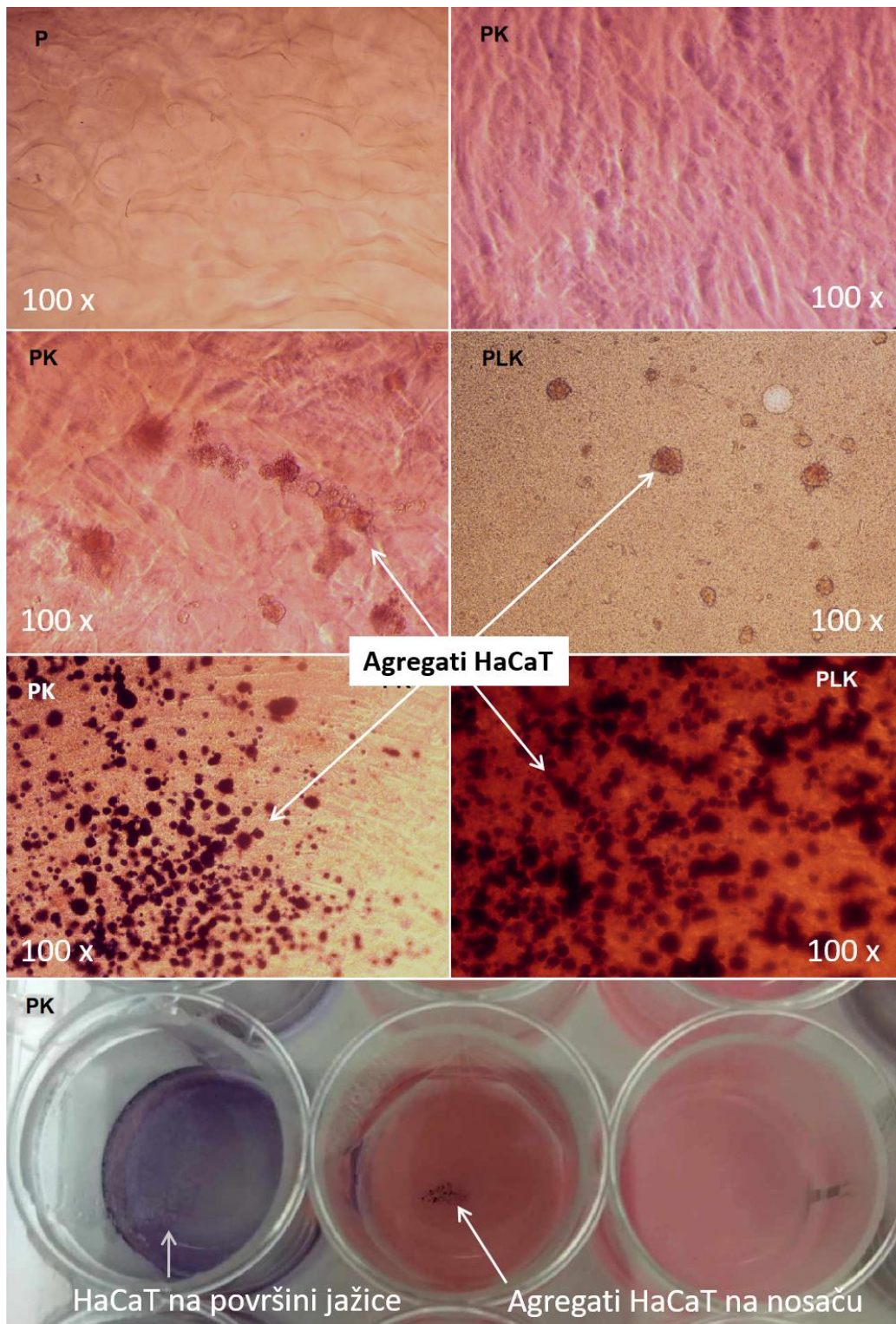
Bubrenje hidrogelova praćeno je pri fiziološkim uvjetima, tj. u hranjivom mediju IMDM, te pri temperaturi 37 °C. Bubrenje je praćeno nakon što su hidrogelovi ostavljeni preko noći na suhom pri 4 °C te udio vode na početku bubrenja nije određen. Budući da su hidrogelovi bili potpuno nabubreni prije stavljanja u hladnjak, udio vode na početku mjerenja ovisio je o kinetici sušenja. Profili bubrenja hidrogelova prikazani su na slici 11. Najniža vrijednost promjene mase tijekom bubrenja uočena je za hidrogel P što je posljedica najsporijeg sušenja tog hidrogela. Velik broj negativno nabijenih skupina u pektinu čvrsto veže molekule vode te je stoga sušenje sporije, odnosno manji udio mase je izgubljen isušivanjem tijekom boravka na suhom. Na grafu se također može vidjeti da je za hidrogel P najbrže došlo do potpunog bubrenja, odnosno da se masa ustalila već nakon 5 min u otopini. Masa gela PK ustalila se nakon približno 15 min, a mase gelova s proteinima lana nakon 25 – 40 min. Ovi rezultati mogu se objasniti manje izraženim hidrofilnim karakterom proteina lana te višom koncentracijom polimera u tim gelovima. “Gušća” polimerna mreža i hidrofobne interakcije između peptidnih lanaca usporavaju prodiranje vode u strukturu hidrogela. Približne vrijednosti parametara koji opisuju sušenje i bubrenje hidrogelova važne su za definiranje postupaka skladištenja, transporta i pripreme hidrogelova prije korištenja.



Slika 11. Ovisnost promjene mase hidrogelova o vremenu bubrenja

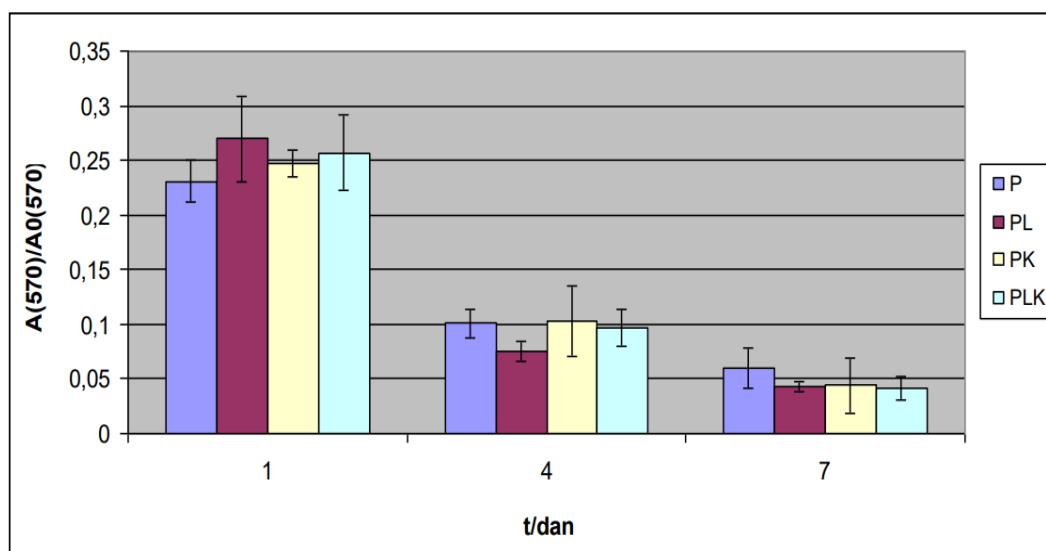
4.2. RAST STANICA NA HIDROGELOVIMA

Izrađeni hidrogelovi korišteni su za uzgoj stanične linije HaCaT, uz svakodnevnu izmjenu medija. Medij je pritom uklanjan vrlo pažljivo kako bi stanični agregati ostali u jažici. Svjetlosnim mikroskopom svakodnevno je praćeno opće stanje stanica, ali i eventualne promjene na površini hidrogelova. Zbog svojstava i visoke koncentracije polimera (Poglavlje 3.2.4.) gelovi nisu imali poroznu strukturu koja bi omogućila 3D rast stanica te je prihvaćanje stanica fizički bilo moguće samo na površini izrađenih hidrogelova. Velika većina stanica nakon nacjepljivanja je odumrla ili se povezala u stanične agregate različite veličine koji nisu bili vezani na gel. Na površini hidrogelova P i PK bile su vidljive brojne brazde i udubljenja (slika 12). Stanice i stanični agregati tijekom prvih dana uzgoja bili su lokalizirani oko takvih neravnina, no nije došlo do čvrstog prihvaćanja stanica te su one tijekom izmjena medija odvojene od površine hidrogelnog nosača. Tijekom uzgoja nije uočena niti jedna stanica morfologije karakteristične za adherentni rast na nosaču (slika 4) što pokazuje vrlo loša citoadhezivna svojstva izrađenih hidrogelova. Nisu uočene niti promjene na površini hidrogelova što dokazuje visoku stabilnost njihove strukture pri fiziološkim uvjetima.



Slika 12. Slike hidrogelova dobivene svjetlosnom mikroskopijom (povećanje 100x). Prvi red (odozgo): hidrogelovi bez stanica; drugi i treći red: hidrogelovi s agregatima HaCaT stanica (nativni i obojani bojilom MTT); u zadnjem redu: slike jažice sa i bez hidrogelova te stanicama tretiranim bojilom MTT.

Vijabilnost stanica tijekom uzgoja određivana je MTT testom. Test se temelji na redukciji topljive tetrazolijeve soli u netopivi formazan djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza, a proveden je 24 h, 96 h i 168 h nakon naciepljivanja hidrogelova. Kristali formazana nastali unutar stanica obojali su stanične agregate u plavoljubičastu boju, a obojani agregati bili su vidljivi i golim okom (slika 12). Intenzitet obojenja je određen spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri 570 nm, a rezultati su prikazani na slici 13. Vijabilnost stanica je opadala tijekom uzgoja što može imati nekoliko uzroka. Odumiranje stanica uslijed nedostatka odgovarajuće podloge za prihvaćanje te smanjenje metaboličke aktivnosti stanica u takvim uvjetima. Drugi, i možda vjerojatniji uzrok je nenamjerno uklanjanja stanica tijekom izmjene hranjivog medija radi održavanja stanica te provođenja MTT testa. Iako su ti postupci pažljivo izvođeni, izvjesno je da je pritom uklanjan i dio stanica budući da one nisu vidljive bez prethodnog bojanja, a niti su čvrsto vezane za podlogu, tj. hidrogelni nosač. Sedmi dan uzgoja vijabilnost stanica je iznosila svega 5 % vijabilnosti stanica kontrolnog uzorka (Poglavlje 3.2.7.). Rezultati pokazuju da nema značajne razlike u vijabilnosti stanica uzgajanih na gelovima različitog sastava. Može se zaključiti da prisutnost proteina lana i hidrolizata kolagena u hidrogelovima nema utjecaja na vijabilnost i morfologiju uzgajanih stanica.



Slika 13. Rezultati MTT testa prikazani kao ovisnost relativne vijabilnosti stanica o vremenu.

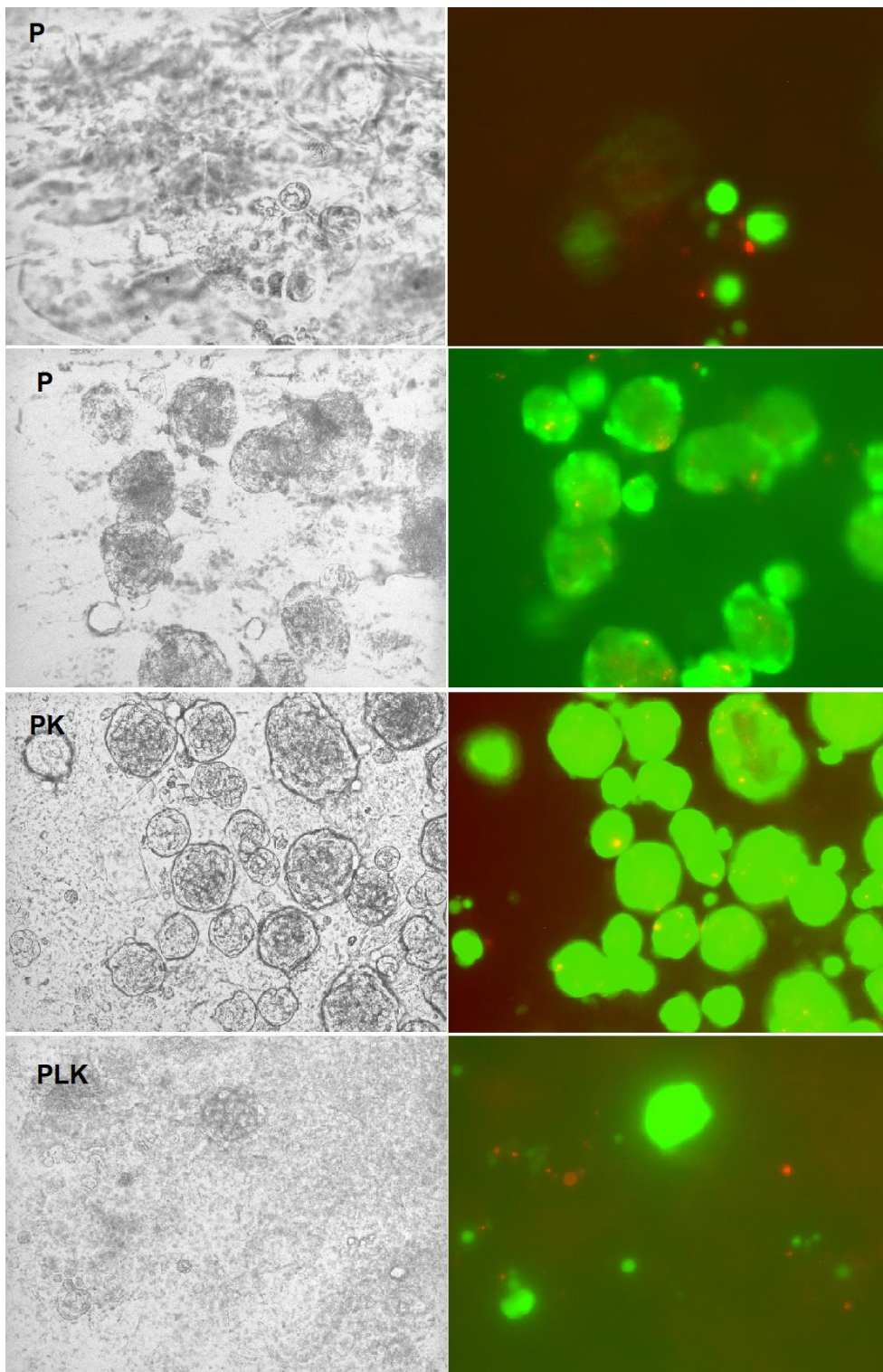
Vijabilnost je prikazana kao omjer apsorbancije uzorka $A(570)$ i apsorbancije referentnog uzorka $A0(570)$. Apsorbancija referentnog uzorka dobivena je provođenjem MTT testa za stanice naciepljene u istoj početnoj koncentraciji u jažicu bez gela, nakon 24 sata uzgoja i jedne izmjene medija.

Posljednji dan uzgoja stanice su obojane fluorescentnim bojilima kako bi se utvrdila vijabilnost stanica u staničnim agregatima i na hidrogelovima. Korištene su boje fluorescein diacetat (FDA) i propidij jodid (PI) koje selektivno boje žive, odnosno mrtve stanice. Fluorescencijska mikroskopija pokazala je da nema značajne razlike u strukturi i vijabilnosti staničnih agregata koji su rasli iznad hidrogelova različitog sastava (slika 14). Uobičajeno je da se u unutrašnjosti velikih staničnih agregata nalaze tzv. nekrotična središta u kojima stanice odumiru, pretpostavlja se, zbog nedostatka nutrijenata izazvanog zagušenošću od nagomilanih stanica. Na slici 14 odumrle stanice vide se kao crveno obojena područja (bojilo PI), no s obzirom na njihovu neznatnu brojnost, evidentno je da agregati još nisu dostigli kritičnu veličinu te da okoliš u kojem stanice rastu nije škodljiv. Stanice većeg dijela agregata su zeleno obojane (bojilo FDA) što znači da su žive te da su u dovoljnoj mjeri u doticaju s hranjivim medijem radi izmjene metabolita. Tijekom istraživanja nije praćena promjena veličine agregata koja bi u ovom slučaju (pored MTT testa) bila dodatni pokazatelj rasta stanica. Stanice prihvaćene za površinu hidrogelova nisu uočene, unatoč našim očekivanjima da bi dodatak proteinske komponente to mogao potaknuti. Ovi rezultati potvrđuju netoksičnost izrađenih hidrogelova te njihova loša citoadhezivna svojstva. Takva svojstva onemogućavaju njihovu primjenu u funkciji nosača za uzgoj stanica, ali su primjerena za druge uloge u medicini i prehrambenom inženjerstvu. Neadherentni pektinski hidrogelovi mogu se koristiti za sprječavanje vezanja zaostalih tumorskih stanica nakon operacije uklanjanja glioma pri čemu su iznimno važna mehanička svojstva korištenog hidrogela (Belousov i sur., 2023). Jedna od metoda modifikacije mehaničkih svojstava je dodatak drugih polimera u hidrogel. Proteini lana (i njihovi hidrolizati) mogli bi biti primjereni za tu ulogu jer, osim što iskazuju bioaktivno djelovanje prema humanim stanicama, utječu i na mehanička svojstva gelova.

Kako bi se proizvedeni hidrogelovi mogli koristiti u funkciji staničnih nosača, potrebna je njihova funkcionalizacija peptidnim skupinama koje omogućavaju prihvaćanje stanica. U tu svrhu koriste se različiti kratki peptidni fragmenti na koje se stanice vežu različitim receptorima, najčešće integrinima. Iako je RGD aminokiselinska sekvenca karakteristična za strukturu fibronektina najčešće korištena, postoji velik broj različitih peptidnih motiva koji pokazuju slična svojstva. Riječ je o sekvencama koje omogućavaju interakcije između stanica, te između stanice i izvanstanične matrice u nativnim tkivima, a karakteristične su za strukturu kolagena, fibronektina, laminina, vitronektina, elastina i drugih proteina izvanstanične matrice. Ove sekvence također su prisutne u različitim proteinima neživotinjskog porijekla, ali u manjoj

mjeri. Bioinformatičke analize pokazale su da je RGD sekvenca prisutna u proteomu različitih biljnih i fungalnih vrsta, a kod određenih parazitskih i patogenih gljiva prisutna je u strukturi do 10 % ukupnih proteina (Teo i sur., 2023). Stoga se proteinski izolati vrsta s visokim udjelom RGD sekvenci mogu koristiti kao funkcionalni dodatak hidrogelovima koji će omogućiti vezanje stanica. Teo i sur (2023) koristili su proteinski izolat jestive gljive baršunaste panjevčice (*Flammulina velutipes*) kako bi poboljšali citoadhezivna svojstva vlakana od hitina i alginata, te poliakrilamidnog gela. Pritom su za dobivanje izolata korištene vrlo jednostavne i jeftine metode: sonikacija, centrifugiranje i termička obrada, bez uporabe ikakvih kemikalija. Nosači funkcionalizirani dobivenim proteinskim izolatom iskazivali su vrlo dobru mogućnost vezanja mišićnih stanica, te dokazuju da se citoadhezivna svojstva nosača mogu poboljšati korištenjem materijala biljnog i fungalnog porijekla. Ovakav pristup omogućio bi održivi izvor citoadhezivnih peptida bez upotrebe materijala životinjskog porijekla, složenih metoda pročišćavanja i kemikalija koje se koriste pri kemijskoj sintezi peptidnih sekvenci.

Mnoštvo recentnih istraživanja, kao i rezultati ovog rada, pokazuju da poljoprivredni otpad te nusproizvodi prehrambene industrije mogu biti sirovina za izradu staničnih nosača izvrsnih svojstava. Pritom se različiti polimeri i bioaktivne tvari biljnog i fungalnog porijekla mogu jednostavnim metodama izolirati i iskoristiti za dobivanje visoko vrijednih proizvoda. Pojedini ugljikohidrati i peptidi iz različitih izvora osiguravaju prikladna mehanička, citoadhezivna i druga svojstva izrađenih nosača.



Slika 14. Vijabilnost agregata HaCaT stanica nakon 7 dana rasta na hidrogelovima. Žive stanice obojane su pomoću FDA (zeleno), a jezgre mrtvih stanica pomoću PI (crveno). Stanice nisu prihvaćene na hidrogelove, već rastu međusobno povezane u formi agregata.

5. ZAKLJUČCI

1. Termičkom obradom otopine pektina (5 %, w/v), uz dodatak proteina lana i/ili hidrolizata kolagena, te geliranjem pomoću kalcijevih iona dobivaju se neporozni mješoviti hidrogelovi (engl. *blends*) dobrih mehaničkih svojstava.
2. Dodatak proteina lana i hidrolizata kolagena smanjuje čvrstoću pektinskih hidrogelova, ubrzava njihovo isušivanje te produžuje vrijeme bubrenja.
3. Proizvedeni hidrogelovi su citokompatibilni, ali imaju loša citoadhezivna svojstva te se stoga ne mogu koristiti kao stanični nosači. Dodatak proteina lana i hidrolizata kolagena u koncentraciji 5,3 % (w/v) u sastav hidrogelova ne potiče adhezivnost stanica.

6. LITERATURA

Ahmed EM (2015) Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res* **6(2)**, 105–121. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>

Akbar S (2020) *Linum usitatissimum* L. (Linaceae). U: Handbook of 200 medicinal plants, Springer, Cham, str. 1101-1121.

Bashir S, Hina M, Iqbal J, Rajpar AH, Mujtaba MA, Alghamdi NA, i sur. (2020) Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties and Their Applications. *Polymers* **12**, 2702. <https://doi.org/10.3390/polym12112702>

Belousov A, Patlay A, Silant'ev V, Kovalev VV, Kumeiko V (2023) Preparation of Hydrogels Based on Modified Pectins by Tuning Their Properties for Anti-Glioma Therapy. *Int J Mol Sci* **24**, 630. <https://doi.org/10.3390/ijms24010630>

Boelsma E, Verhoeven MCH, Ponc M (1999) Reconstruction of a Human Skin Equivalent Using a Spontaneously Transformed Keratinocyte Cell Line (HaCaT). *J Invest Dermatol* **112(4)**, 489-498. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00545.x>

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *J Cell Biol* **106**, 761-771. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>

Braccini I, Perez S (2001) Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules* **2**, 1089–1096. <https://doi.org/10.1021/bm010008g>

Brejnholt SM (2010) Pectin. U: Imeson A (ured.) Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents, Blackwell Publishing, Chichester, str. 237-266.

Brodsky B, Persikov AV (2005) Molecular Structure of the Collagen Triple Helix. *Adv Protein Chem* **70**, 301-339. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70009-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70009-7)

Cao L, Lu W, Mata A, Nishinari K, Fang Y (2020) Egg-Box Model-Based Gelation of Alginate and Pectin: A Review. *Carbohydr Polym* **242**, 116389. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116389>

Chung HJ, Park TG (2007) Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Adv Drug Deliver Rev* **59**, 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.015>

Dutta SD, Ganguly K, Jeong MS, Patel DK, Patil TV, Cho SJ, i sur. (2022) Bioengineered Lab-Grown Meat-like Constructs through 3D Bioprinting of Antioxidative Protein Hydrolysates. *ACS Appl Mater Interfaces* **14**, 34513–34526. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c10620>

FAO/WHO (2016) Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). FAO-Food and Agriculture Organisation of the United Nations, WHO-World Health Organisation, <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=3043>. Pristupljeno 2. prosinca 2023.

Flutto L (2003) PECTIN – Properties and Determination. U: Trugo L, Finglas PM (ured.) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2. izd., Elsevier, Amsterdam, str. 4440-4449.

FOSS Analytical AB (2003) Manual for Kjelttec System 2100 Distilling and Titration Unit.

Gutiérrez C, Rubilar M, Jara C, Verdugo M, Sineiro J, Shene C (2010) Flaxseed and flaxseed cake as a source of compounds for food industry. *J Soil Sci Plant Nutr* **10**, 454-463. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000200006>

Hutmacher DW (2000) Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **3**, 2529-2543. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00121-6](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00121-6)

Ianovici I, Zagury Y, Redenski I, Lavon N, Levenberg S (2022) 3D-printable plant protein-enriched scaffolds for cultivated meat development. *Biomaterials* **284**, 121487. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121487>

Ibidi® cells in focus (2015) Live/dead staining with FDA and PI. https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN33_Live_Dead_staining_with_FDA_and_PI.pdf
Pristupljeno 3. studenoga 2023.

Jones JR (2005) Scaffolds for tissue engineering. U: Hench LL, Jones JR (ured.) Biomaterials, artificial organs and tissue engineering, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, str. 201-214.

Kashyap N, Kumar N, Kumar M (2005) Hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *Crit Rev Ther Drug Carr Syst* **22**, 107-149. <https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v22.i2.10>

Kim M-S, Chandika P, Jung W-K (2021) Recent advances of pectin-based biomedical application: potential of marine pectin. *J Mar Biosci Biotechnol* **13**, 28-47. <https://doi.org/10.15433/ksmb.2021.13.1.028>

Lan Y, Ohm JB, Chen B, Rao J (2020) Physicochemical properties and aroma profiles of flaxseed proteins extracted from whole flaxseed and flaxseed meal. *Food Hydrocolloid* **104**, 105731. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105731>.

Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue Engineering. *Science* **260(5110)**, 920-926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>

Lee CH, Singla A, Lee Y (2001) Biomedical applications of collagen. *Int J Pharmaceut* **221**, 1-22. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00691-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00691-3)

Lee K-H, Lee JP, Kim W (2020) Effects of a complex mixture prepared from agrimonia, houttuynia, licorice, peony, and phellodendron on human skin cells. *Sci Rep* **10**, 22132. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79301-2>

León-López A, Morales-Peñaloza A, Martínez-Juárez VM, Vargas-Torres A, Zeugolis DI, Aguirre-Álvarez G (2019) Hydrolyzed Collagen – Sources and Applications. *Molecules* **24(22)**, 4031. <https://doi.org/10.3390/molecules24224031>

Liang HN, Tang CH (2013) pH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L.)] proteins. *Food Hydrocolloid* **33(2)**, 309-319. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.005>

Logarušić M (2023) Učinci obogaćivanja hranjivoga medija proteinskim hidrolizatima sjemenki lana i konoplje na rast i produktivnost biotehnoški značajnih životinjskih staničnih linija (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

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 Hum Nutr* **75**(4), 518-524. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00841-z>

Logarušić M, Slivac I, Radošević K, Gaurina Srček V (2019) Učinak proteina iz uljane pogače lana na rast i produktivnost CHO-E i HEK-293T stanica. *Croat J Food Sci Technol* **14**, 98-104. <https://doi.org/10.31895/hcptbn.14.3-4.3>

Markov PA, Krachkovsky NS, Durnev EA, Martinson EA, Litvinets SG, Popov SV (2017) Mechanical properties, structure, bioadhesion, and biocompatibility of pectin hydrogels. *J Biomed Mater Res A* **105**(9):2572-2581. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36116>.

Min C, Ma W, Kuang J, Huang J, Xiong YL (2022) Textural properties, microstructure and digestibility of mungbean starch-flaxseed protein composite gels. *Food Hydrocolloid* **126**, 107482. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107482>

Mohamed RS, Fouda K, Akl EM (2020) Hepatorenal protective effect of flaxseed protein isolate incorporated in lemon juice against lead toxicity in rats. *Toxicol Rep* **7**, 30-35. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.12.001>

Neves SC, Gomes DB, Sousa A, Bidarra SJ, Petrini P, Moroni L, i sur. (2014) Biofunctional Pectin Hydrogels as 3D Cellular Microenvironments. *J Mater Chem B* **3**(10), 2096-2108. <https://doi.org/10.1039/c4tb00885e>

Ninfa AJ, Ballou DP, Benore M (2008) *Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology*, Wiley, New Jersey, str. 113.

Pereira RF, Barrias CC, Bártolo PJ, Granja PL (2018) Cell-instructive pectin hydrogels crosslinked via thiol-norbornene photo-click chemistry for skin tissue engineering. *Acta Biomater* **66**, 282-293. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.11.016>

Reddy N, Yang Y (2011) Potential of plant proteins for medical applications. *Trends Biotechnol* **29(10)**, 490-498. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.003>

Tang Y, Wang H, Liu S, Pu L, Hu X, Ding J, i sur. (2022) A review of protein hydrogels: Protein assembly mechanisms, properties, and biological applications. *Colloid Surface B* **220**, 112973. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112973>

Teo YX, Lee KY, Hui Goh CJ, Wang LC, Sobota RM, Chiam K-H, i sur. (2023) Fungus-derived protein particles as cell-adhesive matrices for cell-cultivated food. *NPJ Sci Food* **7**, 34. <https://doi.org/10.1038/s41538-023-00209-y>

Udenigwe CC, Lu Y-L, Han C-H, Hou W-C, Aluko RE (2009) Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages. *Food Chem* **116(1)**, 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.046>

Vo TMT, Kobayashi T, Potiyaraj P (2022) Viscoelastic Analysis of Pectin Hydrogels Regenerated from Citrus Pomelo Waste by Gelling Effects of Calcium Ion Crosslinking at Different pHs. *Gels* **8(12)**, 814. <https://doi.org/10.3390/gels8120814>

Wu S, Wang X, Qi W, Guo Q (2019) Bioactive protein/peptides of flaxseed: A review. *Trends Food Sci Tech* **92**, 184-193. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.017>

Ye X-P, Xu M-F, Tang Z-X, Chen H-J, Wu D-T, Wang Z-Y i sur. (2022) Flaxseed protein: extraction, functionalities and applications. *Food Sci Technol* **42**, e22021. <https://doi.org/10.1590/fst.22021>

Zhu P, Huang W, Guo X, Chen L (2021) Strong and elastic pea protein hydrogels formed through pH-shifting method. *Food Hydrocolloid* **117**, 106705. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106705>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja MATIJA MALTARSKI izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Matija Maltarski

Vlastoručni potpis