

# In vitro biološka svojstva hidrolizata proteina iz pogače konoplje

---

**Bagović, Martina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*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:159:019872>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018.

Martina Bagović  
874/MB

***In vitro* BIOLOŠKA SVOJSTVA  
HIDROLIZATA PROTEINA IZ  
POGAČE KONOPLJE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu HRZZ projekta IP-2016-06-3848 „Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Višnje Gaurina Srček.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Višnji Gaurina Srček na velikoj pomoći, uloženom vremenu i trudu te prenesenom znanju. Također bih se zahvalila doc. dr. sc. Kristini Radošević i mag. ing. Manueli Panić na izrazitoj susretljivosti i pomoći, kao i svim zaposlenicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na ugodnoj radnoj atmosferi i pristupačnosti.*

*Zahvaljujem se i svojoj obitelji i prijateljima na podršci.*

## 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

### *In vitro* BIOLOŠKA SVOJSTVA HIDROLIZATA PROTEINA IZ POGAČE KONOPLJE

*Martina Bagović 874/MB*

**Sažetak:** Industrijska konoplja (*Canabis sativa L.*) se uz ostale primjene koristi i u proizvodnji ulja, pri čemu nakon ekstrakcije ulja iz sjemenki zaostaje vrijedan nusproizvod – pogača, koja obiluje proteinima. Enzimskom hidrolizom proteina izdvojenih iz uljnih pogača dobivaju se peptidi koji posjeduju određenu biološku aktivnost koja se može iskoristiti za proizvodnju prirodnih lijekova i dodataka prehrani. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati biološka svojstva hidrolizata proteina konoplje u *in vitro* uvjetima. Antiproliferacijski učinak hidrolizata ispitan je na dvije tumorske stanične linije (HeLa i MCF-7) ovisno o korištenim enzimima tijekom hidrolize (enzimi alkalaza, neutraza i protamex) te veličini peptidnih frakcija hidrolizata proteina dobivenih enzimom alkalazom (>10, 3-10 i <3 kDa). Dobiveni rezultati ukazuju da svi pripremljeni hidrolizati posjeduju antioksidacijsku aktivnosti kao i pripremljene frakcije hidrolizata. Antiproliferacijsku aktivnost na tumorskim staničnim linijama pokazao je samo hidrolizat dobiven alkalazom te njegove veće frakcije (>10 i 3-10 kDa). Također je dokazan i protektivni učinak hidrolizata i frakcije (<3 kDa) proteina konoplje dobivenih pomoću enzima protamex na inducirani oksidacijski stres u HeLa stanicama.

**Ključne riječi:** pogača konoplje, hidrolizati proteina, antioksidacijska aktivnost, oksidacijski stres

**Rad sadrži:** 38 stranica, 12 slika, 0 tablica, 40 literaturni navod, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc. dr. sc. Kristina Radošević
2. Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček
3. Doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
4. Prof. dr. sc. Ksenija Durgo-zamjena

**Datum obrane:** 21. rujna 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### ***In vitro* BIOLOGICAL ACTIVITY OF PROTEIN HYDROLYSATES OBTAINED FROM HEMPSEED MEAL**

***Martina Bagović 874/MB***

**Abstract:** Industrial hempseed (*Canabis sativa L.*) among its diverse applications can also be used in the oil industry. After obtaining oil from hempseed, remains a valuable by product – hempseed meal, which has high levels of protein. Peptides with biological activity are released by enzymes hydrolysis of hempseed meal proteins. This potential can be used for the production of natural medications or food supplements. Therefore, in this thesis, the biological activity of protein hydrolysates from hempseed meal was studied *in vitro*. Antiproliferative effects were studied in two cancer cell lines (HeLa and MCF-7) in dependence of enzyme used for hydrolysis (Alcalase, Neutrase and Protamex) and the size of peptide fractions obtained by Alcalase (>10, 3-10 and <3 kDa). Study has confirmed the antioxidative activity of all prepared hydrolysates and their peptide fractions. The antiproliferative activity was observed only in hydrolysates obtained by Alcalase and its bigger fractions (>10 and 3-10 kDa). Lastly, the protective effect of hydrolysate obtained by Protamex and its fraction (<3 kDa) during induced oxidative stress was confirmed in HeLa cell line.

**Keywords:** hempseed meal, protein hydrolysate, antioxidative activity, oxidative stress

**Thesis contains:** 38 pages, 12 figures, 0 tables, 40 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD. Višnja Gaurina Srček, Full Professor

#### **Reviewers:**

1. PhD. Kristina Radošević, Assistant Professor
2. PhD. Višnja Gaurina Srček, Full Professor
3. PhD. Andreja Leboš Pavunc, Assistant Professor
4. PhD. Ksenija Durgo, Full Professor-substitute

**Thesis defended:** 21<sup>st</sup> of September, 2018.

Sadržaj	stranica
<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
<b>2.1. Biološka aktivnost proteina i peptida iz hrane</b> .....	3
2.1.1. Industrijska konoplja kao izvor bioaktivnih spojeva.....	4
<b>2.2. Oksidacijski stres u stanicama</b> .....	6
2.2.1. Metode određivanja antioksidacijskog stresa.....	8
<b>2.3. Kulture životinjskih stanica</b> .....	9
2.3.1. Hidrolizati proteina kao sastojci medija bez seruma.....	11
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	13
<b>3.1. Materijali</b> .....	13
3.1.1. Kemikalije.....	13
3.1.2. Otopine i puferi.....	14
3.1.3. Uređaji i oprema.....	15
3.1.4. Stanična linija HeLa.....	16
3.1.5. Stanična linija MCF-7.....	17
<b>3.2. Metode rada</b> .....	17
3.2.1. Određivanje antioksidacijskog potencijala hidrolizata proteina konoplje ORAC metodom.....	17
3.2.2. Uzgoj HeLa i MCF-7 stanica u T-bocama.....	19
3.2.3. Učinak dodatka hidrolizata proteina konoplje na rast HeLa i MCF-7 stanica kolorimetrijskom MTS metodom.....	19
3.2.4. Određivanje oksidacijskog stresa u HeLa stanicama pomoću analizatora staničnog zdravlja Muse®.....	20
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	22
<b>4.1. Antioksidacijski potencijal hidrolizata proteina iz pogače konoplje</b> .....	23
<b>4.2. Učinci hidrolizata proteina iz pogače konoplje na proliferaciju HeLa i MCF-7 stanica</b> .....	26
<b>4.3. Učinci frakcija hidrolizata proteina iz pogače konoplje pripremljenih enzimom alkalazom na proliferaciju HeLa i MCF-7 stanica</b> .....	28
<b>4.4. Učinci hidrolizata proteina iz pogače konoplje na inducirani oksidacijski stres u HeLa stanicama</b> .....	30
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	34
<b>6. LITERATURA</b> .....	35



# 1. UVOD

U modernom svijetu sve smo više suočeni s mnogim izazovima i užurbanim životnim tempom koji često ima negativne posljedice na ljudsko zdravlje. Sukladno tome mijenja se i globalno mišljenje te se stavlja sve veći naglasak na zdrav način života kao prvu obranu od razvitka mnogih oboljenja. Usko povezano s time je i pitanje prehrane i okretanje što prirodnijem izvoru ne samo hrane, već i dodataka prehrani te lijekovima. Zato se sve veći naponi ulažu u dobivanje funkcionalne hrane, koja će modernom čovjeku pomoći u očuvanju kvalitete života.

Među najvažnijim sastojcima hrane su zasigurno proteini koji su ujedno izvor energije i esencijalnih aminokiselina koje su čovjeku prijeko potrebne za normalno funkcioniranje organizma. Zanimljiv izvor proteina su pogače nastale kao nusproizvod prerade ulja raznih sjemenki uljarica. Proteini iz pogača u svome sastavu najčešće posjeduju brojne bioaktivne tvari koje posjeduju različita svojstva poput antihipertenzijske (ACE inhibitori), antioksidacijske, imunomodulatorne, antimikrobne i čak antitumorske aktivnosti (Karamać i sur., 2014; FitzGerald i sur., 2003). Osim toga predstavljaju jeftiniju alternativu enzimskim bioaktivnim tvarima, a zbog navedenih svojstva otvara se mogućnost njihove primjene kao lijekova i dodataka prehrani s ciljem sprječavanja bolesti.

Bioaktivni spojevi imaju sposobnost unapređenja zdravlja i smanjenje rizika obolijevanja od mnogih bolesti koje prijete modernome čovjeku (Kannan i sur., 2008). Kao vrlo važan faktor razvitka mnogih oboljenja je oksidacijski stres u organizmu, koji nastaje poremećenom ravnotežom reaktivnih kisikovih vrsta i njihovim prekomjernim nakupljanjem. Dokazano je da više faktora poput prehrambenih navika, stresa i okolišnih uvjeta djeluju na smanjenje antioksidacijske obrane organizma što dovodi do nastanka bolesti poput raka, smanjenog imuniteta, ateroskleroze, dijabetesa, hipertenzije i dr. (Kadam i Lee, 2017). Također, jedna od najistraživanijih aktivnosti bioaktivnih peptida iz proteina jest njihova antioksidacijska aktivnosti (Karamać i sur., 2014). Bioaktivni peptidi iz proteina dobivaju se enzimskom hidrolizom, a na njihovu aktivnost utječe vrsta i vrijeme trajanja hidrolize, kao i aminokiselinski sastav dobivenih peptida. Biološki potencijal hidrolizata ovisan je o kemijskoj strukturi oslobođenih peptida, a duljina peptidnog lanca određuju njihov potencijalni biološki učinak (Samaranayaka i Li-Chan, 2011; Hartman i Miesel, 2007).

*Cannabis sativa L.* ili industrijska konoplja je biljka koja se sve više istražuje nakon što je dozvoljen njen legalan uzgoj. Od mnogih korisnih proizvoda koji se dobivaju njenim iskorištavanjem (od vlakana za tekstilnu industriju i proizvodnju papira do prehrambenih namirnica) otkrivaju se i druge tvari koje se mogu koristiti u liječenju ili kao dodatak prehrani. Brojna istraživanja su usmjerena na određivanje antioksidacijskog potencijala proteinskih hidrolizata iz sjemenki konoplje. Međutim postoji vrlo malo istraživanja u kojima se ispituje antiproliferacijska aktivnost proteinskih hidrolizata konoplje u kulturama tumorskih stanica, što bi eventualno ukazalo na antitumorski potencijal proteinskih hidrolizata.

Na osnovu svega navedenog, a temeljem dosadašnjih spoznaja o učincima bioaktivnih tvari proteinskih hidrolizata, ispitat će se učinci proteinskih hidrolizata iz uljne pogače konoplje na dvije tumorske stanične linije HeLa i MCF-7, u ovisnosti o vrsti enzima za hidrolizu te veličini peptidnih ostataka. Hidroliza će se provesti s tri različita komercijalna enzima: alkalaza, neutraza i protamex, a hidrolizat s najvećim antiproliferacijskim potencijalom će se frakcionirati kako bi se dobile komponente različitih molekularnih masa (>10 kDa, 3-10 kDa i <3 kDa). Pripremljenim hidrolizatima i frakcijama će se ORAC metodom odrediti antioksidacijski potencijal te učinci na proliferaciju u HeLa i MCF-7 staničnim linijama i inducirani oksidacijski stres u HeLa staničnoj liniji.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Biološka aktivnost proteina i peptida iz hrane

Sve više pažnje i truda posvećuje se otkrivanju i dokazivanju činjenice da proteini, uz doprinos na energetske nivou i nivou esencijalnih aminokiselina, imaju i veliki potencijal zbog svoje biološke aktivnosti kao i moguće primjene u industriji lijekova i dodataka prehrani. Istraživanja ukazuju na veliku važnost upravo proteinskih hidrolizata i njihovih peptidnih frakcija. U suvremenom svijetu postalo je iznimno važno razvijati metode i proizvode koji sadrže bioaktivne peptide iz proteina za unapređenje životnih standarda (Kadman i Lee, 2017). Hidrolizati proteina dobivaju se postupkom enzimske, kiselinske ili mikrobne hidrolize biološkog materijala iz nusprodukata hrane. Bioaktivni peptidi oslobođeni hidrolizom su specifični fragmenti, koji iako inaktivni u sekvenci nativnog proteina, u samostalnom obliku mogu imati puno više fizioloških funkcija od samog proteina (Sarmadi i Ismail, 2010). Mallander je prvi zabilježio bioaktivni peptid iz mlijeka i to još 1950.godine (Raikos i Dassios, 2014). Također je dokazano da enzimska hidroliza proteina rezultira oslobađanjem antihipertenzivskih (ACE inhibitori), antioksidacijskih, imunomodulatornih, antimikrobnih i osteoprotektivnih peptida (Karamać i sur., 2014).

Proteinska hidroliza je nužan korak u karakterizaciji proteina, identifikaciji, kvantifikaciji kao i u proizvodnji biološki aktivnih peptida. Hidroliza ima veliki utjecaj na kvalitetu dobivenih bioaktivnih peptida, od mogućnosti apsorpcije do same aktivnosti. Uobičajeno veličina hidrolizata varira od 2-9 aminokiselinskih ostataka s molekularnom masom manjom od 6 000 Da (Sarmadi i Ismail, 2010). Međutim, problem kod primjene hidrolizata u cilju pozitivnog djelovanja na organizam jest njihova razgradnja i probava potencijalno aktivnih supstanci. Dobivanje manjih peptidnih fragmenata osigurava bolju apsorpciju i probavu. Također prema Kadman i Lee (2017) peptidi s malom molekularnom masom mogu se lako apsorbirati s malo ili bez negativnih posljedica. Primjena različitih tipova hidrolize utječe i na aminokiselinski sastav, koji direktno utječe na aktivnost peptida. Tako se hidrolizom proteina uljane repice na membranama s različitim propusnošću molekularnih masa vidjelo da peptidi manji od 1 kDa imaju znatno veći antioksidacijski potencijal, a puno manju aktivnost keliranja željezovih iona (Kadam i Lee, 2017). Također, izbor enzima i stupnja hidrolize od značajne su važnosti u poboljšanju funkcionalnih karakteristika, kao i antioksidacijske aktivnosti (Li i sur., 2015).

Peptidi s antioksidacijskom aktivnošću imaju veliki potencijal u poboljšanju kvalitete života, a karakteristike poput inhibitora lipidne peroksidaze, „scavengeri“ slobodnih radikala i kelatori tranzicije prijelaznih metala, čine ih zanimljivim za brojna istraživanja. Sam mehanizam njihove aktivnosti nije u potpunosti razjašnjen te postoje mnoga istraživanja od kojih je među zanimljivijima istraživanje Erdmann i sur. (2006), gdje je ispitano induciraju li antioksidacijski peptidi gene koji su povezani s prirodnim mehanizmima obrane od antioksidacijskog stresa. Naime, pokazali su da dipeptid Met-Tyr iz mišića sardine sprječava oksidativni stres tako da stimulira ekspresiju Hem oksigenaze-1 i feritina u endotelnim stanicama. Hem oksigenaza-1 sudjeluje u metabolizmu hema i stvaranju bilirubina (bitan antioksidans u organizmu čovjeka), dok feritin izdvaja citosolne ione željeza (koji su katalizatori formiranja slobodnih radikala) i onemogućava njihovu aktivnost. U radu Kannan i sur. (2009) dokazalo se antitumorsko djelovanje peptidnih hidrolizata iz soje na stanice raka dojke i crijeva. Time se otvorilo veliko područje istraživanja antitumorske aktivnosti i drugih proteinskih hidrolizata. Peptidi s antioksidacijskom aktivnošću imaju prednost pred enzimskim antioksidansima jer im jednostavnija struktura omogućava veću stabilnost u različitim okruženjima, ne predstavljaju opasnost od imunoreakcija, te posjeduju i nutritivne i funkcionalne karakteristike (Sarmadi i Ismail, 2010). Smatraju se sigurnim i zdravim molekulama s niskom cijenom, velikom aktivnosti i lakom apsorpcijom.

Antioksidacijska aktivnost peptida je najviše povezana s hidrofobnošću i aminokiselinskim sastavom. Tako su na primjer Tyr, Trp, Met, Lys, Cys i His aminokiselinski ostatci najviše povezani s antioksidacijskom aktivnošću, a za čije djelovanje je bitan i njihov pravilan redoslijed u peptidnom lancu (Sarmadi i Ismail, 2010).

### 2.2.1. Industrijska konoplja kao izvor bioaktivnih spojeva

Industrijska konoplja ili *Cannabis sativa L.* (slika 1) je biljka koja se zanemarivala dugi niz godina zbog kemijskog sastava koji pripada kanabinoidnoj porodici, među njima i delta-9-tetrahidrokanabinol (THC) koji posjeduje opijatna svojstva zbog čega joj je legalan uzgoj dugo bio zabranjen. No, sam kemijski sastav konoplje uvelike ovisi o načinu uzgoja i tipu zemlje (Caron, 2015). Kultivacijom sorti koje imaju znatno manji udio THC-a, omogućeno je legalno uzgajanje i iskorištavanje raznih blagodati ove zanimljive biljke.

Sjeme konoplje koristilo se tisućama godina u starom svijetu kao važan izvor nutrijenata, te kao tradicionalan lijek za mnoga oboljenja (Callaway, 2004). Praktički zanemarivana do početka 20. stoljeća, nutritivna svojstva konoplje nisu se pretjerano istraživala kao ni primjena u industrijskim procesima ili kao dodatak prehrani. Mogućnost kultivacije je u zadnjem desetljeću omogućila korištenje konoplje za proizvodnju papira i odjeće u Kanadi i europskim zemljama. U azijskim se zemljama sjeme konoplje, usitnjeno ili cjelovito koristi u tradicionalnoj hrani i lijekovima, dok se u Sjevernoj Americi sjeme konoplje koristi u industriji boja i lakova te se uvozi kao hrana za ptice.



**Slika 1.** Industrijska konoplja (*Cannabis sativa L.*) [Izvor: Huffington Post Quebec]

Ulje konoplje sadrži preko 80 % polinezasićenih masnih kiselina i izvor je dvije esencijalne masne kiseline: linolenske (18:2 omega-6) i  $\alpha$ -linolenska (18:3 omega-3). Također, njen omjer omega-3 i omega-6 masnih kiselina iznosi 2:1 ili 2:3, što se smatra optimalnim za ljudsko zdravlje. Nakon proizvodnje ulja, nastaje puno nusproizvoda koji se pokušavaju na što bolji način iskoristi i time doprinijeti boljoj učinkovitosti cjelokupne proizvodnje konoplje. Tako u industriji proizvodnje jestivog ulja konoplje kao nusproizvod zaostaje uljna pogača, koja se najčešće koristi kao stočna hrana ili gnojivo.

Sjeme konoplje nakon obrade, uobičajeno sadrži preko 30 % ulja i oko 25 % proteina, s velikim brojem dijetskih vlakana, vitamina i minerala, zbog čega se kao nusproizvod počela istraživati i u drugim poljima, pogotovo kao funkcionalna hrana.

Proteini konoplje (od kojih su najbitniji globulin i albumin) imaju visok sadržaj aminokiselina koje sadrže sumpor: metionin i cistein, kao i visoku razinu arginina i glutaminske kiseline. Brašno

konoplje bogat je izvor proteina i polinezasićenih masnih kiselina i uz to sadrži značajne količine vitamina i korisnih minerala. Nedavna klinička istraživanja pokazala su da ulje konoplje predstavlja funkcionalnu hranu te korištenjem kao dodatak prehrani životinja pozitivno utječe na njihovo zdravlje (Callaway, 2004).

Istraživanja u Americi iz 2008. godine su dokazala da konoplja ima znatno veću efikasnost kao antiemetik u usporedbi s drugim lijekovima kod pacijenata oboljelih od raka (Rocha i sur., 2008). Drugo istraživanje je pokazalo da konoplja ima i antibakterijski potencijal, gdje je pokazano da glavne komponente konoplje imaju dobru antibakterijsku aktivnost protiv MRSA-e (meticiklin rezistentan *Staphylococcus aureus*) (Caron, 2015). U radu Malomo i sur. (2015) *in vitro* testovima je utvrđeno da proteinski hidrolizati konoplje imaju inhibitorno djelovanje na renin i angiotenzin konvertacijski enzim (ACE), koji se smatraju glavnim uzročnicima visokog tlaka koji dovodi do sekundarnih oboljenja poput moždanih udara, koronarnih bolesti srca i zatajenja srca. Kao takav postaje potencijalni materijal za antihipertenzijske peptidne proizvode.

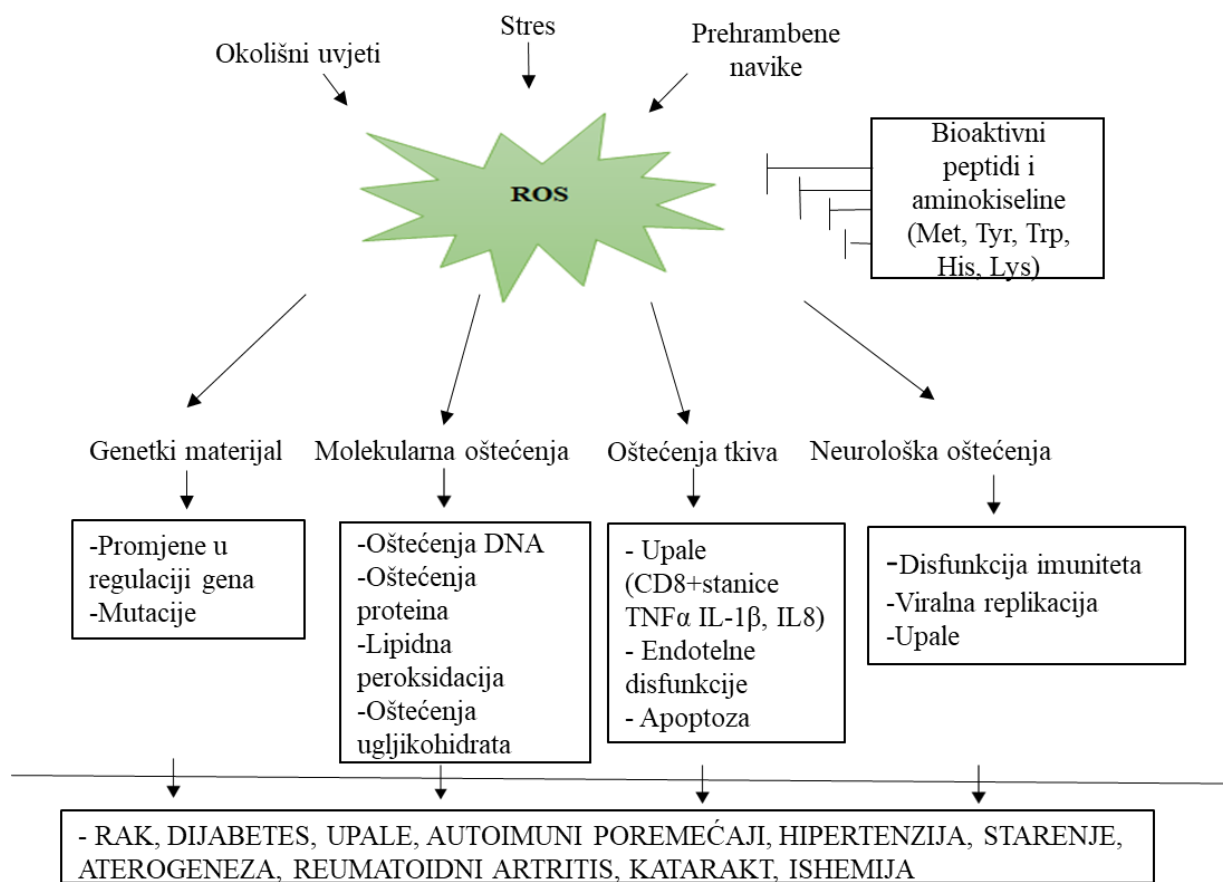
Također je vrlo važan antioksidacijski potencijal proteinskih hidrolizata konoplje koji pomaže u smanjenju oksidacijskog stresa koji ima negativne učinke na ljudsko zdravlje. Tim aspektom biološke aktivnosti pobliže se bavi i ovaj diplomski rad, a dokazi o antioksidacijskoj aktivnosti su opisani u mnogim radovima, poput rada Wang i sur. (2009) gdje je osim same antioksidacijske aktivnosti proteinskih hidrolizata konoplje dokazana i korelacija s načinom hidrolize te sastavom hidrofobnih aminokiselina.

## **2.2. Oksidacijski stres u stanicama**

Prirodna pojava koja se javlja uslijed aerobnog staničnog metabolizma jest stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (eng. Reactive Oxygen Species ili ROS) i reaktivnih dušikovih vrsta (eng. Reactive Nitrogen Species ili RNS). Reaktivne kisikove vrste su skupina slobodnih radikala ( $O_2^{\bullet-}$ , superoksidni radikal;  $OH^{\bullet}$ , hidroksilni radikal;  $HO_2^{\bullet}$ , peroksidni radikal i  $RO^{\bullet}$ , alkoksidni radikal) i reaktivnih molekula ( $H_2O_2$ , vodikov peroksid i  $O_2$ , singletni kisik) proizašlih iz kisika. Organizmi koji stvaraju ROS-ove su razvili mehanizme održavanja ravnoteže, stvarajući antioksidacijske molekule i enzime koji ih uklanjaju. ROS-ovi u niskim do srednjim koncentracijama djeluju kao sekundarni glasnici u unutarstaničnim signalnim kaskadama i posreduju u hormonskom odgovoru stanice. Smanjenju antioksidacijske zaštite pridonose i stres,

okolišni uvjeti i prehrambene navike (Kadam i Lee, 2017). Narušavanje ravnoteže ROS-ova u organizmu dovodi do njihovog prekomjernog nakupljanja i nastanka oksidativnog stresa (slika 2).

Oksidativni stres je često povezan s kroničnim oboljenjima poput hiperkolesterolemije, hipertenzije, šećerne bolesti koja povećava generiranje ROS-a i uzrokuje kardiovaskularne poremećaje, zatim angiogeneze, hipertenzije, autoimunih poremećaja, starenja, reumatoidnog artritisa i mnogih drugih oboljenja (Kadam i Lee, 2017). Također se oksidativni stres, prema istim autorima, smatra rizičnim faktorom za razvoj raka prostate kroz malignu transformaciju i progresiju raka sudjelovanjem ROS-a u unutarstaničnim fiziološkim i patološkim procesima, koji uključuju proliferaciju stanica, inhibiciju apoptoze, invaziju, metastaziranje i angiogenezu.



**Slika 2.** Oksidativni stres i njegova uloga u razvoju različitih bolesti (Kadam i Lee, 2017)

U prevenciji razvoja oboljenja uslijed pojave oksidacijskog stresa pomažu antioksidansi. Postoje prirodni i sintetski antioksidansi. Sintetski antioksidansi poput Troloxa su jeftini i efikasni,

no mogu imati toksičan efekt na organizam (Sarmadi i Ismail, 2010). Prirodni antioksidansi poput vitamina C, polifenola, flavonoida i karotenoida su pokazali jednaku efikasnost, ali pri većim koncentracijama. Veliki naglasak se stavlja i na proteine i peptide iz prirodnih izvora koji su pokazali antioksidacijsku aktivnost. Prema Lu i sur. (2010) proteinski hidrolizati konoplje su pokazali da mogu hvatati slobodne radikale i imaju sposobnost keliranja  $Fe^{2+}$ , što ukazuje na veliki potencijal korištenja enzimske hidrolize za proizvodnju visoko vrijednih proteinskih hidrolizata koji posjeduju antioksidacijski potencijal.

### 2.2.1. Metode određivanja antioksidacijskog stresa

Velika važnost prevencije oksidacijskog stresa i smanjenja njegovih štetnih posljedica na ljudsko zdravlje pomoću antioksidansa iz prehrambenih proizvoda navela je znanstvenike na osmišljavanje metoda kojim bi se odredila učinkovitost supstanci s potencijalnim antioksidacijskim svojstvima. Metode istraživanja uglavnom se temelje na određivanju količine antioksidansa u prehrambenim proizvodima, evaluacije sposobnosti rezistencije na oksidaciju te antioksidacijsku aktivnost koja može biti prisutna nakon digestije. Pristup određivanju je različiti, a mjerenja se mogu temeljiti na odvijanjima kemijskih reakcija, pomoću *in vitro* metode mjerenja ROS-ova i RNS-ova ili pak instrumentalnim analizama.

Prema vrstama kemijskih reakcija koje se odvijaju postoje one koje se temelje na prijenosu vodikovog iona (eng. Hydrogen atom transfer – HAT) te druga skupina koja se temelji na prijenosu elektrona (en. Electron transfer – ET).

Većina testova koja se temelji na prijenosu vodikovih iona koriste kompetitivnu reakciju u kojoj se poznati antioksidans s dokazanim antioksidacijskim kapacitetom i supstrat natječu za termički generiranim peroksilnim radikalom. Metode takvoga tipa su ORAC metoda (eng. Oxygen Radical Absorbency Capacity), TRAP metoda (eng. Radical Trapping Antioxidant Parameter) i test izbjeljivanja  $\beta$ -karotena. Ove metode su gotovo uvijek ključan korak u lančanoj reakciji stvaranja radikala i kao takve se koriste za određivanje direktnog antioksidacijskog kapaciteta supstanci za razbijanjem upravo tih lančanih reakcija.

Testovi temeljeni na prijenosu elektrona svode se na analizu kapaciteta antioksidansa u redukciji oksidanta. Ti testovi se još koriste i za praćenje tijeka reakcije te određivanje njenog kraja. Primjeri takvih testova koji se učestalo koriste za mjerenje antioksidacijske aktivnosti



peptida su TEAC metoda (eng. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), FRAP metoda (eng. Ferric Ion Reducing Antioxidant Power) i 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal hvatajući (scavenging) kapacitet (DPPH). Testovi temeljeni na prijenosu elektrona su relevantniji za dobivanje korisnih informacija o reakcijama i redukcijском kapacitetu molekula.

*In vitro* testovi određivanja ROS-ova i RNS-ova uglavnom se temelje na „scavenging“ testovima superoksida, vodikovog peroksida, singleta kisika te peroksinitrita. Međutim, takvi testovi se koriste samo kao smjernice za buduća *in vivo* istraživanja. Naime, u *in vitro* uvjetima ne može se uzeti u obzir stvarna biodostupnost tvari u živom organizmu, kao ni njegova apsorpcija, niti stvarno djelovanje te se ne mogu smatrati standardiziranim metodama.

Od instrumentalnih metoda se u najvećem broju istraživanja za mjerenje oksidativnog stresa koristi protočna citometrija. U radu Jin i sur. (2013) su pomoću protočnog citometra određivali akumulaciju reaktivnih kisikovih vrsta prilikom ispitivanja protektivnog učinka proteinskih hidrolizata sirutke na inducirani oksidativni stres u PC12 stanicama. Protočna citometrija je tehnologija bazirana na laseru koja se koristi za sortiranje i analizu stanica. Izvedbe su razne, a jedan od primjera je i Muse<sup>®</sup> Cell Analyzer ili analizator staničnog zdravlja koji kvantitativno mjeri stanične populacije koje prolaze kroz oksidativni stres, a bazira se na detekciji ROS-ova.

Za dobivanje što komplementnije slike o antioksidacijskom potencijalu i kapacitetu aktivnih tvari preporuča se korištenje više različitih metoda za određivanje aktivnosti i provođenje istih u različitim oksidacijskim uvjetima (Sarmadi i Ismail, 2010).

### **2.3. Kulture životinjskih stanica**

Pojam kulture životinjskih stanica odnosi se na izolaciju stanica iz specifičnog tkiva (kože, jetre, žlijezda, stanica raka, itd.) pomoću enzimskih, kemijskih ili mehaničkih tehnika te njihovo podizanje u umjetnim i kontroliranim tzv. *in vitro* uvjetima. Razlikuju se tri tipa kulture stanica prema njihovom vijeku, a to su primarne kulture, stanične linije i stanični sojevi.

Primarne kulture nastaju prvom izolacijom stanica iz tkiva i njihovim uzgajanjem u odgovarajućim uvjetima. One imaju ograničeni životni vijek i nakon iskorištavanja svih supstrata i površine za rast, u svrhu preživljavanja, potrebno ih je pasażirati u svježi hranjivi medij. Primarne kulture najbolje opisuju *in vivo* uvjete, pošto zadržavaju najviše karakteristika tkiva iz kojeg su

izolirane. Pasažiranjem ili subkultiviranjem produžuje se vijek primarne kulture i ona postaje stanična linija. Stanična linija se može više puta subkultivirati, međutim posjeduje određenu genetičku nestabilnost i s vremenom gubi značajne karakteristike izvornog tkiva. S obzirom na dugovječnost razlikujemo konačne i kontinuirane stanične linije. Konačne imaju ograničeni životni vijek te mogu preživjeti samo određeni broj subkultivacija, nakon čega umiru. Kontinuirane linije imaju neograničeni životni vijek *in vitro* i broj subkultiviranja, a prema Alves i sur. (2008) mogu nastati spontanitim mutacijama (rijetko) ili stvaranjem hibridnih stanica, transfekcijom viralnim genima, transdukcijom virusima te prekomjernom ekspresijom gena regulatora staničnog ciklusa. Međutim, zbog svoje besmrtnosti, one ujedno poprimaju sve više karakteristika tumorskih stanica. Stanični sojevi pak nastaju iz primarnih linija ili staničnih linija njihovim kloniranjem ili selekcijom.

Danas je u biotehnologiji primjena kultura životinjskih stanica sve zastupljenija i čini neizostavan dio u mnogim istraživanjima. Prednosti njihova korištenja su visoka razina standardizacije, smanjena varijabilnost između eksperimenata, manja količina toksičnog otpada i smanjenje korištenja pokusnih životinja u *in vivo* testovima. Primjena im je vrlo široka, od toksikologije i testiranja različitih supstanci (hormoni, metaboliti, faktori rasta), istraživanja fiziologije ili biokemijskih puteva u stanicama, do proizvodnje umjetnih tkiva. Kultura životinjskih stanica izrazito je važna i u biofarmaceutskoj industriji, gdje čini veliku granu za proizvodnju terapijskih proteina (monoklonska protutijela, peptidi i terapijski rekombinanti proteini) (Dumont i sur., 2015).

Kulturama životinjskih stanica se za rast i preživljavanje moraju osigurati kontrolirani uvjeti što sličniji onima u *in vivo* sustavu organizma iz kojeg potječu. Mogu se uzgajati kao adherentne stanice (gdje je potrebna podloga za prihvaćanje stanica) i kao suspenzijska kultura (stanice slobodno struje u mediju). Uvjeti uspješnog uzgoja variraju za različite tipove staničnih linija, međutim osnovni uvjeti koje zahtijevaju su gotovo uvijek isti. Hranjivi medij za uzgoj mora osiguravati dostatnu količinu osnovnih nutrijenata poput esencijalnih aminokiselina, ugljikohidrata, vitamina i minerala, hormona i faktora rasta. Moraju se zadovoljiti i fizikalno kemijski uvjeti koji podrazumijevaju temperaturu između 35 ° i 37 °C (za stanice sisavaca), pH od 7,2 do 7,5 i osmolalnost od 280 – 320 mOsm kg<sup>-1</sup>, dok atmosfera mora sadržavati 95 % O<sub>2</sub> i 5 % CO<sub>2</sub>. Česti dodatak hranjivom mediju su antibiotici i antimikotici. Cilj njihova dodavanja jest prevencija kontaminacije. Najčešće korišteni antibiotici za suzbijanje rasta bakterija su penicilin,

streptomycin i gentamicin, a za sprječavanje fungalnih kontaminacija nistatin i amfotericin. Vrlo važnu komponentnu čini serum sisavaca (Ryan, 2008). Najučestaliji serum je fetalni teleći serum ili FBS (eng. Fetal Bovine Serum). On osigurava razne komponente poput faktora rasta, hormona, citokina, masnih kiselina i lipida, vitamina, minerala i elemenata u tragovima, faktore prihvaćanja i širenja, ugljikohidrate te neproteinske izvore dušika. Negativne strane korištenja FBS-a je nepotrebna patnja nerođene teladi, varijacije u sastavu koje se mijenjaju u svakoj šarži (potrebna ispitivanja svake) i mogućnost kontaminacije (van der Valk i sur., 2010). Zbog toga se u današnje vrijeme teži razvijanju i korištenju medija bez seruma.

### 2.3.1. Hidrolizati proteina kao sastojci medija bez seruma

Zbog već spomenutih negativnih strana korištenja seruma sisavaca, znanstvena zajednica sve više stavlja naglasak na korištenje medija za uzgoj bez seruma. Također, iako nije propisano nikakvim zakonima ili pravilima, preporučuje se da se laboratoriji drže dobre prakse s kulturama stanica (eng. Good Cell Culture Practice ili GCCP) kao dio dobre laboratorijske prakse (eng. Good Laboratory Practice ili GLP) i dobre proizvođačke prakse (eng. Good Manufacturing Practice ili GMP) što uključuje upravo korištenje medija bez seruma (van der Valk i sur., 2010). Međutim, nije lako postići visoku kvalitetu medija bez seruma, jer zamjenske tvari moraju stanicama osigurati odgovarajuće hormone, vitamine i minerale, a pritom mogu biti prisutne tvari koje mogu imati nepoželjan utjecaj na stanice, mogu produljiti vrijeme prihvaćanja stanica za podlogu, povećava se rizik od proteolitičke razgradnje (zbog nedostatka inhibitora proteaze koji se nalazi u serumu) te mogu smanjiti specifičnu brzinu rasta stanica (Sung i sur., 2004).

Kao vrlo uspješna zamjena proteina seruma pokazali su se proteinski hidrolizati iz različitih izvora. Njihov blagotvorni učinak na kulture stanica je poznat već dva desetljeća, te se općenito smatra da djeluju kao izbalansiran koncentrat smjese nutrijenata koji mogu djelomično ili potpuno zamijeniti serum (Franěk i sur., 2000). U prilog im ide i niska cijena proizvodnje u velikom mjerilu, što odgovara redu veličina proizvodnje terapijskih proteina u biofarmaceutskoj industriji. Vrlo je bitna koncentracija dodanih hidrolizata i njihov izvor, budući da mogu različito djelovati na rast i proliferaciju stanica u mediju bez seruma (Logarušić, 2017). Previsoke koncentracije oligopeptida i aminokiselina prema Chun i sur. (2007) mogu izazvati inhibitorni učinak na rast stanica uslijed narušene ravnoteže hranjivih tvari. Isti autori su u radu pokazali kako hidrolizati

proteina soje imaju pozitivan utjecaj na rast i preživljavanje CHO (eng. Chinese Hamster Ovary) stanične linije. Također je bitno voditi računa i o tipu hidrolize proteina, pošto ona direktno utječe na veličinu i redoslijed aminokiselina u dobivenom peptidu. Prema dosadašnjim istraživanjima može se pretpostaviti da mali peptidi i slobodne aminokiseline pridonose nutritivnoj vrijednosti seruma, dok veliki peptidi mogu djelovati kao signali koji oponašaju faktore rasta i preživljavanja (Franěk i sur., 2000).

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

Proteinski hidrolizati iz uljne pogače konoplje pripremljeni su u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije.

Stanične linije HeLa i MCF-7 nabavljene iz radne banke stanica *American Type Culture Collection* (ATCC).

#### 3.1.1. Kemikalije

- 2, 2'-azobis(2-metilpropionamid)-dihidroklorid (AAPH), Acros Organics, New Jersey, SAD
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetraetilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Sigma, St. Louis, SAD
- FBS (Fetal Bovine Serum), Gibco BRL, SAD
- Fluorescein, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS test), Promega Corporation, Madison, WI, SAD
- Muse<sup>®</sup> kit za određivanje oksidacijskog stresa, EMD Millipore Co., MA, SAD,
- Muse<sup>®</sup> System check Kit, EMD Millipore Co., MA, SAD
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Tripan-plavo, Sigma, St. Louis, SAD
- Tripsin-EDTA, Sigma, St. Louis, SAD
- Vodikov peroksid (30 %), Gram-mol, Zagreb, RH

### 3.1.2. Otopine i puferi

- PBS PUFER (pH=7,4)

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,4381 g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,2372 g
Destilirana voda	do 1000 mL

- ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ORAC METODOM

Fosfatni pufer (0,2 M, pH=7)

Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (6,242 g do 200 mL destilirane vode)	39 mL
Dinatrijev hidrogenfosfat (5,687 g do 200 mL destilirane vode )	61 mL
Destilirana voda	do 200 mL

Otopina fluoresceina

Ishodna otopina 1: otopiti 15 mg fluoresceina u 100 mL fosfatnog pufera (0,075 M)

Ishodna otopina 2: 100 µL ishodne otopine 1 nadopuniti sa 10 mL fosfatnog pufera (0,075 M)

Ishodna otopina 3: 50 µL ishodne otopine 2 nadopuniti sa 50 mL fosfatnog pufera (0,075 M)

Otopina AAPH

AAPH	0,207 g
Fosfatni pufer (0,075 M)	do 5 mL

▪ ODREĐIVANJE OKSIDACIJSKOG STRESA POMOĆU MUSE ANALIZATORA  
STANICA

Kontrolni test

System check diluent 380 µL

Kuglice 20 µL

Radna otopina

Srednje razrjeđenje: 1 µL Muse oksidativni stresni reagens u 99 µL 1X pufera za analizu

Radna otopina (za 10 testova): 23,5 µL srednjeg razrjeđenja u 1876,25 µL 1X pufera za analizu

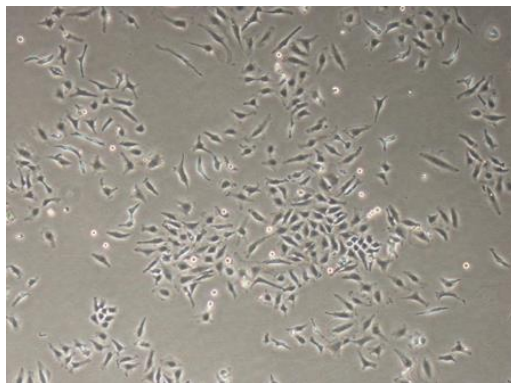
3.1.3. Uređaji i oprema

- Cary Eclipse Fluorescence Spectrofotometar, Varian, Mulgrave, Australija
- Čitač ploča, TECAN, Mannedorf, Švicarska
- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Hladnjak (-80 °C), TT 80 FRYKA, Njemačka
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO<sub>2</sub>, Iskra PIO, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Komora za sterilni rad (*laminar flow cabinet*), Kambič, Slovenija
- Laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, kivete, epruvete )
- Laboratorijska vaga, Boeco, Njemačka
- MUSE<sup>®</sup> analizator staničnog zdravlja (Cell Analyser), EMD Millipore Co., MA, SAD

- Neubaerova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright - Line, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, Thermo Scientific BioLite, SAD
- Ploče s jažicama, Corning, SAD
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- T - boce od 25 cm<sup>2</sup> i 50 cm<sup>2</sup>, Corning, SAD
- UV spektrofotometar, Cary 3, Varian, Madison, SAD
- Vodena kupelj, Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK

#### 3.1.4. Stanična linija HeLa

Stanična linija HeLa (slika 3) prva je uspješno kultivirana humana stanična linija. Dobivena je 1951. godine biopsijom tkiva pacijentice Henriette Lacks (po kojoj i dobiva ime), kojoj je bio dijagnosticiran rak vrata maternice. Doktor George O. Grey je bez pristanka pacijentice proizveo staničnu liniju u laboratoriju Johns Hopkins (Baltimore, Maryland). Od tada je korištena u mnogim istraživanjima budući da je njeno umnažanje relativno brzo, jeftino i jednostavno. Također posjeduje osnovne značajke netumorskih stanica sa sposobnošću eksprimiranja i reguliranja gena, proizvodnje proteina te osjetljivosti na infekcije. Danas se pak javlja problem vezan uz ovu uspješnu staničnu liniju, jer se pretpostavlja da HeLa stanice prerastaju i kontaminiraju ostale stanične linije, kao na primjer kulture iz tkiva raka dojke koje su dokazane da su zapravo HeLa stanice (Lucey i sur., 2009).

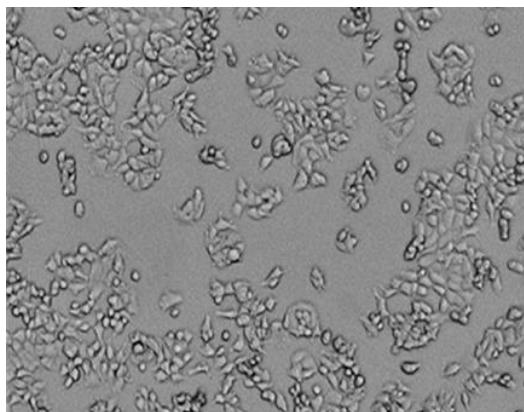


**Slika 3.** HeLa stanice (Anonymous 1, 2015)



### 3.1.5. Stanična linija MCF-7

MCF-7 (slika 4) je stanična linija porijeklom iz ljudskog raka dojke te se najviše koristi u istraživanjima vezanim uz biologiju raka dojke te hormonskih mehanizama. Linija potječe iz *Michigan Cancer Foundation-7* (ujedno i podrijetlo imena), uspostavljene 1973. godine iz maligne pleuralne tekućine pacijentice s metastaznom bolešću (Brkan, 2016). Pacijentica je bila liječena zračenjem i hormonskom terapijom. Ono što čini ovu staničnu liniju vrlo zanimljivom jest ekspresija receptora i bioloških odgovora na razne hormone poput estrogena, androgena, glukokortikoida, inzulina, prolaktina, epidermalnog faktora rasta i tiroidnih hormona (Osborne i sur., 1987).



**Slika 4.** MCF – 7 stanice (Anonymous 2, 2018)

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Određivanje antioksidacijskog potencijala hidrolizata proteina konoplje ORAC metodom

ORAC metoda spada u metode koje se temelje na prijenosu vodika, također nazvane i HAT metode. Princip se temelji na inhibiciji peroksil radikala ( $\text{ROO}\cdot$ ), čiji je izvor substrat AAPH. Peroksil radikal djeluje tako da oksidira fluorescein, a rezultat reakcije je nastajanje produkta koji gubi fluorescenciju. Gubitak fluorescencije se očitava u smanjenju intenziteta fluorescencije koja se mjeri spektrofotometrijski. Dodatkom antioksidansa inhibira se djelovanje radikala i oksidacijska degradacija fluoresceina što uzrokuje sporiji pad fluorescencije (Cao i sur., 1993).

- Mjerenje ORAC vrijednosti

Mjerenje se vrši spektrofotometrijski pri temperaturi od 37 °C ( $\lambda_{eks}= 485 \text{ nm}$  i  $\lambda_{em}=520 \text{ nm}$ ). Uzorci koji su se koristili su proteinski hidrolizati konoplje dobiveni enzimima alkalazom, neutrazom i protamexom koji su prije mjerenja antioksidacijskog kapaciteta razrijeđeni (alkalaza – 500x, neutraza 450x i protamex 150x), isto kao i frakcionirani proteinski hidrolizati dobiveni enzimom alkalazom u veličinama >10 kDa, 3-10 kDa te frakcije <3 kDa (>10 kDa – 700x, 3-10 kDa – 700 x i <3 kDa – 500x). U kivete za mjerenje dodaje se 2250  $\mu\text{L}$  fluoresceina i 375  $\mu\text{L}$  uzorka kojem se prati antioksidacijska aktivnost. Otopine se potom termostatiraju u vodenoj kupelji na 37 °C kroz period od 30 minuta. Otopina se zatim pretoči u kivetu i stavlja u uređaj za mjerenje te se direktno dodaje 375  $\mu\text{L}$  AAPH i svake minute se mjeri promjena intenziteta fluorescencije spektrofotometrijski. Po istom principu se određuje ORAC vrijednost standarda, odnosno otopine Troloxa (25 do 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  dobiveno iz ishodne otopine 500  $\mu\text{M L}^{-1}$ ) koja se dodaje umjesto 375  $\mu\text{L}$  uzorka. Potom se provede metoda i za slijepu probu, za koju se dodaje 375  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera (0,075  $\text{mol L}^{-1}$ ) umjesto uzorka.

- Izračun ORAC vrijednosti

Računanje ORAC vrijednosti vrši se prema formulama:

$$\text{Relativna ORAC vrijednost} = \left( \frac{AUC_u - AUC_{sp}}{AUC_{trx} - AUC_{sp}} \right) \times k \times \alpha \times h \text{ [}\mu\text{mol Trolox ekvivalent g}^{-1}\text{ uzorka]} \quad [1]$$

$$AUC = 0,5 + (R_2/R_1) + (R_3/R_1) + \dots + (R_n/R_1) \quad [2]$$

Pri čemu je:

- $AUC_u$  = antioksidacijski kapacitet uzorka
- $AUC_{sp}$  = antioksidacijski kapacitet slijepa probe
- $AUC_{trx}$  = antioksidacijski kapacitet Troloxa
- $k$  = faktor razrijeđenja
- $\alpha$  = molarna koncentracija Troloxa
- $h = \frac{\text{Vekstrakta}}{\text{g uzorka}}$  [3]

### 3.2.2. Uzgoj HeLa i MCF-7 stanica u T-bocama

HeLa i MCF-7 stanice čuvaju se u ampulama od 1 mL (koncentracija stanica  $1 \times 10^7$  stanica  $\text{mL}^{-1}$ ) zamrznute na  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  u mediju za zamrzavanje. Prvo korak uzgoja jest njihovo odmrzavanje koje se vrši stavljanjem ampula u vodenu kupelj zagrijanu na  $37\text{ }^\circ\text{C}$  do otapanja. Sadržaj ampule se prenosi u sterilnu kivetu i dodaje se 5-10 mL medija za uzgoj. Stanice se odvajaju centrifugiranjem tijekom 5 minuta na  $1000\text{ okretaja min}^{-1}$ . Supernatant se potom uklanja, a talog stanica se resuspendira u mediju za uzgoj koji sadrži 5 % (v/v) FBS. Prilikom daljnjeg rada sa stanicama vrlo je važno održavati aseptične uvjete rada kako ne bi došlo do nepotrebnih kontaminacija. Stanice se zatim prebacuju u T-bocu i stavljaju u inkubator u kojem vladaju optimalni uvjeti za rast stanica (temperatura  $37\text{ }^\circ\text{C}$  i atmosfera od 95 % zraka i 5 %  $\text{CO}_2$ ). Tijekom uzgoja potrebno je svakodnevno pratiti brojnost stanica, njihovu morfologiju, prihvaćanje za površinu i opće stanje, što se vrši inverznim mikroskopom. Također je bitno pratiti boju medija, budući da njena nagla promjena ukazuje na pojavu kontaminacija. Kada stanice potroše sav medij (također vidljivo po boji, odnosno njenom blijeđenju) nužno ga je nadomjestiti novim, da bi se stanicama osiguralo sve potrebno za rast i kako bi se uklonili potencijalno štetni proizvodi metabolizma koji mogu negativno utjecati na njihov rast i promjenu pH medija.

### 3.2.3. Učinak dodatka hidrolizata proteina konoplje na rast HeLa i MCF-7 stanica kolorimetrijskom MTS metodom

MTS test (CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) baziran je na MTT metodi prvi puta opisanoj 1983. godine (Mosmann i sur., 1983). Metoda je služila kao brza kolorimetrijska metoda za praćenje citotoksičnosti i proliferacije stanica. MTS jest također kolorimetrijska metoda koja služi za praćenje proliferacije stanica u ovisnosti o faktorima rasta, citokinima, mitogenima i nutrijentima i za analizu citotoksičnih i citostatičkih spojeva te još služi i za određivanje protutijela koja djeluju inhibitorno na rast stanica. Metoda koristi tetrazolijevu sol MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) koja predstavlja supstrat za djelovanje mitohondrijske dehidrogenaze u živim stanicama, dajući ljubičasto obojeni produkt formazan. Za razliku od MTT metode, nastali formazan je topljiv u mediju za rast stanica, pa nije potreban dodatan korak otapanja u organskim otapalima. Intenzitet dobivenog obojenja mjeri se spektrofotometrijski i izravno je proporcionalan broju živih stanica.

HeLa i MCF-7 stanične linije nacijepile su se na ploču s 96 jažica u koncentracijama od  $1 \times 10^4$  st  $\text{mL}^{-1}$  (HeLa) i  $2 \times 10^4$  st  $\text{mL}^{-1}$  (MCF-7) zbog različite specifične brzine rasta. U svaku jažicu nacijepjeno je 100  $\mu\text{L}$  suspenzije stanica koje su se inkubirale 24 sata do prihvaćanja za podlogu. Stanice su potom tretirane s 10  $\mu\text{L}$  proteinskih hidrolizata konoplje dobivenih hidrolizom s enzimima alkalaza, neutraza i protamex u rasponu koncentracija 1, 2, 5 i 10  $\text{mg mL}^{-1}$  u 4 paralelna uzorka kroz 72 sata. Nakon tretmana, u svaku jažicu je dodano 10  $\mu\text{L}$  MTS otopine, nakon čega su stanice inkubirane kroz 4 sata, a intenzitet nastalog obojenja očitao je pri 490 nm na čitaču ploča. Postotak preživljenja stanica izražen je kao postotak tretiranih stanica u odnosu na kontrolne, netretirane stanice. Isti postupak je ponovljen i za tretiranje staničnih linija s frakcijama proteinskih hidrolizata konoplje dobivenih alkalazom u rasponu frakcija  $>10$  kDa, 3-10 kDa i  $<3$  kDa u koncentracijama 1, 2, 3 i 5  $\text{mg mL}^{-1}$ .

#### 3.2.4. Određivanje oksidacijskog stresa u HeLa stanicama pomoću analizatora staničnog zdravlja Muse<sup>®</sup>

Oksidacijski stres u HeLa stanicama određen je pomoću Muse<sup>®</sup> Oxidative Stress Kit-a koji kvantitativno mjeri oksidacijski stres u stanicama detekcijom unutarstaničnih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Uređaj također omogućuje istovremeno određivanje broja i postotka stanica koje su u oksidativnom stresu. Reagens (koji je permeabilan) sadrži dihidroetidij (DHE) koji se koristi za detekciju ROS-ova u populacijama stanica. Supstrat DHE reagira sa superoksidnim anionima, nakon čega se odvija njegova oksidacija do etidij bromida, DNA-veznog fluorofora ili nekog sličnog strukturnog produkta. Ti produkti interkaliraju s DNA i stvaraju crvenu fluorescenciju. Kao rezultat se mogu detektirati dvije populacije stanica: ROS (-) ili žive stanice i ROS (+) ili stanice u oksidativnom stresu.

Prije početka mjerenja provodi se čišćenje i provjera sustava prema specifikacijama proizvođača pomoću Muse<sup>®</sup> System Check Kit-a. HeLa stanice nacijepuju se na dvije ploče s 12 jažica u koncentraciji od  $1 \times 10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$  te se nakon prihvaćanja za podlogu (nakon 24 sata) radio predtretman s proteinskim hidrolizatom dobivenim pomoću enzima protamex u koncentraciji od 5  $\text{mg mL}^{-1}$  i njegovom frakcijom veličine  $<3$  kDa u istoj koncentraciji kroz 18 sati. Jedna ploča se ne tretira vodikovim peroksidom, već se prati protektivan učinak hidrolizata i frakcije u normalnim

nestresnim uvjetim. Kako bi se utvrdio protektivni učinak hidrolizata i frakcija u stresnim uvjetima kod stanica na drugoj ploči se nakon predtretmana inducira oksidativan stres dodatkom 150  $\mu\text{M}$  vodikova peroksida kroz 6 sati. Pokus je postavljen tako da na svakoj ploči imaju po dvije paralele kontrolnih stanica (bez dodatka hidrolizata ili frakcija) te na ploči s induciranim stresom kontrolne stanice tretirane s 150  $\mu\text{M}$  vodikovog peroksida (također bez dodatka hidrolizata ili frakcija). Svi uzorci stanica za analizu pripremaju se tako da koncentracija stanica bude  $5 \times 10^6$  st  $\text{mL}^{-1}$  u 1X puferu. Zatim se priprema Muse<sup>®</sup> oksidativni stresni reagens do radne otopine. Prvo se zajedno s 1X puferom zagrijava na sobnu temperaturu (pošto se stresni reagens čuva zamrznut na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ), a svako rukovanje se radi u rukavicama i u tami, budući da fluorescentna boja u reagensu može biti mutagena i / ili kancerogena te je osjetljiva na svjetlost. U kivete koje se stavljaju u uređaj dodaje se 10  $\mu\text{L}$  suspenzije stanica i 190  $\mu\text{L}$  radne otopine reagensa Muse<sup>®</sup> oksidativni stres. Sadržaj se resuspendira vorteksiranjem i inkubira 30 minuta na  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon toga uzorak je spreman za analizu na analizatoru stanica Muse<sup>®</sup> koji automatski obradi sve podatke.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa L.*) je biljka koja ima značajnu primjenu u industriji. Iako je još od davnina u starom svijetu korištena za prehranu i kao tradicionalan lijek za mnoge bolesti (Callaway, 2004), tek se početkom 20. stoljeća počinje upotrebljavati u industriji papira i odjeće, kao hrana za ptice, a i dalje se koristi kao tradicionalan lijek u istočnjačkim zemljama. Međutim, osim industrijske primjene konoplja ima vrlo visoku nutritivnu vrijednost zbog sadržaja esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina u omjerima najprikladnijima za ljudsko zdravlje. Upravo su proteini konoplje, koji se najčešće dobivaju iz uljnih pogača (nusproizvoda proizvodnje ulja), postali važni za istraživanje bioaktivnih tvari. Proteini se hidrolizom cijepaju na manje peptide, koji su u nemalom broju slučajeva biološki aktivni, budući da se tijekom hidrolize oslobađaju antihipertenzijski (ACE inhibitori), antioksidacijski, imunomodulatorni, antimikrobni i osteoprotektivni peptidi (Karamać i sur., 2014). Vrsta enzima i trajanje postupka hidrolize, kao i sastav i redoslijed aminokiselina u dobivenom peptidu utječu na njegovu biološku aktivnost (Wang i sur., 2009).

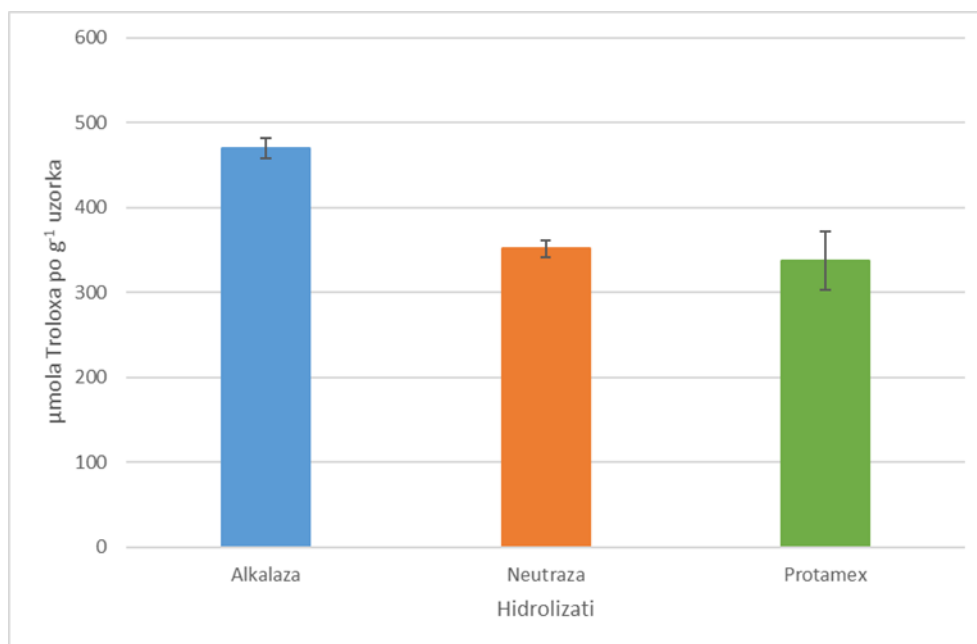
Biološki aktivni peptidi iz prirodnih izvora (poput uljarica i konoplje) našli su primjenu kao funkcionalna hrana ili u pripravcima koji sprječavaju mnoga oboljenja. Sukladno trendovima modernoga života i zahtjevima za što prirodnijim tvarima u prehrani, ovi se peptidi naveliko istražuju. Među najzanimljivijim svojstvima koja posjeduju je i antioksidacijsko djelovanje, koje pomaže u obrani organizma od oksidacijskog stresa koji uzrokuje brojna oboljenja, a nastaje prekomjernim nakupljanjem reaktivnih kisikovih vrsta. Inkorporiranjem biološki aktivnih peptida u prehranu ili u obliku različitih pripravaka, može se utjecati na očuvanje ljudskog zdravlja i otpornost prema velikom broju bolesti modernog doba poput visokog tlaka, ateroskleroze ili čak raka.

Za određivanje biološke aktivnosti i antioksidacijskog potencijala proteinskih hidrolizata uljnih pogača konoplje mogu se koristiti različite metode, od metoda temeljenih na kemijskim reakcijama, instrumentalnih metoda do *in vitro* testova na staničnim linijama. Cilj ovoga rada, s obzirom na dosadašnja znanstvena saznanja o proteinskim hidrolizatima konoplje i njihovom antioksidacijskom potencijalu, bio je odrediti antioksidacijski kapacitet, antiproliferacijski učinak na dvjema tumorskim staničnim linijama (HeLa i MCF-7) te eventualni protektivni učinak na oksidacijski stres izazvan vodikovim peroksidom na HeLa staničnoj liniji. Kako je dokazano da

aktivnost proteinskih hidrolizata konoplje korelira s načinom hidrolize te veličinom i količinom hidrofobnih aminokiselina (Wang i sur., 2009) u ovome radu je ispitan učinak hidrolizata proteina konoplje pripremljenih primjenom tri različita enzima kao i utjecaj veličine peptida dobivenih frakcioniranjem na antiproliferacijsku i antioksidacijsku aktivnost.

#### 4.1. Antioksidacijski potencijal hidrolizata proteina iz pogače konoplje

Antioksidacijski potencijal hidrolizata proteina iz pogače konoplje određen je mjerenjem ORAC vrijednosti. Metodom se prati pad fluorescencije fluoresceina izazvanim njegovom oksidacijom s peroksid radikalom (nastalim iz AAPH), a dodavanjem antioksidansa, koji inhibira djelovanje radikala, usporeva se smanjenje fluorescencije. Dakle dokaz antioksidacijske aktivnosti bi trebala biti što veća relativna ORAC vrijednost ispitivane tvari. Za ispitivanje su pripremljeni proteinski hidrolizati konoplje dobiveni pomoću tri različita enzima: alkalaza, neutraza i protamex, te se provela ORAC metoda (slika 4).

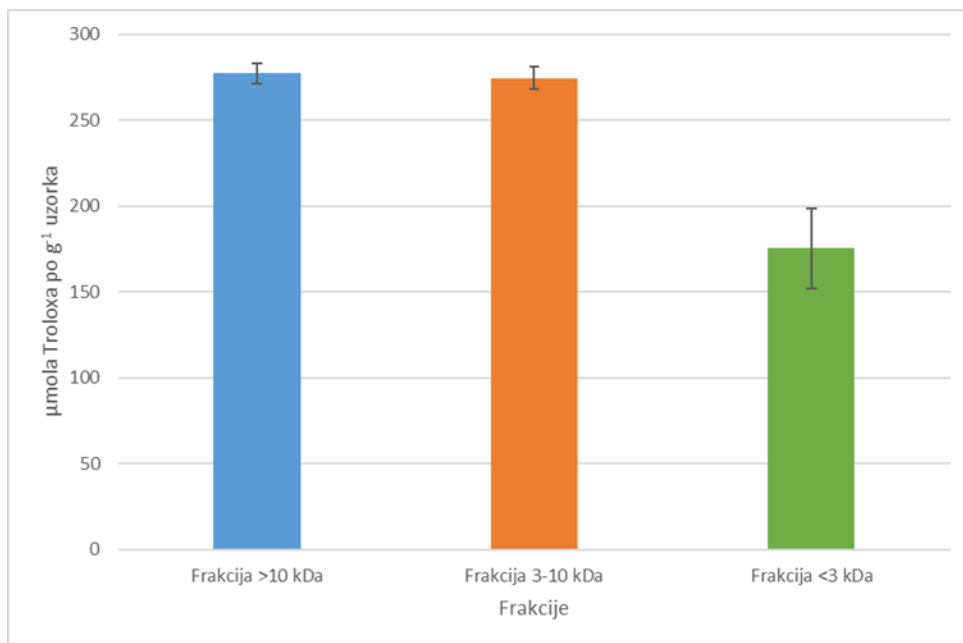


**Slika 4.** Relativna ORAC vrijednost proteinskih hidrolizata iz pogače konoplje dobivenih primjenom različitih proteolitičkih enzima

Prema rezultatima prikazanim na slici 4, vidljivo je da najveću relativnu ORAC vrijednost ima proteinski hidrolizat pripremljen enzimom alkalazom, te ona iznosi 469,64  $\mu\text{mol Troloxa g}^{-1}$  uzorka. Zatim slijedi hidrolizat dobiven enzimom neutrazom čija je relativna ORAC vrijednost 351,42  $\mu\text{mol Troloxa g}^{-1}$  uzorka te hidrolizat dobivenim enzimom protamexom čija relativna ORAC vrijednost iznosi 337,04  $\mu\text{mol Troloxa g}^{-1}$  uzorka. Različite ORAC vrijednosti hidrolizata proteina konoplje dobivenih različitim enzimima su rezultat specifičnog djelovanja svakog pojedinog enzima, budući da svaki specifično cijepa protein što rezultira različitim aminokiselinskim sastavom dobivenih peptida. U literaturi je opisano da aminokiselinski sastav znatno utječe na antioksidacijsku aktivnost, čemu najviše doprinose hidrofobni peptidi kao što je prikazano u radu Wang i sur. (2009). Iako u ovome diplomskom radu nije određen aminokiselinski sastav svakog pripremljenog hidrolizata, prema rezultatima Tang i sur. (2009), koji su ispitivali hidrofobnost proteinskih hidrolizata konoplje dobivenih enzimima alkalazom, neutrazom i protamexom, primijećeno je da hidrolizat pripremljen enzimom alkalazom ima najveću hidrofobnost, nakon čega je slijedio hidrolizat pripremljen protamexom pa neutrazom. Stoga su rezultati dobiveni u ovom diplomskom radu u korelaciji s prethodno objavljenim rezultatima i prate isti trend.

U svrhu ispitivanja kako veličina hidrolizata proteina utječe na antioksidacijski potencijal, pripremljene su frakcije hidrolizata s najvećom antioksidacijskom aktivnošću, odnosno frakcije hidrolizata dobivene pomoću enzima alkalaze. Frakcije su pripremljene pomoću *Amicon Pro Affinity Concentration* kiveta s različitim veličinama pora, te su dobivene frakcije >10 kDa, frakcije 3-10 kDa i frakcije <3 kDa, kojima je također određena ORAC vrijednost (slika 5).





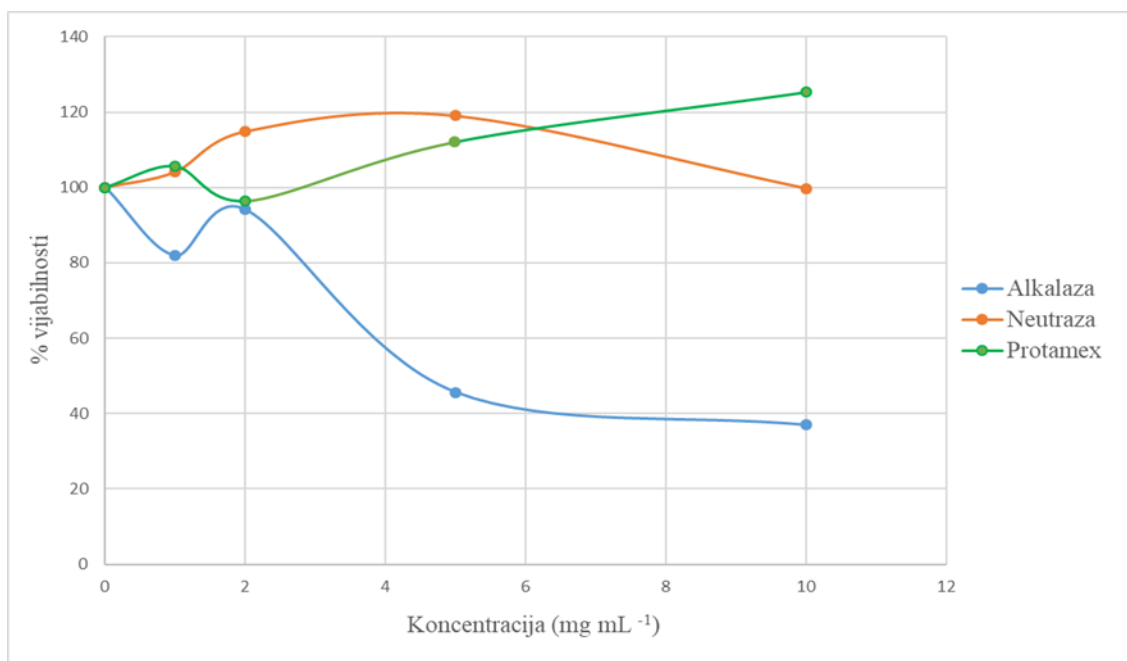
**Slika 5.** Relativna ORAC vrijednost frakcija proteinskih hidrolizata iz pogače konoplje dobivenih enzimom alkalazom

Na slici 5 vidljivo je kako različite frakcije proteinskih hidrolizata dobivenih alkalazom posjeduju različit antioksidacijski potencijal. Prema dobivenim rezultatima najveći potencijal i relativnu ORAC vrijednost imaju frakcije >10 kDa koja iznosi 277,09 µmol Troloxa g<sup>-1</sup> uzorka i frakcija 3-10 kDa s relativnom ORAC vrijednosti od 274,37 µmol Troloxa g<sup>-1</sup> uzorka, a najmanju ORAC vrijednost frakcija <3 kDa (175,29 µmol Troloxa g<sup>-1</sup> uzorka). Dobiveni rezultati djelomično su u korelaciji s rezultatima koji su objavili Girgih i sur. (2011) gdje je utvrđeno da frakcije hidrolizata konoplje posjeduju veću antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom, ali i niži kapacitet određen metodom keliranja metala u odnosu na početni, nefrakcionirani hidrolizat. Tako su frakcije većih dužina lanaca (3-5 i 5-10 kDa) pokazale bolja antioksidacijska svojstva određena metodom keliranja metala u odnosu na frakcije veličine 1-3 kDa i <1 kDa, a što je opet u korelaciji s našim dobivenim rezultatima. Slične rezultate su objavili Marambe i sur. (2008) s hidrolizatima proteina sjemenki lana, kada su također utvrdili da niži stupanj hidrolize proteina odnosno duži peptidni lanci posjeduju veću antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s kraćim peptidnim lancima. Sve ovo ukazuje kako antioksidacijski potencijal hidrolizata i njihovih frakcija ovisi o odabranoj metodi određivanja tog potencijala, odnosno ukazuju na potencijal

primjene hidrolizata i njihovih frakcija određene molekulske mase za tretman poremećaja izazvanih oksidativnim stresom.

#### 4.2. Učinci hidrolizata proteina iz pogače konoplje na proliferaciju HeLa i MCF-7 stanica

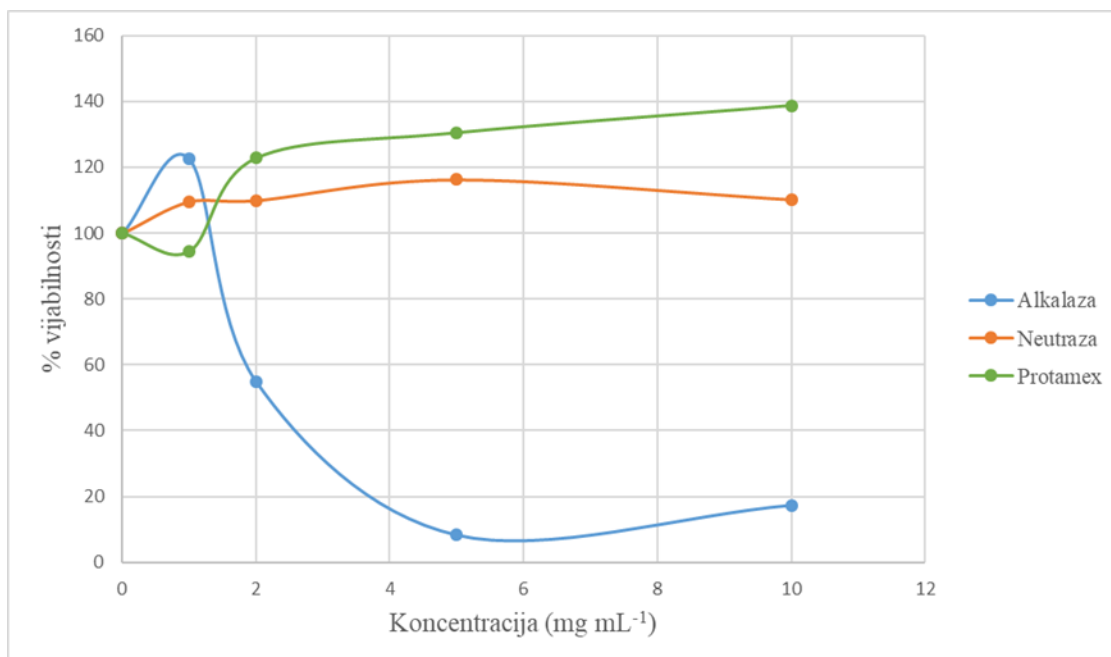
Učinci hidrolizata proteina konoplje dobivenim pomoću tri različita enzima (alkalaza, neutraza i protamex) ispitivali su se na dvjema tumorskim staničnim linijama HeLa i MCF-7 pomoću MTS metode. Stanice su se uzgajale u T-bocama, potom su se nacijepile na ploče s 96 jažica te su nakon 24 sata obje stanične linije tretirane različitim koncentracijama hidrolizata kroz 72 sata. Ispitane su koncentracije hidrolizata od 1, 2, 5 i 10 mg mL<sup>-1</sup> (Slika 6 i 7).



**Slika 6.** Utjecaj hidrolizata proteina iz pogače konoplje na proliferaciju HeLa stanična linije

Prema rezultatima prikazanim na slici 6 proteinski hidrolizat dobiven enzimom alkalazom pokazuje inhibitorni učinak na proliferaciju HeLa stanične linije pri čemu je kod koncentracije hidrolizata od 10 mg mL<sup>-1</sup> vijabilnosti stanica iznosila 36,94 %. Također, vidljiv je odnos doza-učinak odnosno s povećanjem koncentracije hidrolizata povećava se i njegov antiproliferacijski

učinak na HeLa stanice. Proteinski hidrolizat pripravljen enzimom neutrazom ne pokazuje antiproliferacijski učinak, štoviše pri koncentracijama od 1, 2 i 5 mg mL<sup>-1</sup> pozitivno djeluje na rast kada je postotak vijabilnosti stanica iznosio 104,11 %, 114,87 % i 119,03 %, pojedinačno. Hidrolizat pripravljen enzimom protamexom također pokazuje pozitivan utjecaj na proliferaciju stanica, a zanimljivo je da je pri koncentraciji hidrolizata od 10 mg mL<sup>-1</sup> vijabilnost iznosila 125,36 %.



**Slika 7.** Utjecaj hidrolizata proteina iz pogače konoplje na proliferaciju MCF-7 stanične linije

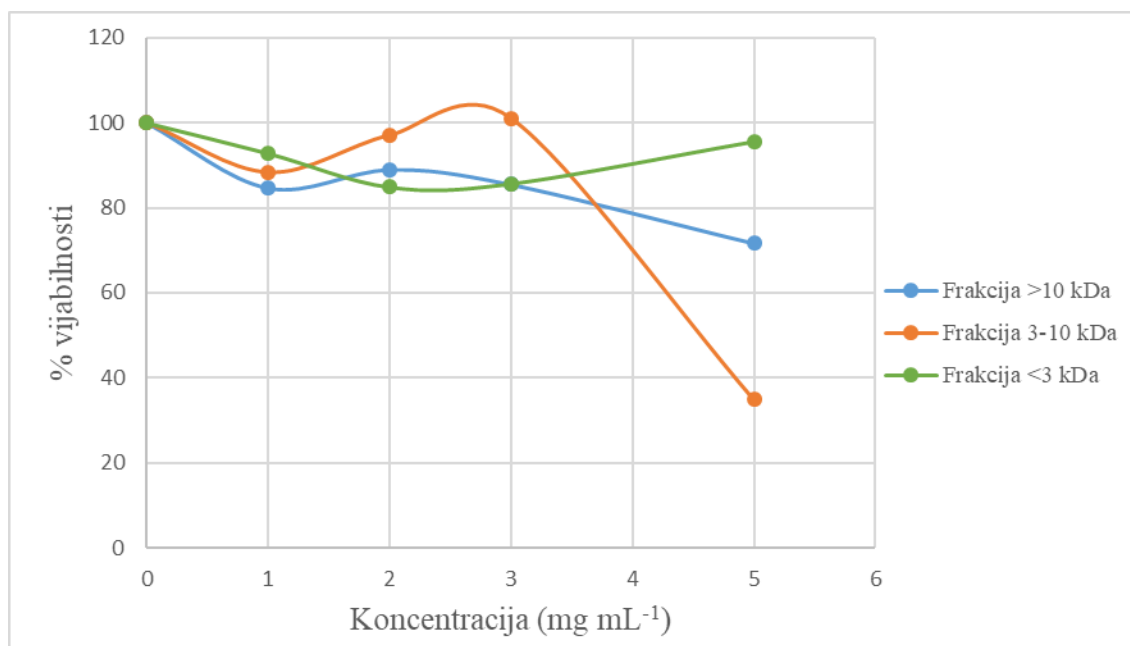
Kod MCF-7 stanične linije hidrolizat pripravljen enzimom alkalazom pokazuje najveći antiproliferacijski učinak, te pri koncentraciji od 5 mg mL<sup>-1</sup> vijabilnosti iznosi 8,26 %, dok kod 10 mg mL<sup>-1</sup> iznosi 17,38 %. Hidrolizat pripravljen enzimom neutrazom praktički nema utjecaj na proliferaciju stanica i pri ispitanim koncentracijama vijabilnosti stanica iznosi 110-116 %. Hidrolizat pripravljen protamexom pokazao je blagi proliferacijski učinak na rast MCF-7 stanica gdje je vijabilnost rasla do 138,65 %, osim pri koncentraciji od 2 mg mL<sup>-1</sup> kada je vijabilnost neznatno pala na 94,53 %.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da proteinski hidrolizati konoplje pripravljeni enzimom alkalazom pokazuju antiproliferacijski učinak na obje stanične linije pri gotovo svim

ispitanim koncentracijama, pri čemu je MCF-7 stanična linija pokazala veću osjetljivost na djelovanje hidrolizata (vijabilnost 17,37 %) u odnosu na HeLa staničnu liniju (vijabilnost 36,94 %) pri koncentraciji od 10 mg mL<sup>-1</sup>. Prema istraživanju Kannan i sur. (2009) također su dobiveni rezultati koji ukazuju na antiproliferacijski učinak proteinskih hidrolizata rižinih mekinja na stanice raka dojke.

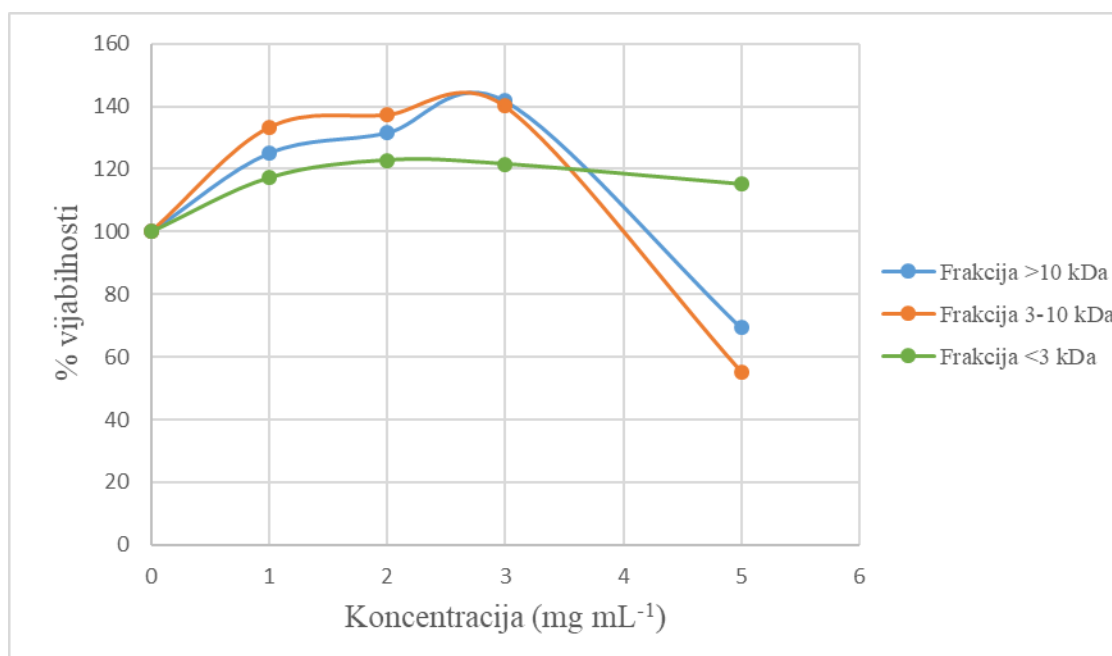
#### 4.3. Učinci frakcija hidrolizata proteina iz pogače konoplje pripravljenih enzimom alkalazom na proliferaciju HeLa i MCF-7 stanica

Određivanje učinaka frakcija hidrolizata proteina pripravljenog enzimom alkalazom na proliferaciju HeLa (slika 8) i MCF-7 (slika 9) stanica provedeno je MTS metodom na isti način kako je opisano u poglavlju 4.2., kao i priprema stanica za tretiranje. Obje stanične linije su tretirane 72 sata s različitim koncentracijama (1, 2, 3 i 5 mg mL<sup>-1</sup>) frakcija hidrolizata različitih molekulskih masa (>10 kDa, 3-10 kDa i <3 kDa).



**Slika 8.** Utjecaj frakcija hidrolizata proteina iz pogače konoplje dobivenih alkalazom na proliferaciju HeLa stanične linije

Rezultati učinka frakcija proteinskih hidrolizata na HeLa staničnu liniju pokazuju da frakcija >10 kDa pokazuje inhibicijski učinak na proliferaciju stanica pri svim ispitivanim koncentracijama, a vijabilnost stanica je bila u rasponu 89 % - 72 %. Najveću antiproliferacijsku aktivnost pokazuje frakcija veličine 3-10 kDa, kada je pri koncentraciji od 5 mg mL<sup>-1</sup> vijabilnost iznosila 34,89 %. Frakcija <3 kDa ne pokazuje značajniji učinak na proliferaciju HeLa stanica, a vijabilnost se kreće u rasponu 85 % - 96 %.



**Slika 9.** Utjecaj frakcija hidrolizata proteina iz pogače konoplje dobivenih alkalazom na proliferaciju MCF-7 stanične linije

Prema dobivenim rezultatima sve tri frakcije hidrolizata u početnim koncentracijama od 1, 2 i 3 mg mL<sup>-1</sup> pokazuju stimulacijski učinak na proliferaciju stanične linije MCF-7. Tek pri koncentraciji od 5 mg mL<sup>-1</sup> frakcija >10 kDa pokazuje antiproliferacijsku aktivnost pri čemu vijabilnost stanica iznosi 69,35 %, dok kod iste koncentracije frakcije 3-10 kDa vijabilnost stanica iznosi 55,35 %. Ista koncentracija frakcije <3 kDa nije utjecala na vijabilnost stanica. Usporedbom antiproliferacijskog učinka frakcije 3-10 kDa pri koncentraciji od 5 mg mL<sup>-1</sup> veći učinak je na

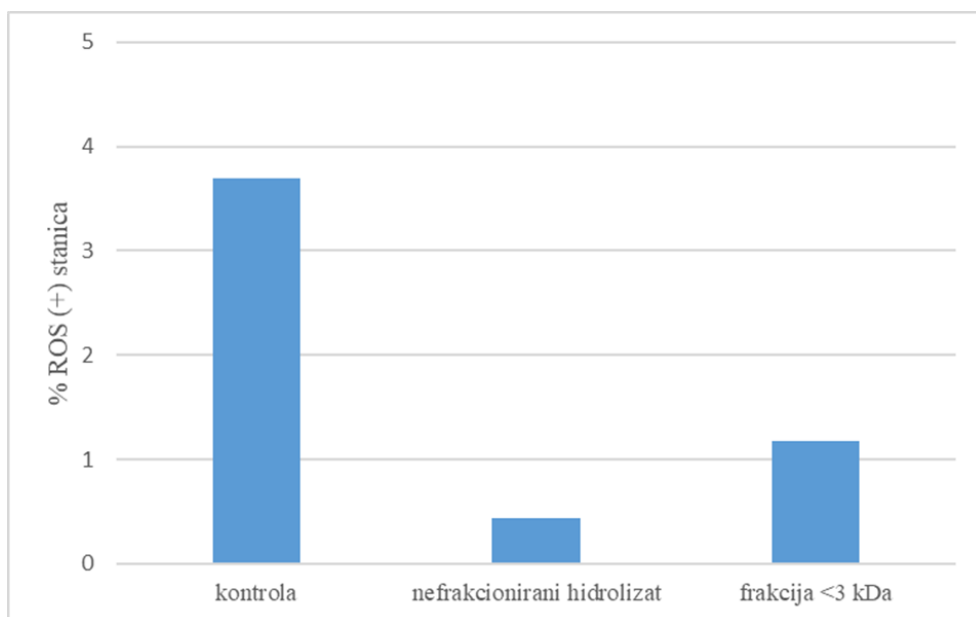
HeLa staničnu liniju gdje je postotak vijabilnosti 34,89 %, dok je kod MCF-7 vijabilnost iznosila 55 %.

Dobiveni rezultati na obje stanične linije su u korelaciji s rezultatima koje su objavili Kannan i sur. (2008). Gdje je ispitivan učinak frakcija hidrolizata iz rižinih mekinja na inhibiciju proliferacije Caco-2 i HepG2 staničnih linija. Njihovi rezultati pokazuju da frakcije <5 kDa posjeduju najveću citotoksičnost (>80 %), frakcije 5-10 kDa pokazuju citotoksičnost od 70 %, dok su frakcije >10 kDa pokazale citotoksičnost od oko 30 %. Slaba antiproliferacijska aktivnost frakcija >10 kDa pripisuje se dužini peptidnog lanca i dužem vremenu potrebnom za odmatanje proteinskog lanca. Usporedbom učinaka nefrakcioniranog proteinskog hidrolizata dobivenog pomoću alkalaze u koncentraciji od 5 mg mL<sup>-1</sup> i frakcija 3-10 kDa u koncentraciji od 5 mg mL<sup>-1</sup>, vidljivo je da na staničnu liniju HeLa imaju vrlo sličan antiproliferacijski učinak (vijabilnost 45,64 % i 34,89 %). Istovremeno stanična linija MCF-7 je bila osjetljivija na nefrakcionirani proteinski hidrolizat dobivene alkalazom (vijabilnost 8,28 %) u usporedbi na učinak frakcija 3-10 kDa (vijabilnosti 55,34 %).

#### **4.4. Učinci hidrolizata proteina iz pogače konoplje na inducirani oksidacijski stres u HeLa stanicama**

Antioksidacijska aktivnost spojeva određuje se različitim kemijskim metodama kako je opisano u poglavlju 2.2. Međutim, apsorpcija tih spojeva u stanicama i eventualan učinak u fiziološkim uvjetima također se trebaju razmotriti kako bi se predvidio mogući *in vivo* učinak (Shahidi i Zhong, 2015). Modeli s kulturama stanica pogodan su alat za određivanje antioksidacijskog utjecaja s obzirom na dostupnost velikog broja staničnih linija, troškove analize, a osobito jer mogu poslužiti za razumijevanje antioksidacijskog djelovanja na staničnoj razini (Zhang i sur., 2018). U ovom radu ispitan je antioksidacijski učinak hidrolizata iz pogače konoplje i njegove frakcije <3 kDa pripremljenih hidrolizom s enzimom protamexom u koncentraciji od 5 mg mL<sup>-1</sup>. Naime, u prethodnim istraživanjima čiji su rezultati prikazani u poglavlju 4.2. utvrđeno je da hidrolizat proteina iz pogače konoplje pripremljen ovim enzimom nije bio citotoksičan za HeLa stanice u ispitanim koncentracijama. Kako bi se ispitala stanična antioksidacijska aktivnost pripremljenog hidrolizata iz pogače konoplje, nastajanje unutarstaničnog ROS-a određeno je pomoću Muse<sup>®</sup> Kit-a za određivanje oksidacijskog stresa u normalnim (ne stresnim) i stresnim

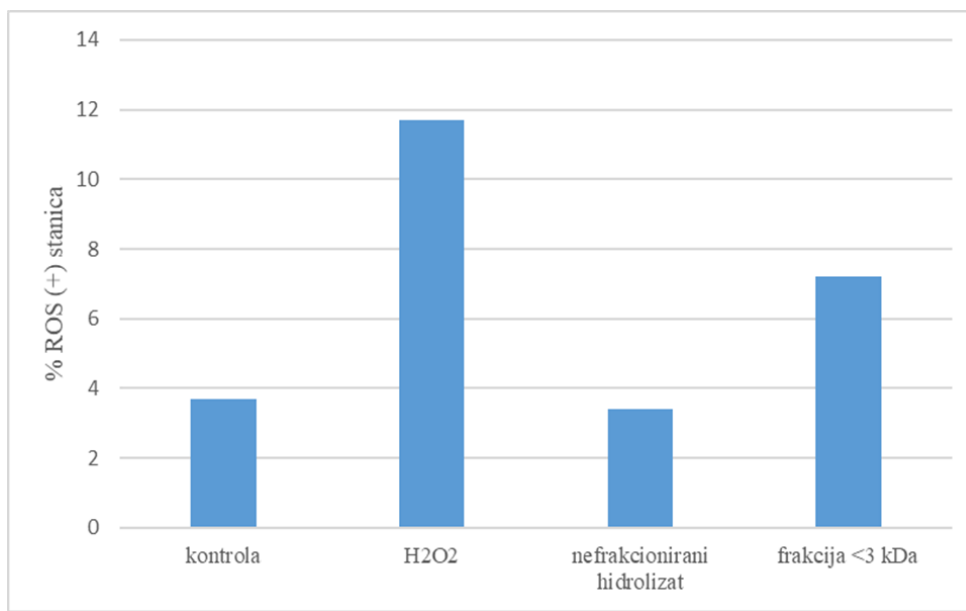
uvjetima. Primjenom kit-a može se odrediti broj i postotak stanica koje se nalaze u oksidativnom stresu, jer reagens sadrži dihidroetidij čijom se oksidacijom dobiva produkt koji interkalira u DNA i stvara crvenu fluorescenciju. Pri tome se detektiraju dvije populacije stanica: ROS (+) koje su u stresu te ROS (-) koje su zdrave stanice. Pretpostavka je da se dodatkom tvari koja ima antioksidacijska svojstva, a u našem slučaju to je hidrolizat iz pogače konoplje, smanjuje nastajanje peroksilnih radikala i oksidacijski stres unutar stanica. Učinak hidrolizata proteina iz pogače konoplje i njegove frakcije <3 kDa na nastajanje unutarstaničnog ROS-a u HeLa stanicama u ne stresnim uvjetima prikazan je na slici 10.



**Slika 10.** Učinak hidrolizata proteina iz pogače konoplje i njegove frakcije <3 kDa na nastajanje unutarstaničnog ROS u HeLa stanicama u ne stresnim uvjetima

U kontrolnim HeLa stanicama udio ROS (+) stanica iznosio je 3,7 %, dok je u uzorcima stanica kojima je bio dodan hidrolizat ili njegova frakcija <3 kDa bilo 0,43 % odnosno 1,17 % ROS (+) stanica. Dobiveni rezultati ukazuju na sposobnost hidrolizata i njegove frakcije da smanjuje oksidativni metabolizam u stanicama u odnosu na kontrolne stanice kojima nije bio dodan hidrolizat.

Kako bi se ispitao učinak istih uzoraka u stresnim uvjetima HeLa stanice koje su predtretirane dodatkom hidrolizata i njegove frakcije tretirane su vodikovim peroksidom (150  $\mu\text{M}$ ) (slika 11).

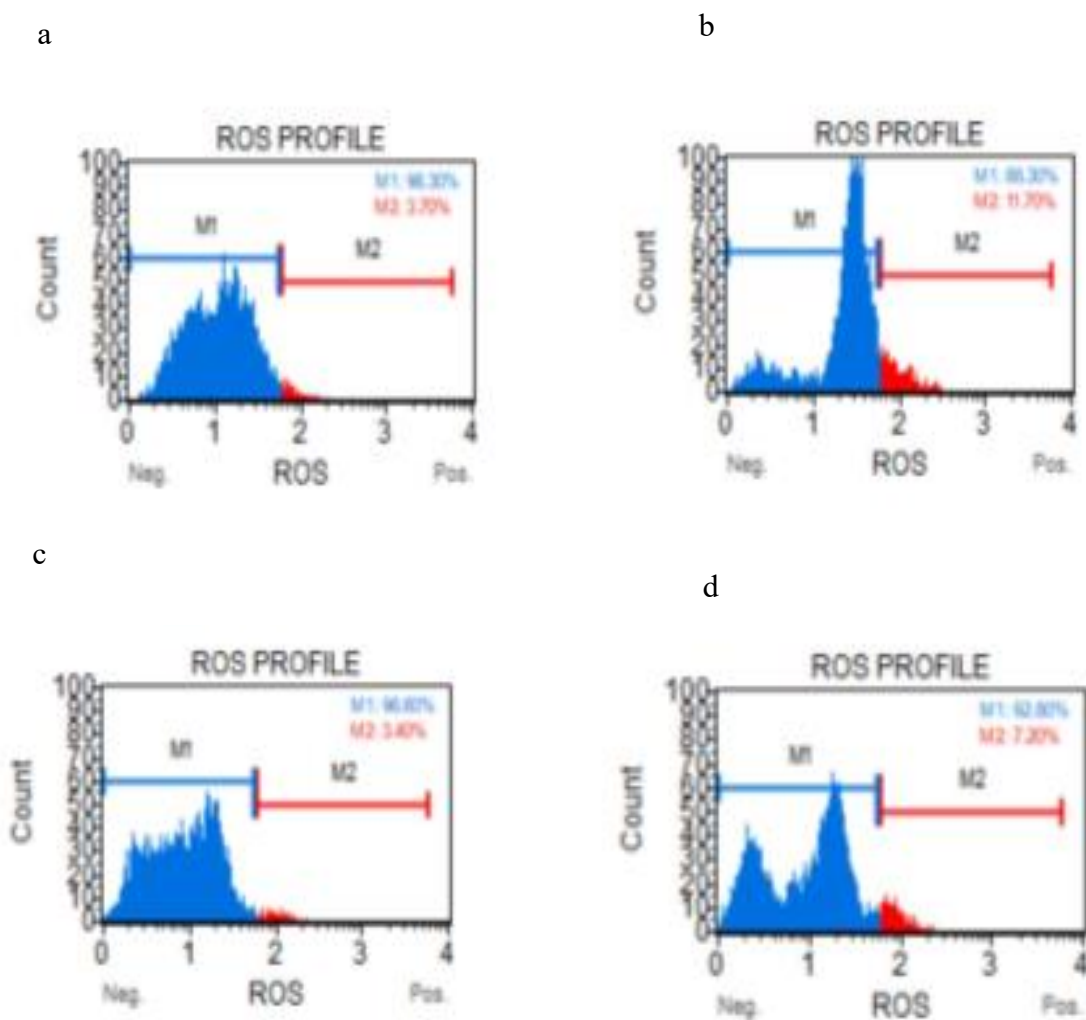


**Slika 11.** Učinak hidrolizata proteina iz pogače konoplje i njegove frakcije <3 kDa na nastajanje unutarstaničnog ROS-a u HeLa stanicama pri tretmanu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Na temelju dobivenih rezultata najveći udio ROS (+) stanica od 11,7 % (slika 12b) prisutan je u uzorku gdje su stanice bile tretirane samo s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za kojeg je poznato da inducira akumulaciju ROS-ova unutar stanice i oštećuje stanični mehanizam antioksidacijske zaštite. Štoviše, višak ROS-ova unutar stanice može uzrokovati peroksidaciju makromolekula što može rezultirati oštećenjem DNA u stanici, razaranjem stanične membrane te pojave apoptoze (Zhang i sur., 2016). U stanicama koje su bile predtretirane hidrolizatom iz pogače konoplje ili njegovom frakcijom <3 kDa primijećen je značajno manji udio ROS (+) stanica koji je iznosio 3,4 % (slika 12c) odnosno 7,2 %. To znači da dodatak hidrolizata suprimira nastajanje ROS-ova unutar stanica, pri čemu je nefrakcionirani hidrolizat imao veći protektivni učinak u odnosu na frakciju <3kDa. Ovaj rezultat nije u korelaciji s rezultatima Shi i sur. (2014) koji su objavili da peptidi kraćih lanaca tj. molekulskih masa pokazuju veću aktivnost hvatanja slobodnih radikala u odnosu na veće peptide.



Također, razlike u strukturi peptida, različite pobočne grupe aminokiselina te općenito biodostupnost stanicama mogu utjecati na interakciju hidrolizata sa slobodnim radikalima. No, dobiveni rezultati ukazuju da hidrolizati proteina iz pogače konoplje mogu biti učinkoviti u zaštiti HeLa stanica protiv oksidativnog stresa izazvanog vodikovim peroksidom.



**Slika 12.** Reprezentativni histogrami određivanja učinaka hidrolizata proteina iz pogače konoplje na inducirani oksidacijski stres u HeLa stanicama prikazani kao % ROS (+) stanica: a) kontrolne stanice; b) stanice tretirane s 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; c) stanice tretirane s 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  i 5  $\text{mg mL}^{-1}$  nefrakcioniranog hidrolizata; i d) stanice tretirane s 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  i 5  $\text{mg mL}^{-1}$  frakcije  $<3$  kDa hidrolizata

## 5. ZAKLJUČI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Svi pripremljeni proteinski hidrolizati iz pogače konoplje posjeduju antioksidacijski potencijal. Najveći antioksidacijski potencijal je pokazao hidrolizat pripremljen pomoću alkalaze s relativnom ORAC vrijednosti od 469,64  $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  uzorka.
2. Frakcijama proteinskog hidrolizata iz pogače konoplje pripremljenih s enzimom alkalazom u veličinama  $>10$  kDa, 3-10 kDa i  $<3$  kDa također je dokazan antioksidacijski potencijal. Frakcije  $>10$  kDa i 3-10 kDa pokazuju sličnu aktivnost s relativnom ORAC vrijednosti od 277,09 i 275,37  $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  uzorka.
3. Frakcije proteinskih hidrolizata iz pogače konoplje pripremljenih s enzimom alkalazom pokazuju niži antioksidacijski potencijal u odnosu na nefrakcionirani uzorak.
4. Antiproliferacijski učinak proteinskih hidrolizata iz pogače konoplje na tumorske stanične linije HeLa i MCF-7 dokazan je samo za hidrolizat dobiven pomoću enzima alkalaze, pri čemu su MCF-7 stanice bile osjetljivije na djelovanje hidrolizata. Kod koncentracije hidrolizata od 10  $\text{mg mL}^{-1}$  vijabilnosti MCF-7 stanica je iznosila 17,36 %, a HeLa stanica 36,94 %.
5. Antiproliferacijski učinak frakcija proteinskih hidrolizata iz pogače konoplje pripremljenih s enzimom alkalazom u veličinama  $>10$  kDa, 3-10 kDa i  $<3$  kDa dokazan je kod frakcija  $>10$  kDa i 3-10 kDa na MCF-7 stanicama i frakciji 3-10 kDa na HeLa stanicama.
6. Dokazan je protektivan učinak hidrolizata iz pogače konoplje pripremljenog enzimom protamexom i njegove frakcije  $<3$  kDa na inducirani oksidacijski stres u HeLa stanicama.

## 6. LITERATURA

Anonymous 1 (2015): <<http://cellsupplies.blogspot.com/2016/03/hela-cell-line.html>>.

Pristupljeno 20.08.2018.

Anonymous 2 (2018): <https://www.moleculardevices.com/cell-counter-mcf-7-cells>. Pristupljeno 20.08.2018.

Alves, P. M., Carrondo, M. J. T., Cruz, P. E. (2008) Introduction to animal cell technology. U: Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy (Castilho, L. R., Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Butler M., ured.), Taylor & Francis Group, New York, str. 1-11.

Brkan, V. (2016) Biološka aktivnost spojeva iz repičinog ulja. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska.

Callaway, J. C. (2004) Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* **140**, 65–72.

Chun, B. H., Kim, J. H., Lee, H. J., Chung, N. H. (2007) Usability of size-excluded fractions of soy protein hydrolysates for growth and viability of Chinese hamster ovary cells in protein-free suspension culture. *Bioresour. Technol.* **98**, 1000–1005.

Cao, G., Alessio, H. M., Cutler, R. G. (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* **14**, 303-311.

Caron, L. (2015) Beyond THC – Cannabis sativa (L.) the plant <<https://www.phytochemia.com/en/2015/05/11/beyond-thc-cannabis-sativa-l-the-plant/>>.

Pristupljeno 13.05.2018.

Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S., Kshirsagar, R. (2015) Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 1110-1122.

Erdmann, K., Grosser, N., Schipporeit, K., Schroder, H. (2006) The ACE inhibitory dipeptide Met-Tyr diminishes free radical formation in human endothelial cells via induction of heme oxygenase-1 and ferritin. *J. Nutr.* **36**, 1281-1288.

FitzGerald, R. J., Meisel, H. (2003) Milk Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides. *Adv. Dairy Chem.* **1**, 675.

- Franěk, F., Hohenwarter, O., Katinger, H. (2000) Plant protein hydrolysates: Preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotech. Progress.* **16**, 688-692.
- Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., Aluko, R. E. (2011) *In Vitro* antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **88**, 381-389.
- Hartmann, R., Meisel, H. (2007) Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18** (2),163-169.
- Jin, M-M, Zhang, Li., Yu, H-X., Meng, J, Lu, R-R. (2013) Protective effect of whey protein hydrolysates on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> –induced PC12 cells oxidative stress via a mitochondria-mediated pathway. *Food Chem.* **141**, 847-857.
- Kadman, D., Lee, S.S. (2017) Value addition of oilseed meal. A focus on bioactive peptides. *Food Measure*, **12**, 449-458.
- Kannan, A., Hettiarachchy, N., Johnson, M.,G., Nannapaneni, R. (2008) Human Colon and Liver Cancer Cell Proliferation Inhibition by Peptide Hydrolysates Derived from Heat-Stabilized Defatted Rice Bran. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 11643-11647.
- Kannan, A., Hettiarachchy, N., Satya Narayan, S. (2009) Colon and Breast Anti-cancer Effects of Peptide Hydrolysates Derived from Rice Bran. *The Open Bioactive Compounds Journal.* **2**, 17-20.
- Karamać, M., Kulczyk, A., Sulewska, K. (2014) Antioxidant Activity of Hydrolysates Prepared from Flaxseed Cake Proteins Using Pancreatin. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **64**, 227–233.
- Li X., Deng, J., Shen, S., Li, T., Yuan, M. (2015) Antioxidant activities and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from defatted *Camellia oleifera* seed cake. *J. Food Sci. Technol.* **52** (9), 5681–5690.
- Logarušić, M. (2017) Učinak proteinskog izolata iz uljne pogače lana na rast i produktivnost kulture životinjskih stanica. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska.

- Lu, R-R., Qian, P., Sun, Z., Zhou, T-P., He, J-F., Zhang, H. (2010) Hempseed protein derived antioxidative peptides: Purification, identification and protection from hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Food Chem.* **123**, 1210-1218.
- Lucey, B.P., Nelson-Rees, W.A., Hutchins, G.M. (2009) Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Arch Pathol Lab Med.* **133** (9), 1463-1467.
- Malomo, S. A., Onuh, J. O., Girgih, A. T., Aluko, R. E. (2015) Structural and Antihypertensive Properties of Enzymatic Hemp Seed Protein Hydrolysates. *Nutrients.* **7**, 7616-7632.
- Marambe, P. W. M. L. H. K., Shand, P. J., Wanasundara, J. P. D. (2008) An *in-vitro* investigation of selected biological activities of hydrolysed flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **85**, 1155-1164.
- Mosmann, T. (1983) Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods.* **65**, 55-63.
- Osborne, C. K., Hobbs, K., Tren, J. M. (1987) Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Res. Tr.* **9**, 111-12.
- Raikos, V., Dassios, T. (2014) Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review. *Dairy Sci. Technol.* **94**, 91.
- Rocha, M., F. C.; Stéfano, S. C.; De Cássia Haiek, R.; Rosa Oliveira, L. M. Q.; Da Silveira, D. X. (2008) Therapeutic Use of Cannabis Sativa on Chemotherapy-induced Nausea and Vomiting Among Cancer Patients: Systematic Review and Meta-analysis. *Eur. J. Cancer Care.* **17**, 431–443.
- Ryan, J.A. (2008) Introduction to animal cell culture <[http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/intro\\_animal\\_cell\\_culture.pdf](http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/intro_animal_cell_culture.pdf)> . Pristupljeno 10. kolovoza 2018.
- Samaranayaka, A. G. P., Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: a review of their production, assessment, and potential applications. *J. Func. Foods.* **3**, 229-254.
- Sarmadi, B. H., Ismail, A. (2010) Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides.* **31**, 1949-1956.

- Shahidi, F., Zhong, Y. (2015) Measurement of antioxidant activity. *J. Funct Foods*. **18**, 757–781.
- Shi, Y., Kovac-Nolan, J., Jiang, J., Tsao, R., Mine, Y. (2014) Antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from eggshell membrane proteins and its protective capacity in human intestinal epithelial Caco-2 cells *J. Funct. Foods* **10**, 35-45.
- Sung, Y. H., Lim, S. W., Chung, J. Y., Lee, G. M. (2004) Yeast hydrolysate as a low-cost additive to serum-free medium for the production of human thrombopoietin in suspension cultures of Chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* **63**, 527-536.
- Tang, C-H., Wang, X-S., Yang, X-Q. (2009) Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa L.*) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chem.* **114**, 1484–1490.
- van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, Ä., Gstraunhaler, G., Honegger, P., Knudsen, L. E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M. L. (2010) Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol. in vitro.* **24**, 1053 – 1063.
- Wang, X-S, Tang, CH, Chen, L., Yang, X-Q. (2009) Characterization and Antioxidant Properties of Hemp Protein Hydrolysates Obtained with Neutrase. *Food Technol. Biotechnol.* **47**(4), 428-434.
- Zhang, Q., Tong, X., Qi, B., Wang, Z., Li, Y., Sui, X., Jiang, L. (2018) Changes in antioxidant activity of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate under simulated gastrointestinal digestion and transepithelial transport. *J. Funct. Foods* **42**, 298-305.
- Zhang, X., Wang, L., Wang, R., Luo, X., Li, Y., & Chen, Z. (2016). Protective effects of rice dreg protein hydrolysates against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG-2 cells. *Food Funct.* **7**, 1429–1437.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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.

Martina Bagović

Ime i prezime studenta