

Učinak izolata i hidrolizata proteina iz pogače konoplje na rast i oksidacijski stres normalnih i tumorskih stanica

Dominko, Tena

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:725116>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Tena Dominko

1033/MB

**UČINAK IZOLATA I
HIDROLIZATA PROTEINA IZ
POGAČE KONOPLJE NA RAST I
OKSIDACIJSKI STRES
NORMALNIH I TUMORSKIH
STANICA**

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 izv. prof. dr.sc. Kristine Radošević, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Marijana Logarušića, mag.ing.mol.biotech.

Zahvaljujem se mentorici, izv.prof.dr.sc. Kristini Radošević na uloženom vremenu i trudu te na iskazanoj pomoći i savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem se i ostalim profesorima i asistentima u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na pristupačnosti i ugodnoj radnoj atmosferi.

Naposlijetku, najviše se zahvaljujem svojim roditeljima na strpljenju te bezuvjetnoj podršci i potpori koju su mi pružili tijekom cijelog studiranja.

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

UČINAK IZOLATA I HIDROLIZATA PROTEINA IZ POGAČE KONOPLJE NA RAST I OKSIDACIJSKI STRES NORMALNIH I TUMORSKIH STANICA

Tena Dominko, 1033/MB

Sažetak: Najčešći proizvodi industrijske konoplje (*Cannabis sativa L.*) su brašno i ulje koje se proizvodi hladnim prešanjem sjemenki. Prilikom tog postupka kao nusproizvod zaostaje uljna pogača konoplje koja je bogata proteinima. Enzimskom hidrolizom proteina konoplje dobivaju se peptidi iznimnog biološkog potencijala te se zato koriste u proizvodnji hrane i farmaceutika. Zato je cilj ovog rada bio ispitati antiproliferacijsko djelovanje proteinskih hidrolizata uljne pogače konoplje pripremljenih s tri različita enzima (alkalaza, neutraza i protamex) *in vitro* na tumorskoj HeLa i netumorskoj HaCaT staničnoj liniji, protektivni učinak na HaCaT stanicama u kojima je induciran oksidativni stres te induciranje stanične smrti u HeLa stanicama. Dobiveni rezultati pokazuju kako svi pripremljeni hidrolizati i izolat posjeduju antiproliferacijsku aktivnost. HeLa stanice su osjetljivije na učinak hidrolizata te je najjači antiproliferativni učinak imao hidrolizat dobiven pomoću enzima alkalaze. Dokazan je i antioksidativni učinak hidrolizata pripremljenog enzimom neutrazom na HaCaT stanice u kojima je induciran oksidativni stres. Također, dokazano je i kako hidrolizat dobiven pomoću enzima alkalaze inducira staničnu smrt u HeLa stanicama.

Ključne riječi: citotoksičnost, oksidativni stres, proteinski hidrolizati, stanična smrt, uljna pogača konoplje

Rad sadrži: 37 stranica, 15 slika, 2 tablice, 35 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof.dr.sc. Kristina Radošević

Pomoć pri izradi: Marijan Logarušić, mag.ing.mol.biotech.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Višnja Gaurina Srček
2. Izv.prof.dr.sc. Kristina Radošević
3. Prof.dr.sc. Jasna Novak
4. Izv.prof.dr.sc. Ivana Kmetič (zamjena)

Datum obrane: 28.9.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

HEMPSEED PROTEIN ISOLATES' AND HYDROLYSATES' EFFECTS ON THE PROLIFERATION AND INDUCED OXIDATIVE STRESS IN NORMAL AND CANCER CELL LINES

Tena Dominko, 1033/MB

Abstract: The most common products of industrial hempseed (*Cannabis sativa L.*) are flour and oil, which is produced by cold pressing of seeds. Byproduct of this process is hempseed oilcake that is rich in protein. Product of enzymatic hydrolysis of hemp proteins are peptides with biological potential and therefore are used in the production of food and pharmaceuticals. In this thesis the antiproliferative effects of hempseed protein isolate and hydrolysates prepared using three proteases (Alcalase, Neutrase and Protamex) were tested in vitro on cancer (HeLa) and normal (HaCaT) cell lines. Protective effects were evaluated on H₂O₂-induced oxidative stress in HaCaT cells. In addition, it was tested whether hempseed protein hydrolysate induces cell death in HeLa cells. The obtained results showed that hempseed protein isolate and hydrolysates exhibit antiproliferative effects. The strongest antiproliferative effect was observed in hydrolysates obtained by Alcalase. The study has confirmed the protective effects of hydrolysate obtained by Neutrase during induced oxidative stress in HaCaT cell line. Furthermore, it is confirmed that hydrolysate obtained by Alcalase induces cell death in HeLa cell line.

Keywords: *cytotoxicity, oxidative stress, protein hydrolysate, cell death, hempseed oilcake*

Thesis contains: 37 pages, 15 figures, 2 tables, 35 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *Kristina Radošević, PhD, Associate professor*

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

Reviewers:

1. PhD. *Višnja, Gaurina Srček*, Full professor
2. PhD. *Kristina, Radošević*, Associate professor
3. PhD. *Jasna, Novak*, Full professor
4. PhD. *Ivana, Kmetič* Associate professor (substitute)

Thesis defended: 28.9.2020.

Sadržaj	stranica
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Uzgoj, sastav, proizvodnja i primjena industrijske konoplje	3
2.1.1. Industrijska konoplja kao izvor bioaktivnih spojeva.....	5
2.1.2. Uljna pogača konoplje	7
2.2. Priprema i aktivnost izolata i hidrolizata dobivenih iz uljnih pogača	8
2.3. Kulture životinjskih stanica	9
2.3.1. Primjena kultura stanica za <i>in vitro</i> ispitivanje biološke aktivnosti spojeva	10
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Materijali	13
3.1.1. Proteinski izolat i hidrolizati uljne pogače konoplje	13
3.1.2. Humane stanične linije.....	13
3.1.2.1. HeLa stanična linija.....	13
3.1.2.2. HaCaT stanična linija	14
3.1.3. Kemikalije.....	15
3.1.4. Otopine i pufferi.....	16
3.1.5. Uređaji i oprema	16
3.2. Metode rada	17
3.2.1. Uzgoj HeLa i HaCaT stanica u Petrijevim posudama.....	17
3.2.2. Ispitivanje utjecaja dodatka izolata i hidrolizata proteina iz uljne pogače konoplje na rast HeLa i HaCaT stanica kolorimetrijskom MTS metodom.....	17
3.2.3. Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta primjenom DCFH-DA metode	19
3.2.4. Određivanje tipa stanične smrti primjenom analizatora staničnog zdravlja Muse®	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. Utjecaj dodatka izolata i hidrolizata uljne pogače konoplje na rast HeLa i HaCaT stanica	24
4.2. Zaštitni učinak izolata i hidrolizata uljne pogače konoplje na HaCaT stanice u kojima je induciran oksidativni stres	28
4.3. Učinak hidrolizata uljne pogače konoplje na indukciju stanične smrti u HeLa stanicama	30
5. ZAKLJUČCI	33
6. LITERATURA	34

1. UVOD

U suvremenom svijetu se zbog načina života sve više suočavamo s negativnim utjecajima na ljudsko zdravlje. Zbog toga se sve veći naglasak stavlja na zdravi način života koji uključuje konzumiranje zdrave prehrane i prirodnih dodataka hrani. Nažalost, iz godine u godinu također se bilježi i znatan porast oboljelih od karcinoma. Budući da se konvencionalnom terapijom liječenja karcinoma ne postižu uvijek zadovoljavajući rezultati, pacijenti se sve češće odlučuju za alternativne pristupe liječenju. Zato se sve više napora ulaže u istraživanje prirodnih izvora koji bi se mogli u izvornom ili prerađenom obliku koristiti kao funkcionalna hrana u prevenciji te kao terapeutici u tretmanu tumorskih oboljenja.

Zasigurno jedni od najvažnijih i najproučavanijih sastojaka hrane su proteini. Bogati su esencijalnim aminokiselinama, lako se mogu modificirati i imaju uglavnom pozitivne učinke na ljudsko zdravlje te se zbog toga često istražuju kao novi izvor funkcionalne hrane (Hadnađev i sur., 2018). Zbog trenda smanjenja otpada nastalog nakon procesa proizvodnje prehrambenih proizvoda istražuju se razne mogućnosti dodatnog iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije. Jedan od zanimljivih nusproizvoda prehrambene industrije, kao izvor proteina, su uljne pogače koje zaostaju prilikom ekstrakcije ulja iz sjemenki raznih uljarica. Proteini iz uljne pogače, kao i njihovi razgradni produkti, djeluju kao bioaktivne tvari koje pokazuju antitumorsko, antimikrobno, imunomodulatorno, osteoprotektivno i antioksidativno djelovanje (Chalamaiah i sur., 2018).

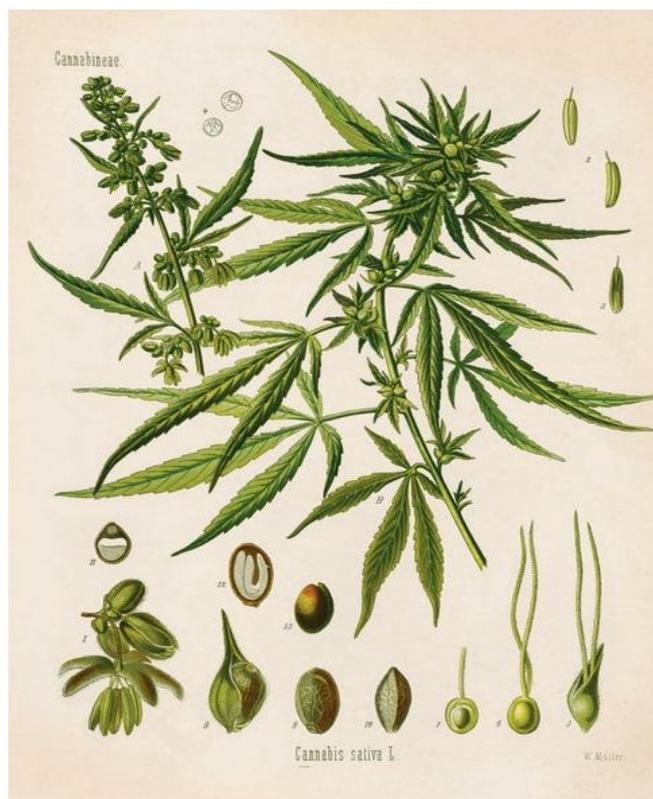
Cannabis sativa L. ili obična (industrijska) konoplja posljednjih godina postaje sve popularnija od kad je legaliziran njen uzgoj u svrhu proizvodnje hrane, hrane za životinje i dodataka hrani. Koriste se njene sjemenke, a najčešći proizvodi su brašno i ulje koji su bogati proteinima, masnim kiselinama, vitaminima i mineralima (Isinguzo, 2011). Zbog složenog i povoljnog sastava, konoplja postaje sve više zanimljiva i zastupljenija u prehrani ljudi koji se okreću zdravijem načinu života, a najčešće je na tržištu prisutna u obliku dodataka hrani. Dosadašnja istraživanja pokazala su kako proteinski hidrolizati dobiveni iz konopljinih sjemenki iskazuju antioksidativni potencijal, a sve više istraživanja usmjerava se i na njihovo korištenje u tretmanu pacijenata oboljelih od karcinoma, točnije ispituje se njihov antiproliferativni i citotoksični učinak na tumorske stanice.

Stoga je cilj ovog rada ispitati biološki potencijal proteinskih hidrolizata uljne pogače konoplje na dvije stanične linije, tumorsku HeLa i normalnu HaCaT staničnu liniju u ovisnosti o vrsti enzima korištenog za hidrolizu. Hidroliza je provedena s tri različite komercijalne proteaze: Alcalase[®], Neutrase[®] i Protamex[®]. Ispitano je njihovo antiproliferacijsko djelovanje *in vitro* na obje stanične linije, protektivni učinak na normalnim stanicama (HaCaT) u kojima je induciran oksidativni stres te induciranje stanične smrti u tumorskim stanicama (HeLa).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Uzgoj, sastav, proizvodnja i primjena industrijske konoplje

Cannabis sativa ili tzv. obična konoplja je godišnja, dvodomna zeljasta biljka koja je dobar izvor hrane, vlakana i ulja za medicinske i prehrambene svrhe (Lu i sur., 2010). Industrijska konoplja jedna je od najstarijih biljaka koja se uzgajala za potrebe prehrane, proizvodnje vlakna i medicinsku primjenu. U Kini se preko 3000 godina koristila sirova, termički obrađena (kuhana ili pržena) te u obliku ulja. U mnogim zemljama Europe, Azije i Afrike dugo je bio zabranjen njen uzgoj zbog fitokemijskog sastojka droge delta-9-tetrahidrokanabinola (THC) koji je zastupljen u visokom udjelu (6 do 20%) u lišću, cvijeću i sjemenkama vrste *Cannabis indica* odnosno konoplje za proizvodnju hašiša (Isinguzo, 2011). Krajem 20. stoljeća, raste društveni interes za uzgoj industrijske konoplje, osobito u zemljama Europske Unije te ona biva uključena i u državne poticaje ekološki održivoj proizvodnji pri čemu se nastoji da se osigura kvalitetno sjemenje za uzgoj biljaka u kojima razina THC-a ne prelazi zakonom dozvoljenih 0,3% (Dubreta, 2006). Danas se industrijska konoplja uzgaja i koristi kao poljoprivredni proizvod širom svijeta, a osobito u Americi, Kanadi i Kini (Lu i sur., 2010). U Republici Hrvatskoj je od 2012. godine pravilnikom koje je donijelo Ministarstvo poljoprivrede dozvoljen uzgoj industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) u svrhu proizvodnje hrane i hrane za životinje ako sadržaj THC – a u suhoj tvari biljke ne prelazi 0,2% te ako je sorta upisana u Sortnu listu Republike Hrvatske (Pravilnik, 2012).



Slika 1. *Cannabis sativa L.* (Anonymous 2, 2019)

Konoplja je bogata vlaknima pa se uvelike upotrebljava u proizvodnji papira i odjeće u Kanadi i Europi. Nakon prerade vlakana, sjemenke konoplje sadrže 35% ulja, 25% proteina i značajne količine prehrambenih vlakana što je prikazano u Tablici 1. Osim toga, sjemenke su bogate vitaminima i mineralima te imaju značajni udio tokoferola. Što se tiče njihovog proteinskog sastava, dva najvažnija i dobro opisana proteina iz sjemenki konoplje su edestin i albumin (Isinguzo, 2011). Oni su lako probavljivi, bogati su svim esencijalnim aminokiselinama i imaju visoku razinu arginina i glutaminske kiseline što je vidljivo u Tablici 2.

Tablica 1. Uobičajeni sastav nutrijenata u sjemenkama konoplje (Isinguzo, 2011)

NUTRIJENTI	UDIO (%)
ulja	35,5
proteini	24,8
ugljikohidrati	27,6
vlaga	6,5
pepeo	5,6
ukupna prehrambena vlakna	27,6

Tablica 2. Uobičajeni aminokiselinski sastav proteina sjemenki konoplje (Isinguzo, 2011)

AMINOKISELINA	KOLIČINA (g / 100 g)
Alanin	1,28
Arginin	3,10
Asparaginska kiselina	2,78
Cistein	0,41
Glutaminska kiselina	4,57
Glicin	1,14
Histidin*	0,71
Izoleucin*	0,98
Leucin*	1,72
Lizin*	1,03
Metionin*	0,58
Fenilalanin*	1,17
Prolin	1,15
Serin	1,27
Treonin*	0,88
Triptofan*	0,20
Tirozin	0,86
Valin*	1,28

* esencijalne aminokiseline

Sjemenke konoplje ne sadrže oligosaharide koji inače izazivaju želučane tegobe i nadutost, orašastog su okusa i nemaju alergena svojstva. Upravo zato se sjemenke konoplje koriste kao dodatak hrani u mnogim zemljama (Isinguzo, 2011).

2.1.1. Industrijska konoplja kao izvor bioaktivnih spojeva

U tijelo se unose hranom i oslobađaju se djelovanjem enzima, a djeluju kao modulatori raznih fizioloških procesa te mogu regulirati povišeni krvni tlak, imati antioksidacijsku

aktivnost, djelovati na imunski sustav, snižavati razinu kolesterola i triglicerida u plazmi, djelovati antimikrobno, itd. (Hadnađev i sur., 2018).

Sjemenke industrijske konoplje sadrže visoke razine minerala, vitamina A, C i E te β – karotena. Bogate su fosforom, kalijem, magnezijem, sumporom i kalcijem te sadrže niske razine željeza i cinka koji su kofaktori važnih enzima koji sudjeluju u metabolizmu masnih kiselina (Montserrat-de la Paz i sur., 2014). Dva najvažnija proteina, edestin i albumin zbog toga što su lako probavljivi koriste se kao proteinska nadopuna hrane za dojenčad i djecu.

Konopljinu ulje proizvodi se hladnim prešanjem sjemenki industrijske konoplje. Ulje sadrži otprilike 84 % polinezasićenih masnih kiselina (engl. polyunsaturated fatty acids - PUFAs), uglavnom linolnu i gama – linoleinsku kiselinu. PUFAs sudjeluju u izgradnji fosfolipida stanične membrane i stanica mozga te potiču imunski odgovor. Osim toga, sudjeluju u snižavanju LDL – kolesterola i reguliranju krvnog tlaka, ateroskleroze te u prevenciji nastajanja karcinoma i srčanih bolesti. Gama – linoleinska kiselina ima važnu farmaceutsku vrijednost jer se može koristiti u liječenju degenerativnih kroničnih oboljenja. Tokoferoli su također jedan od bitnih sastojaka konopljinog ulja i to zbog svog antioksidativnog potencijala te pozitivnog učinka na određene tipove karcinoma i degenerativna oboljenja poput Alzheimerove bolesti (Montserrat-de la Paz i sur., 2014). Zbog sadržaja masnih kiselina, konopljinu ulje se također koristilo lokalno u liječenju atopijskog dermatitisa i ekcema (Isinguzo, 2011). U ispitivanjima na zdravim volonterima dokazano je kako je upotreba konopljinog ulja poboljšala izgled kože, kose i noktiju pa postoje naznake da bi se ulje moglo koristiti i u kozmetičkoj industriji ili kao zamjena za vitaminske dodatke usmjerene na izgled kose, kože i noktiju. Osim toga, prema rezultatima kliničkih ispitivanja konopljinu ulje moglo bi se koristiti i u lokalnom liječenju rana na sluznicama nosa, očiju ili grla nakon operativnih zahvata (Callaway, 2004).

Neosapunjiva frakcija konopljinog ulja (1,5 – 2% ulja) predstavlja još nedovoljno istražen izvor zanimljivih spojeva prisutnih u malim koncentracijama. Otprilike 15,8% frakcije čine steroli od kojih su najzastupljeniji i najvažniji β – sitosterol i kampesterol. Steroli snižavaju LDL – kolesterol u ljudi oboljelih od hiperkolesterolemije (povišena razina kolesterola) i dijabetesa te smanjuju rizik od infarkta miokarda. Također, reduciraju biomarkere oksidativnog stresa i upalnih reakcija (Montserrat-de la Paz i sur., 2014).

2.1.2. Uljna pogača konoplje

Uljna pogača konoplje dobiva se kao sekundarni proizvod (nusproizvod) pri proizvodnji konopljinog ulja u postupku hladnog prešanja sjemenki industrijske konoplje. Konopljino ulje prepoznato je kao važan izvor esencijalnih masnih kiselina i koristi se kao sastojak krema za tijelo, detergenata i sapuna. Također, konopljino ulje smatra se funkcionalnom hranom (Lu i sur., 2010).

Uljne pogače koje zaostaju nakon ekstrakcije ulja još uvijek se najvećim dijelom koriste kao stočna hrana ili gnojivo, iako se mogućnost njihove primjene sve više širi. Tako se npr. usitnjavanjem i prosijavanjem uljne pogače dobija brašno industrijske konoplje koje je bogato proteinima i vlaknima. Uljna pogača sadrži visoki udio proteina koji se uglavnom kreće od 15 do 50%. Iako sadrži mnoge druge biološki aktivne spojeve (vitamine, fenole, minerale), proteini iz uljne pogače konoplje najviše se istražuju zbog mogućnosti njihovog modificiranja te učinka na brojne fiziološke funkcije u ljudi (Hadnađev i sur., 2018). Upravo zbog navedene činjenice visokog udjela proteina, uljne pogače općenito, pa tako i konoplje, se sve više istražuju kao sirovina za dobivanje proteinskih izolata i hidrolizata te niza drugih proizvoda s dodanom vrijednošću kao što su aminokiseline, enzimi, organske kiseline, jednostanični proteini i biološki aktivni metaboliti (Ramachandran i sur., 2006). Takvim iskorištavanjem uljnih pogača, stvara se dodana vrijednost organskih ostataka, odnosno nusproizvoda, čime se ostvaruje ekonomska održivost prehrambene industrije.



Slika 2. Uljna pogača konoplje (Anonymous 1, 2019)

2.2. Priprema i aktivnost izolata i hidrolizata dobivenih iz uljnih pogača

Uljne pogače su nusprodukt zaostao nakon ekstrakcije ulja i mogu biti jestive i nejestive. Jestive uljne pogače imaju visoku nutritivnu vrijednost i izrazito su bogate proteinima čiji sastav ovisi o biljnoj vrsti, uvjetima uzgoja i metodi ekstrakcije. Zbog visokoproteinskog sastava uglavnom se koriste kao hrana za životinje, pretežno za ribe i preživače. Nejestive uljne pogače poput onih dobivenih iz ricinusa, indijske breze (nusproizvod proizvodnje karanja ulja) i nima ne mogu se koristiti kao hrana za životinje zbog prisutnosti toksičnih spojeva i nečistoća u svome sastavu te se uglavnom koriste kao organska dušična gnojiva. Također, nejestive uljne pogače štite biljke od nematoda iz tla, insekata i parazita te povećavaju rezistenciju na neke biljne infekcije. Najpoznatije i najupotrebljivnije uljne pogače su uljne pogače soje, uljane repice, pamukovog sjemena, kikirikija, suncokreta, kopra (dobiven iz kokosovog oraha) i lana (Sivaramakrishnan i Gangadharan, 2009). Uljna pogača soje u odnosu na ostale uljne pogače prednjači u proizvodnji te se uglavnom koristi kao sastojak hrane za životinje i ljude zbog visokoproteinskog sastava, lako se probavlja i ugodnog je okusa. Uljne pogače sezama i gorušice koriste se kod liječenja proteinske pothranjenosti kao supstituenti hidrolizata animalnih proteina.

Hidrolizati su proizvodi koji mogu nastati enzimskim, kiselinskim i fermentacijskim metodama, a to su peptidi, aminokiseline i minerali. Eksperimentalno je dokazano da je hidrolizat uljne pogače sezama i gorušice sličan komercijalno dostupnom kazeinu (Ramachandran i sur., 2006). Uljna pogača buče bogata je korisnim sastojcima poput fenolnih kiselina, joda i selenija koji bi mogli imati pozitivan učinak na ljudski organizam. Unatoč tome, za sad se uglavnom koristi kao stočna hrana te nije u potpunosti iskorišten potencijal koji ima zbog svog visokog udjela proteina (65%). Istražuju se načini na koje bi se uljna pogača buče mogla bolje iskoristiti i jedan od tih načina je i proizvodnja enzimskih hidrolizata koji iskazuju puno bolju biološku aktivnost u odnosu na native uzorke uljne pogače buče. Eksperimentalno je dokazano kako hidrolizat uljne pogače buče djeluje kao ACE inhibitor te pokazuje dobru antioksidativnu aktivnost *in vitro* (Vaštag i sur., 2011).

Fizikalni, kemijski i enzimski tretmani korišteni su kako bi se modificirala svojstva i aktivnost biljnih proteina. Enzimska hidroliza pokazala se najboljom metodom zato što je blaža, lako se kontrolira te je očuvan nutritivni sastav nativnih proteina. Nekoliko je prednosti enzimske hidrolize: omogućuje ugrađenim hidrofobnim grupama da se izlože i tako

poboljšavaju hidrofobnost proteina, povećava se broj ionizirajućih grupa i smanjuje se molekularna masa peptida. Hidrolizom se mogu popraviti ona svojstva izolata koji ograničavaju upotrebu poput topljivosti i mogućnosti emulzificiranja. Enzimska hidroliza proteinskih izolata konoplje može biti limitirajuća i ekstenzivna, ovisno o stupnju hidrolize i prirodi proteina (Isinguzo, 2011). Enzimskom hidrolizom mogu se dobiti visoko vrijedni peptidi koji posjeduju antioksidativnu aktivnost. Ti antioksidacijski peptidi mogu djelovati kao inhibitori peroksidacije lipida, direktni čistači slobodnih radikala i posrednici u keliranju iona tranzicijskih metala. Antioksidacijska aktivnost peptida usko je povezana sa aminokiselinskim sastavom. Hidrolizati višeg stupnja hidrolize pokazuju jaču antioksidativnu aktivnost od proteinskog izolata konoplje (Hadnađev i sur., 2018).

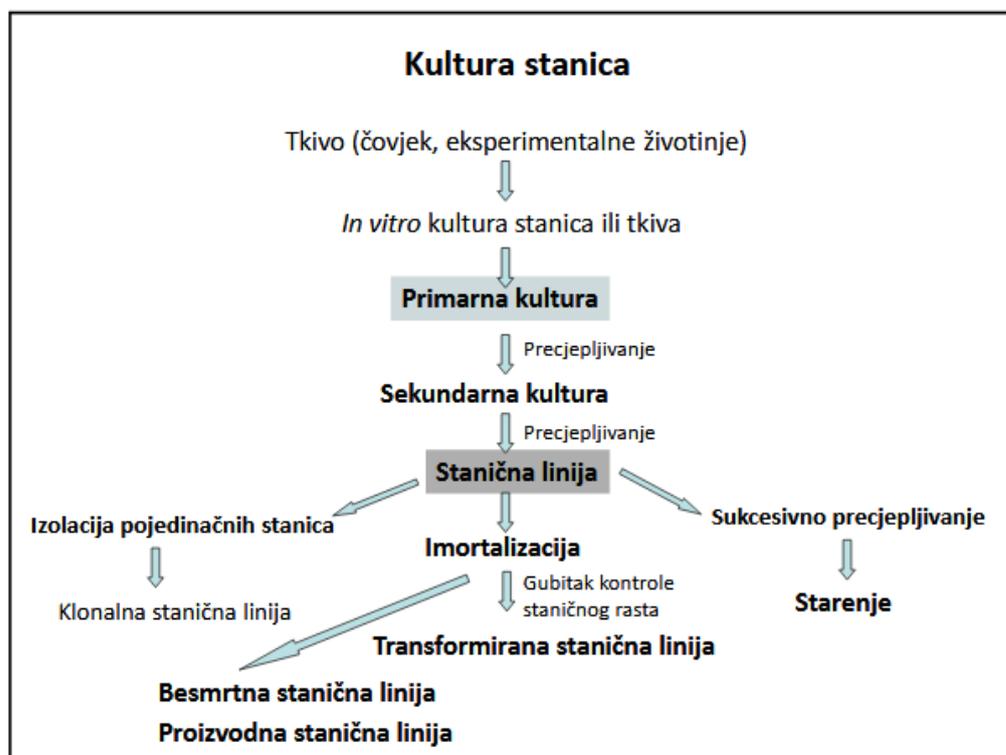
Različiti enzimi koriste se za dobivanje proteinskih hidrolizata koji imaju potencijalnu antioksidativnu aktivnost: alkalaza za proteine iz pšeničnih klica, Flavourzyme za proteine iz sjemenki uljane repice, tripsin za proteine iz sjemenki sezama. Proteinski hidrolizati koji imaju aktivnost inhibitora angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE) pokazali su se korisnima za razvijanje novih terapeutika i funkcionalne hrane koja bi preventirala hipertenziju.

Uljna pogača barbadorskog oraščića specifična je po velikom udjelu zaostalih ljuskica te se za upotrebu obrađuje kako bi se dobili proteinski izolati. Tako dobiveni proteinski izolati imaju 89% proteina te se zbog toga koriste kao hrana za životinje. Eksperimentalno, na štakorima, dokazano je kako se proteinski izolati barbadorskog oraščića mogu koristiti kao zamjena za prehranu bogatu kazeinom te da pritom smanjuju tjelesnu težinu štakora koji su u hrani imali dodane različite količine proteinskih izolata (Zhao i sur., 2018). Proteinski izolat konoplje (dobiven iz sjemenki) lako razgrađuju tripsin i pepsin, dok proteinski hidrolizati konoplje pokazuju mogućnost čišćenja slobodnih radikala i keliranja Fe^{2+} iona.

2.3. Kulture životinjskih stanica

Kultura životinjskih stanica dobivena je iz pojedinačnih stanica izoliranih iz tkiva ili organa koje je moguće uzgajati i održavati *in vitro* odnosno u umjetnom okolišu. Pojedinačne stanice su pod kontrolom organizma u kojem su rasle, a nakon izolacije imaju sposobnost prilagodbe u novom okolišu. No, u novim uvjetima one gube svoje visokospecijalizirane funkcije pa zato podliježu diferencijaciji, degeneraciji ili transformaciji. Primarnu kulturu stanica čine stanice

direktno izolirane iz željenog organa ili tkiva i nacijeppljene po prvi puta u medij za uzgoj, odnosno u *in vitro* uvjete. Uspostavljanje takve kulture stanica postiže se mehaničkom i enzimskom razgradnjom tkiva. Primarna kultura stanica je najbližnja prirodnom tkivu pa je prikladna za ispitivanja svojstava diferenciranih stanica no njen je nedostatak, ograničeni životni vijek i smanjeni potencijal rasta. Stoga se određenim manipulacijama te subkultiviranjem ili pasažiranjem primarna kultura stanica može prevesti u staničnu liniju. Stanična linija može biti konačna (odumire nakon određenog broja precjepljivanja) i kontinuirana (beskonačna, može rasti u supenziji) (Slivac i sur., 2016).

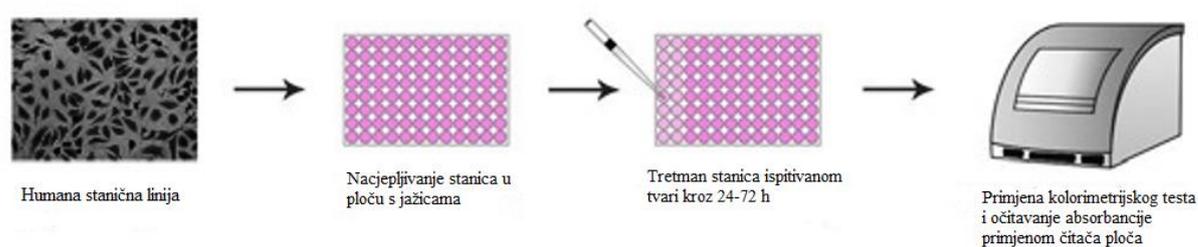


Slika 3. Shematski prikaz postupka uspostave kulture stanica (Slivac i sur., 2016)

2.3.1. Primjena kultura stanica za *in vitro* ispitivanje biološke aktivnosti spojeva

U ispitivanjima biološke aktivnosti spojeva najčešće se koriste humane kontinuirane stanične linije koje se mogu nabaviti putem banke stanica, od kojih su najveće *American Type Cell Culture (ATCC)* i *European Collection of Animal Cell Culture (ECACC)*. Izvođenjem niza *in vitro* testova u kulturama životinjskih stanica određuje se biološka aktivnost spojeva kako bi

se na temelju tih rezultata moglo procijeniti djelovanje na ljudski organizam. Cilj ispitivanja primjenom *in vitro* metoda je smanjiti broj *in vivo* ispitivanja na pokusnim životinjama koje proživljavaju bol i patnju tijekom testiranja, a mnoge od njih budu i žrtvovane. Nedostatak *in vitro* metoda je što ne mogu točno pokazati tkivno-specifičnu toksičnost, pojavu adaptivnog odgovora te metaboličke promjene koje se događaju u živom organizmu. U prilog im ipak ide dobra podudarnost (otprilike 80%) s rezultatima koje daju *in vivo* testovi ispitivanja biološke aktivnosti. Najčešće metode koje se provode su određivanje bazalne citotoksičnosti, test proliferacije stanica, antitumorski i antioksidacijski učinak na stanice (Radojčić Redovniković i sur., 2016).



Slika 4. Shematski prikaz primjene kulture stanica za *in vitro* ispitivanje (Radojčić Redovniković i sur., 2016)

Testovi citotoksičnosti su najčešće korišteni *in vitro* testovi koji se provode u kulturi stanica. Test otpuštanja laktat dehidrogenaze temelji se na mjerenju aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) u izvanstaničnom mediju. Osim toga, izlazak LDH u medij u kojem se uzgaja kultura stanica pokazatelj je ireverzibilne stanične smrti nastale uslijed oštećenja stanične membrane (Fotakis i Timbrell, 2006).

MTT test je kolorimetrijska metoda, test vijabilnosti stanica koji se najčešće koristi za određivanje citotoksičnosti potencijalnih toksičnih spojeva. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) je u vodi topljiva tetrazolijeva sol koju mitohondrijska sukcinat dehidrogenaza prevodi u netopljivi ljubičasti formazan. Stanična membrana je nepropusna za nastali formazan pa se on nakuplja u zdravim stanicama. Neutral red metoda također mjeri vijabilnost stanica, pri čemu žive stanice vežu neutral red reagens koji se koncentrira u lizosomima (Fotakis i Timbrell, 2006).

Primjenom više različitih metoda određivanja citotoksičnosti može se dobiti informacija i o mehanizmu toksičnosti, dok se korištenjem više različitih staničnih linija primjenom iste metode može potvrditi selektivnost djelovanja ispitivane tvari spram određenog tipa stanica. Prednost *in vitro* ispitivanja toksičnosti su manji troškovi, standardiziranost postupka, brzo se izvode, nastaje manje toksičnog otpada, u kratkom vremenu može se analizirati veliki broj uzoraka. Najveći nedostatak *in vitro* ispitivanja toksičnosti je moguća interakcija ispitivane tvari sa sastojcima medija za uzgoj stanica (Radojčić Redovniković i sur., 2016).

Osim toksičnosti, *in vitro* metodama primjenom kultura stanica može se ispitivati antitumorska i antioksidacijska aktivnost spojeva. Mnogi spojevi izolirani iz biljaka pokazuju *in vitro* antitumorsku aktivnost i predstavljaju potencijal za razvoj novih antitumorskih lijekova (Radojčić Redovniković i sur., 2016). Nacionalni institut za rak 1990. godine predložio je primjenu tzv. primarnog *in vitro* testa koji uključuje listu 60 najvažnijih humanih tumorskih staničnih linija za testiranje različitih tvari u definiranim rasponima koncentracija (Boyd i Paull, 1995). Takav pristup primjene *in vitro* testova omogućuje racionalniji odabir potencijalnih antitumorskih agenasa za nastavak *in vivo* ispitivanja sa ciljem razvoja novih lijekova za liječenje karcinoma.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Proteinski izolat i hidrolizati uljne pogače konoplje

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

Tijekom izrade rada korišten je proteinski izolat dobiven iz brašna pogače konoplje (IK) (koncentracije $4,42 \text{ mg mL}^{-1}$). Za tretiranje stanica dobiveni izolat je sterilno filtriran. Također su korišteni i proteinski hidrolizati uljne pogače konoplje dobiveni hidrolizom prethodno dobivenog izolata enzimima alkalazom (HKA) (koncentracija hidrolizata je $68,18 \text{ mg mL}^{-1}$), neutrazom (HKN) (koncentracija hidrolizata je $58,54 \text{ mg mL}^{-1}$) i protamexom (HKP) (koncentracija hidrolizata je $48,66 \text{ mg mL}^{-1}$).

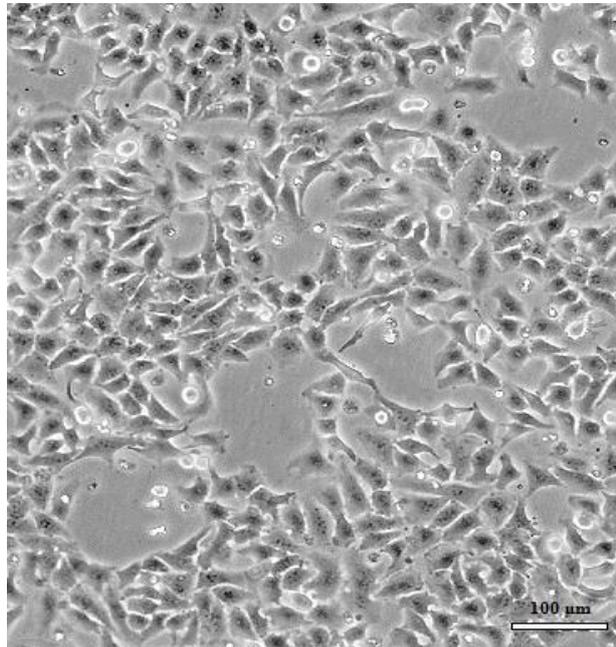
3.1.2. Humane stanične linije

Stanične linije HaCaT i HeLa nabavljene su iz radne banke stanica *American Type Culture Collection* (ATCC).

3.1.2.1. HeLa stanična linija

HeLa stanična linija je najpoznatija i najupotrebljivija stanična linija u znanstvenim istraživanjima. Prvi put je izolirana 1951. tijekom biopsije tumorskog tkiva vrata maternice pacijentice Henriette Lacks. Liječnik George O. Gey je bez znanja i pristanka pacijentice od izoliranog tkiva uspostavio staničnu liniju u laboratoriju koja je nazvana HeLa prema prvim slovima imena i prezimena pacijentice iz čijeg tkiva su stanice izolirane. HeLa stanice jako brzo rastu te u 24 sata mogu udvostručiti svoj broj. Osim toga, HeLa stanice su beskonačne (kontinuirane) što znači da se neprestano dijele i nemaju ograničen životni vijek. Također,

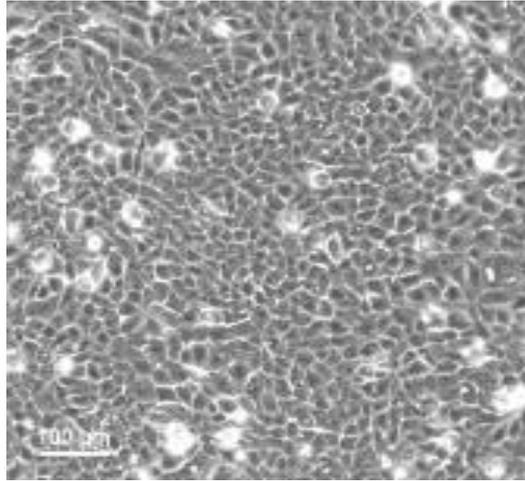
posjeduju i neke značajke netumorskih stanica poput mogućnosti eksprimiranja i reguliranja gena (Faussadier, 2017).



Slika 5. HeLa stanična linija (Cell biolabs, 2019)

3.1.2.2. HaCaT stanična linija

HaCaT stanična linija je prva spontano imortalizirana stanična linija odraslih humanih keratinocita. Radi se o netumorigeničnoj, monoklonalnoj staničnoj liniji adaptiranoj na rast bez dodanih faktora rasta i tzv. stanica hranilica koja pokazuje dobru diferencijaciju i proliferaciju *in vitro*. Također, HaCaT stanice formiraju slojevitú epidermalnu strukturu te mogu prelaziti iz diferenciranog u bazalno stanje u ovisnosti o koncentraciji Ca^{2+} iona. Nakon transplantacije *in vivo* sposobne su uspostaviti dobro strukturirani epidermis. Naziv stanične linije odražava uvjete rasta pri kojima je uspostavljena ta stanična linija te njeno porijeklo (eng. *Human Adult Low Calcium High Temperature*) (Colombo i sur., 2017).



Slika 6. HaCaT stanična linija (Anonymous 3, 2019)

3.1.3. Kemikalije

- 2'7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA), Sigma – Aldrich, St. Louis, SAD
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), Sigma – Aldrich, St. Louis, SAD
- CellTiter 96[®]AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay, Promega Corporation, Madison, SAD
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), Gibco BRL, SAD
- Muse[®] Annexin V & Dead Cell Kit, EMD Millipore Co., SAD
- Muse[®] System check Kit, EMD Millipore Co., SAD
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Tripan – plavo, Sigma – Aldrich, St. Louis, SAD
- Tripsin – EDTA, Sigma – Aldrich, St. Louis, SAD
- Vodikov peroksid, Gram – mol, Zagreb, RH

3.1.4. 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

3.1.5. Uređaji i oprema

- Čitač ploča, TECAN, Mannedorf, Švicarska
- Hladnjak (4°C i -20°C), Gorenje, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Iskra PIO, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Laboratorijski pribor (epruvete, kivete, laboratorijske čaše, menzure, nastavci za pipete, odmjerne tikvice, pipete, sterilni filter)
- Laboratorijska vaga, Boeco, Njemačka
- Muse analizator staničnog zdravlja (Muse[®]Cell Analyser), EMD Millipore Co., SAD
- Neubaerova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright – Line, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, Thermo Scientific Bio Lite, SAD
- Ploče s jažicama, Corning, SAD
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- T – boce od 25 cm² i 50 cm², Corning, SAD
- UV spektrofluorimetar, Varian Cary Eclipse, SAD

3.2. Metode rada

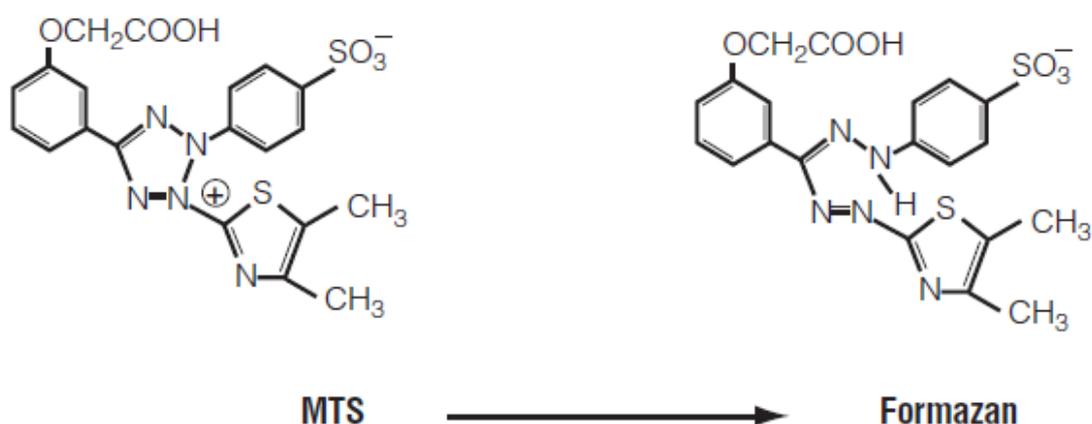
3.2.1. Uzgoj HeLa i HaCaT stanica u Petrijevim posudama

HeLa i HaCaT stanice čuvaju se u ampulama zamrznute na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u mediju za zamrzavanje, a prvi korak prilikom uzgoja je njihovo odmrzavanje u vodenoj kupelji koja je zagrijana na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Početna koncentracija stanica u ampulama je otprilike 1×10^7 stanica mL^{-1} . Odmrznuti sadržaj ampule prenosi se u sterilnu kivetu te se centrifugira 5 minuta pri $1000\text{ okretaja min}^{-1}$. Supernatant se odbacuje, a talog se resuspendira u 10 mL DMEM medija za uzgoj sa dodatkom $5 - 10\%$ FBS. Tako pripremljena suspenzija stanica u aseptičnim uvjetima prelije se u Petrijeve posude i inkubira u inkubatoru u kojem vladaju optimalni uvjeti za rast stanica: temperatura od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i atmosfera od 95% zraka i 5% CO_2 . Pri radu sa stanicama treba paziti da uvjeti cijelo vrijeme budu optimalni i aseptični kako bi se spriječio nastanak eventualnih kontaminacija. Svakodnevno je pomoću inverznog mikroskopa potrebno pratiti brojnost stanica, morfologiju i opće stanje stanica te prihvaćanje na površinu za rast ako se radi sa adherentnim stanicama. Ako je pokrivenost površine prešla približno 80% ukupne površine, stanice je potrebno precijepiti kako bi se izbjegla mogućnost pojave kontaktne inhibicije. Osim pokrivenosti površine, boja medija također pokazuje kada je vrijeme za promjenu medija, budući da medij za uzgoj stanica najčešće sadrži indikator fenol-crveno koji ukazuje na promjenu pH medija zbog potrošnje hranjivih tvari i nastanka produkata staničnog metabolizma te je medij potrebno zamijeniti svježim. Ako je došlo do nagle promjene boje medija u limun žutu boju, to je najčešće znak da je došlo do kontaminacije kulture bakterijama.

3.2.2. Ispitivanje utjecaja dodatka izolata i hidrolizata proteina iz uljne pogače konoplje na rast HeLa i HaCaT stanica kolorimetrijskom MTS metodom

MTS test je kolorimetrijska metoda praćenja broja živih stanica u citotoksičnim i proliferacijskim testovima u prisutnosti faktora rasta, mitogena i nutrijenata. Temelji se na MTT metodi koja je prvi put opisana 1983. kao brza i precizna kolorimetrijska metoda za praćenje stanične citotoksičnosti, proliferacije i aktivnosti stanica (Mosmann, 1983.). MTS testom se još mogu odrediti i protutijela koja djeluju inhibitorno na rast stanica te se mogu i analizirati citostatički spojevi. U metodi se koristi tetrazolijeva sol MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-

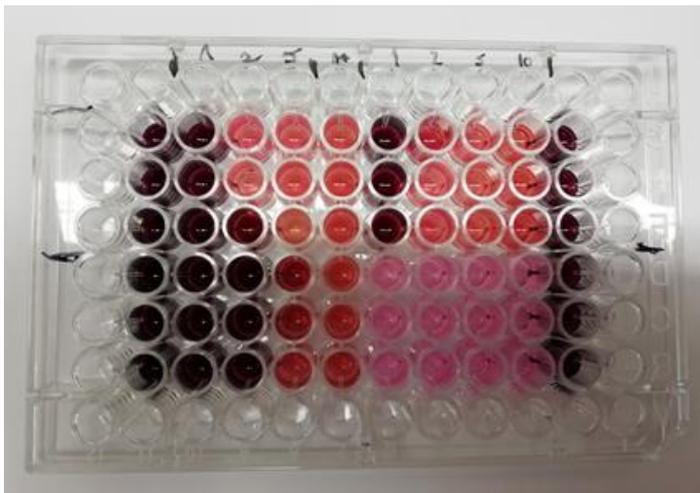
karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij] i intermedijarni akceptor elektrona PES (fenazinetosulfat) koji omogućava stabilizaciju otopine koja se formira u reakciji s MTS – om. MTS se u stanicama reducira u formazan (Slika 7.), obojeni produkt topiv u mediju za rast stanica. Samu redukciju provodi mitohondrijska dehidrogenaza prisutna u metabolički aktivnim stanicama (Berridge i Tan, 1993.). Prednost MTS metode prema klasičnoj MTT metodi je što je nastali formazan topiv u mediju, pa nije potreban korak otapanja kristala formazana u organskom otapalu. Intenzitet dobivenog obojenja izravno je proporcionalan broju živih stanica u uzorku, a mjeri se spektrofotometrijski.



Slika 7. Redukcija MTS u formazan (Promega, 2019)

U ploče sa 96 jažica nacijeppljene su HeLa i HaCaT stanice u koncentraciji 3×10^4 stanica mL^{-1} tako da je u svaku jažicu dodano po 100 μL suspenzije stanica. Inkubirane su 24 sata kako bi se nacijeppljene stanice prihvatile za dno jažica. Nakon tih 24 sata, stanice su tretirane u 4 paralele s HKA i HKP u koncentracijama 1, 2, 5, 10 mg mL^{-1} te HKN u koncentracijama 0,1, 0,2, 0,4, 1, 2, 5 i 10 mg mL^{-1} . Stanice su također tretirane i IK u koncentracijama 0,1, 0,2, 0,4, 1 i 2 mg mL^{-1} . 72 sata nakon tretiranja, u svaku jažicu dodano je 10 μL MTS te su stanice inkubirane 4 sata na 37°C u inkubatoru. Nakon inkubacije, intenzitet obojenja (Slika 8.) mjereno je spektrofotometrijski, očitavanjem apsorbancije pri 490 nm koristeći čitač ploča. Preživljenje stanica izraženo je kao postotak omjera apsorbancije tretiranih i kontrolnih (netretiranih) stanica prema izrazu:

$$\text{preživljenje stanica (\%)} = \frac{\text{srednja vrijednost } A_{490} \text{ uzorka}}{\text{srednja vrijednost } A_{490} \text{ kontrole}} \times 100 \quad (1)$$



Slika 8. Ploča s 96 jažica u kojima su nacijepnjene stanice, tretirane ispitivanim hidrolizatima te je nakon 72 sata proveden MTS test (vlastita fotografija)

3.2.3. Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta primjenom DCFH-DA metode

Reaktivne kisikove vrste određivane su DCFH-DA metodom. Princip metode bazira se na ulasku diacetatne forme 2'7'-diklorodihidrofluoroscein diacetata (DCFH-DA) u stanicu gdje ga nespecifične esterase hidroliziraju dajući DCFH koji zaostaje u stanici (Gomes i sur., 2005). Nastali DCFH unutar stanice eventualno prisutni intracelularni oksidansi oksidiraju u fluorescentni DCF čiji se intenzitet fluorescencije mjeri na spektrofлуорimetru pri $\lambda_{ex}=485$ nm i $\lambda_{em}=530$ nm.

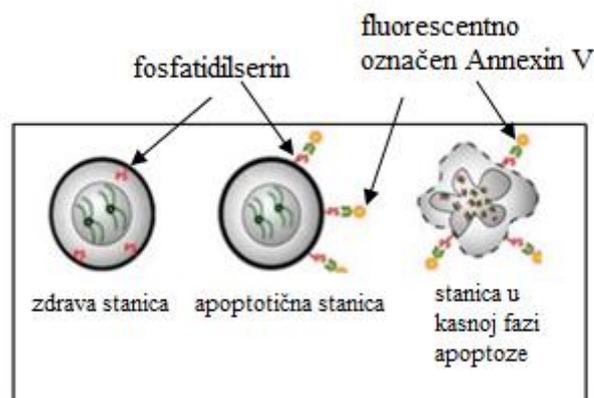
Po 100 μ L suspenzije stanica HeLa i HaCaT koncentracije 3×10^4 stanica mL^{-1} nacijepnjeno je u 96 jažica crne multiwell ploče. Nakon 24 sata stanice su tretirane u 4 paralele HKN i IK u koncentracijama 0,5, 1, 2 $mg mL^{-1}$ za koje se na temelju ORAC vrijednosti utvrdilo da posjeduju antioksidativnu aktivnost. Predinkubacija je trajala 24 sata te je nakon toga u stanicama potaknut oksidativni stres dodatkom 100 μ M vodikovog peroksida tijekom naredna 3 sata u inkubatoru na 37 °C. Potom je određena prisutnost ROS-ova u uzorcima primjenom DCFH-DA metode. Osim stanica koje su predinkubirane izolatom konoplje, odnosno hidrolizatom HKN, u pokusu smo imali i uzorak kontrolnih netretiranih stanica te stanica tretiranih samo sa 100 μ M H_2O_2 (pozitivna kontrola). Nakon završetka trosatne inkubacije, odnosno indukcije oksidativnog stresa u HaCaT stanicama, one su dva puta isprane PBS

puferom, a zatim je dodano po 100 μL pripremljene otopine DCFH-DA tako da njegova koncentraciji u jažici bude 50 μM . Nakon dodatka DCFH-DA ploča je inkubirana u inkubatoru na 37 °C kroz 30 min nakon čega je na spektrofluorimetru izmjerena fluorescencija pri $\lambda_{\text{ex}}=485\pm 10$ nm i $\lambda_{\text{em}}=530\pm 10$ nm

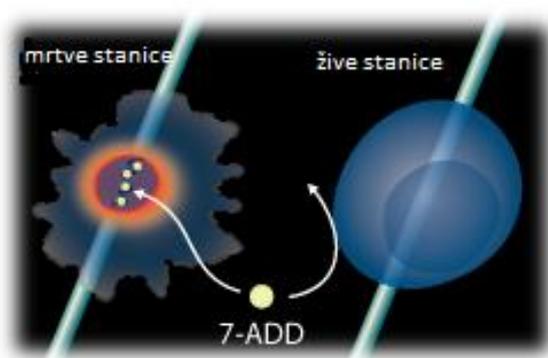
3.2.4. Određivanje tipa stanične smrti primjenom analizatora staničnog zdravlja Muse[®]

Tip stanične smrti u HeLa stanicama određivan je analizatorom staničnog zdravlja Muse[®] primjenom Muse[®] Annexin V & Dead Cell Kit-a. Princip metode se temelji na činjenici da se u zdravim stanicama fosfatidilserin (PS) nalazi s unutrašnje strane membrane, dok se u stanicama u kojima je potaknuta stanična smrt procesom apoptoze nalazi s vanjske strane membrane. Muse[®] Annexin V & Dead Cell reagens sadrži fluorescentno obilježen Annexin V i 7-aminoaktinomicin D (7-AAD). Protein annexin V specifično se veže na PS na vanjskoj membrani apoptotičnih stanica i tako ga obilježi kao rani marker apoptoze. 7-AAD je fluorescentni interkalator koji se uspješno izlučuje iz živih stanica pa se koristi kao marker za mrtve stanice te pokazuje integritet membrane zato što obilježava stanice sa oštećenom membranom. 7-AAD ne obilježava zdrave stanice niti one koje su rano apoptotične. Primjenom navedenog kita i analizatora staničnog zdravlja Muse[®] razlikuju se četiri populacije stanica u uzorku stanica:

- žive i zdrave stanice: annexin V (-) i 7-AAD (-)
- rano apoptotične stanice: annexin V (+) i 7-AAD (-)
- kasna faza apoptoze i mrtve stanice: annexin V(+) i 7-AAD (+)
- mrtve stanice i stanični ostaci: annexin V (-) i 7-AAD (+).



a)



b)

Slika 9. Obilježavanje zdravih i apoptotičnih stanica primjenom Muse® Annexin V & Dead Cell Kit-a: a) vezanje Anenexin V na PS (Anonymous, 2019) i b) ulazak 7-AAD u stanice s oštećenom membranom i mrtve stanice (Anonymous, 2019)

HeLa stanice nacijepnjene su na ploče s 12 jažica u koncentraciji 3×10^4 stanica mL^{-1} tako da je u svaku jažicu dodano po 0,5 mL suspenzije stanica. Nakon inkubacije od 24 sata, stanice su tretirane s HKA u koncentracijama $1\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$ i $10\mu\text{M}$. Nakon 72 sata tretmana, medij u kojem su stanice uzgajane je pokupljen i prebačen u epruveticu od 1,5 mL, a na stanice u jažicama je dodano $200\mu\text{L}$ tripsina kako bi se stanice odvojile od podloge. Odvojene stanice se pripoje sakupljenom mediju u kojem su stanice rasle te se centrifugira pri $300 \times g$ kroz 5 minuta. Supernatant se odlije, a talog se resuspendira u $300\mu\text{L}$ DMEM-a s 1% FBS-a tako da konačna koncentracija stanica po uzorku za analizu bude oko 1×10^5 stanica mL^{-1} . Reakcijsku smjesu čini $100\mu\text{L}$ tako pripremljene suspenzije stanica i $100\mu\text{L}$ μL Muse™ Annexin V &

Dead Cell reagens. Eppendorfica se zamota folijom i inkubira 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije vrši se analiza na Muse uređaju prema uputama i protokolu od strane proizvođača. Prije same analize uzoraka, provodi se ispiranje cijelog sustava, ispitivanje sustava sa Muse® System check Kit -om te postavljanje parametara analize s negativnom i pozitivnom kontrolom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) je široko rasprostranjena biljka koja se u 20. stoljeću počela koristiti u proizvodnji vlakana, hrane za životinje i papira. Tek nedavno je počelo njeno korištenje i u proizvodnji ljudske hrane i farmaceutika zbog odličnog nutritivnog sastava, posebno polinezasićenih esencijalnih masnih kiselina (preko 80%) u omjeru koji je savršeno izbalansiran za ljudski organizam. Štoviše, i proteini konoplje koji se uglavnom dobivaju iz uljne pogače konoplje sve se više istražuju zbog iznimnog biološkog potencijala. Naime, protein edestin je strukturno sličan globulinima iz seruma te se može metabolizirati u tijelu i sudjelovati u sintezi imunoglobulina, hormona, enzima i hemoglobina (Pojić i sur., 2015). Proteini se mogu i hidrolizirati čime se mogu se dobiti visoko vrijedni peptidi koji posjeduju antioksidativnu, antitumorsku, antimikrobnu, imunomodulatornu i osteoprotektivnu aktivnost (Chalamaiah i sur., 2018).

Biopeptidi su prirodni kemijski spojevi koji se izoliraju iz biljaka, a oni pridonose poboljšanju zdravlja čovjeka te se u tijelo unose hranom i oslobađaju se djelovanjem enzima te djeluju kao modulatori određenih fizioloških procesa (Hernandez – Ledesma i sur., 2007; Hadnađev i sur., 2018). Jedan od najzanimljivijih staničnih procesa, čiji se mehanizam dosta istražuje, je protektivni učinak u stanicama u kojima je induciran oksidativni stres koji se povezuje s mnogim kroničnim oboljenjima, ali i razvojem raka. U prevenciji oboljenja nastalih djelovanjem antioksidativnog stresa sudjeluju upravo biopeptidi iz hrane pa se zato istražuje njihov mehanizam djelovanja.

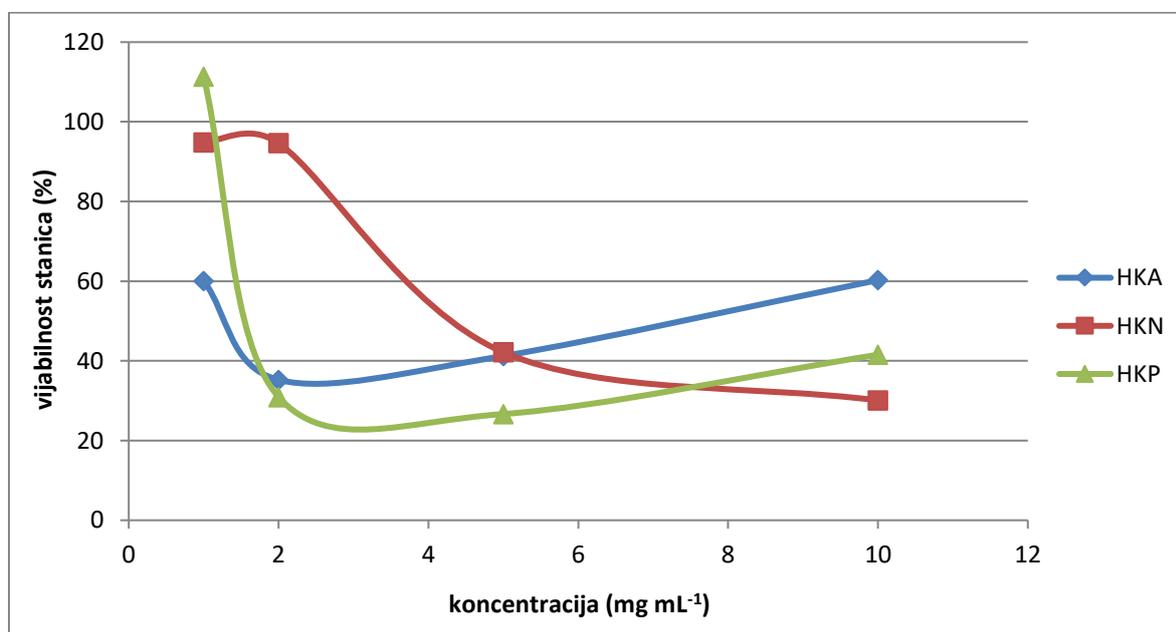
Osim protektivnog učinka, određeni proteinski hidrolizati konoplje iskazuju i citotoksični učinak na tumorske stanice. Dosta se istraživanja bazira na objašnjavanju mehanizma izazivanja apoptoze, posebnog oblika stanične smrti kojim organizam aktivira vlastitu smrt kao odgovor na patološka stanja i vanjske štetne utjecaje. Ukoliko apoptoza nije aktivirana ili je neispravno regulirana, može uslijediti razvoj bolesti poput tumora, autoimunih bolesti, AIDS, infarkt. Zato se istražuje mogućnost korištenja proteinskih hidrolizata u liječenju tih bolesti (Žlender, 2006).

S obzirom na dosadašnja istraživanja i saznanja, cilj ovoga rada bio je ispitati antiproliferativni učinak proteinskih hidrolizata konoplje na dvije stanične linije, tumorskoj HeLa i netumorskoj HaCaT. Dokazano je da aktivnost proteinskih hidrolizata ovisi o načinu provođenja hidrolize pa je zato ispitan učinak hidrolizata pripremljenih s tri različita enzima.

Na temelju rezultata *in vitro* ispitivanja antiproliferativne aktivnosti, izabran je hidrolizat kojem je ispitan protektivni učinak na HaCaT stanice u kojima je induciran oksidativni stres te hidrolizat kojem je ispitano inducira li staničnu smrt u tumorskim HeLa stanicama.

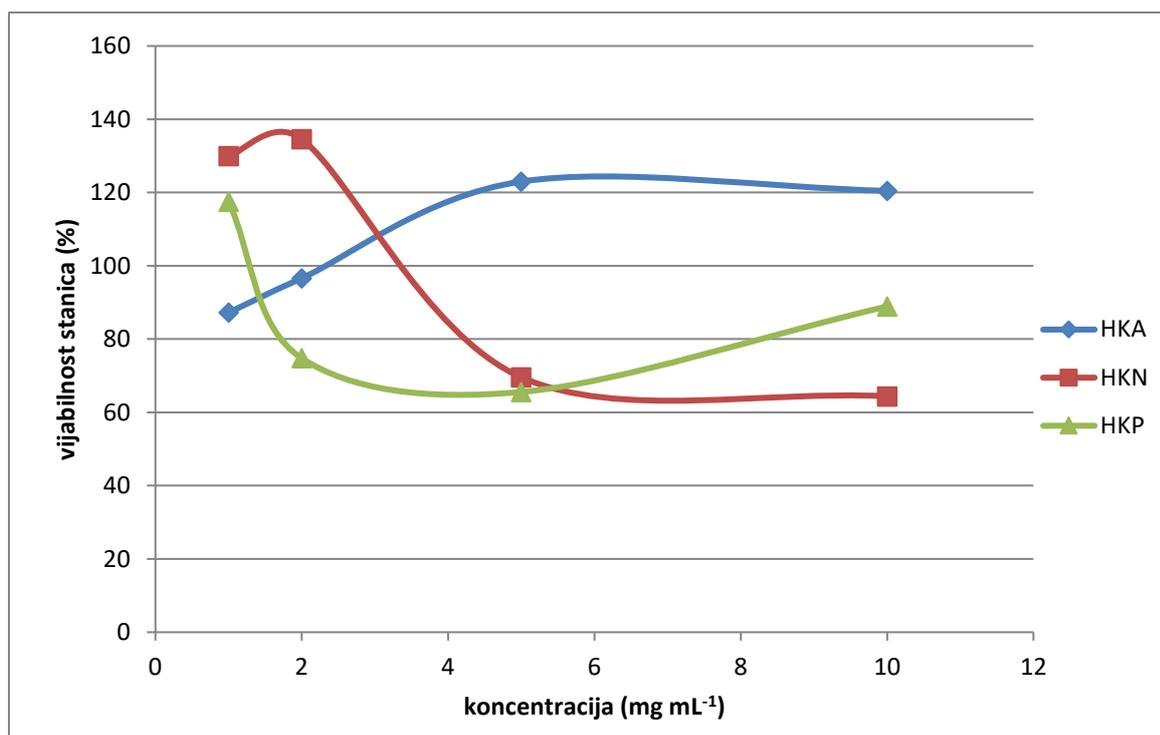
4.1. Utjecaj dodatka izolata i hidrolizata uljne pogače konoplje na rast HeLa i HaCaT stanica

Utjecaj dodatka proteinskog izolata uljne pogače konoplje i hidrolizata proteina uljne pogače konoplje dobivenih pomoću tri enzima (alkalaza, protamex i neutraza) na rast dviju staničnih linija HeLa i HaCaT ispitivan je *in vitro* MTS metodom. Stanice su uzgajane u plastičnim Petrijevim posudicama, a za potrebe eksperimenta nacijepljene su na ploče sa 96 jažica te su nakon 24 sata tretirane izolatom, odnosno hidrolizatima različitih koncentracija nakon čega su stanice ponovno inkubirane kroz 72 sata. Rezultati su prikazani grafički kao odnos vijabilnosti (%) tretiranih i kontrolnih, netretiranih stanica.



Slika 10. Utjecaj 72-satnog tretmana različitim koncentracijama hidrolizata uljne pogače konoplje pripremljenog enzimom alkalazom (HKA), neutrazom (HKN) i protamexom (HKP) na vijabilnost HeLa stanične linije, praćeno MTS metodom

Prema rezultatima prikazanima na Slici 10. HKA pokazuje inhibitorni učinak na rast HeLa stanica. Već pri najmanjoj koncentraciji HKA od 1 mg mL^{-1} vidljivo je kako djeluje najviše citotoksično jer je najmanji udio živih stanica u usporedbi sa HKP i HKN iste koncentracije. Porastom koncentracije smanjuje se udio živih stanica, pa je pri koncentraciji od 2 mg mL^{-1} samo 35,23 % živih stanica. Zanimljivo je kako se pri tretiranju koncentracijom HKA od 5 mg mL^{-1} povećao udio živih stanica za 6% što bi značilo da se pri većim koncentracijama smanjuje antiproliferativni učinak. Takav trend potvrđuje i rezultat dobiven na stanicama tretiranima s najvećom koncentracijom HKA od 10 mg mL^{-1} jer je udio živih stanica 60,26% što je otprilike jednako preživljenje kao i pri najmanjoj koncentraciji. HKN također pokazuje antiproliferativni učinak, i to ovisan o koncentraciji hidrolizata. Što je koncentracija HKN veća, to je jači učinak na HeLa stanice. Naime, pri manjoj koncentraciji HKN od 1 mg mL^{-1} i 2 mg mL^{-1} kojima su tretirane, stanice su još uvijek uglavnom žive (94,83% i 94,63%). Nagli pad u preživljenju stanica ostvario se tretiranjem HeLa stanica s HKN pri koncentraciji od 5 mg mL^{-1} gdje je tek 42,16% živih stanica. HKP pri koncentraciji od 1 mg mL^{-1} potiče proliferaciju HeLa stanica jer je udio živih stanica porastao u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak i iznosi 111,36%. Nagli pad u preživljenju stanica vidljiv je već pri tretmanu sa koncentracijom HKP od 2 mg mL^{-1} gdje je udio živih stanica samo 30,92%. Tek se pri tretmanu stanica s HKP koncentracije 10 mg mL^{-1} povećalo preživljenje stanica pa iznosi 41,54%.

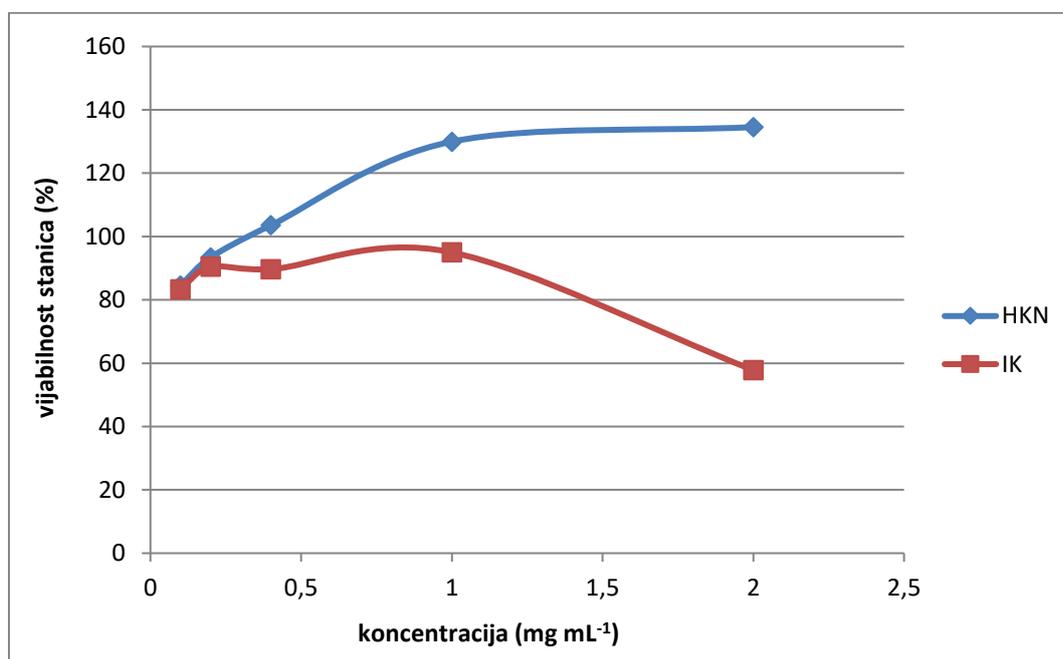


Slika 11. Utjecaj 72-satnog tretmana različitim koncentracijama hidrolizata uljne pogače konoplje pripremljenog enzimom alkalazom (HKA), neutrazom (HKN) i protamexom (HKP) na vijabilnost HaCaT stanične linije, praćeno MTS metodom

Prema rezultatima prikazanim na Slici 11. HKA djeluje antiproliferativno na HaCaT staničnu liniju u manjim koncentracijama (1 mg mL⁻¹ i 2 mg mL⁻¹), a s rastom koncentracije potiče rast pa je postotak preživljenja pri koncentraciji hidrolizata od 10 mg mL⁻¹ čak 120,45%. HKP djelomično djeluje antiproliferativno zato što tretmanom s koncentracijama hidrolizata od 2 mg mL⁻¹ i 5 mg mL⁻¹ smanjuje preživljenje HaCaT stanica (74,76% i 65,57%) dok pri koncentraciji od 10 mg mL⁻¹ raste preživljenje (88,82%). Također, stanicama koje su tretirane s HKP koncentracije 1 mg mL⁻¹ potaknuta je proliferacija pa je zato i više živih stanica nego u kontrolnom uzorku, čak 117,52%. HKN pri niskim koncentracijama od 1 mg mL⁻¹ i 2 mg mL⁻¹ pokazuje proliferativni učinak zato što se udio živih stanica znatno povećao u odnosu na kontrolni uzorak i iznosi 129,96% i 134,56%. Porastom koncentracije drastično se smanjuje vijabilnost pa je pri koncentraciji od 10 mg mL⁻¹ preživljenje 64,39%. Slično kao i kod HeLa stanica, HKN pokazuje i kod HaCaT stanica odnos doza – učinak jer se povećanjem koncentracije smanje udio živih stanica. Za HaCaT staničnu liniju specifično je da hidrolizati pri nekim od ispitivanih koncentracija iskazuju proliferativni, a pri nekim koncentracijama

antiproliferativni učinak. Najbolji proliferativni učinak na HaCaT staničnu liniju pokazao je HKN pri koncentracijama od 1 mg mL^{-1} i 2 mg mL^{-1} .

Budući nas je zanimalo mogu li pripremljeni hidrolizati zaštititi stanice od oksidativnog stresa, ispitano je djelovanje HKN, kojemu je izmjeren najveći antioksidacijski kapacitet, upravo pri tim manjim koncentracijama koje nisu negativno djelovale na rast stanica. Također, radi usporedbe s početnim materijalom za pripravu hidrolizata, ispitan je i učinak izolata konoplje na HaCaT stanice.



Slika 12. Utjecaj 72-satnog tretmana izolatom konoplje (IK) i hidrolizatom uljne pogače konoplje pripremljenog enzimom neutrazom (HKN) na vijabilnost HaCaT stanične linije, praćeno MTS metodom

Na Slici 12. prikazana je usporedba utjecaja različitih koncentracija IK i HKN na normalnu HaCaT staničnu liniju u koncentracijama $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ do 2 mg mL^{-1} . Ispitan je učinak koncentracija manjih od 2 mg mL^{-1} zato jer je proliferativni učinak zabilježen pri nižim koncentracijama hidrolizata, kao što je vidljivo na Slici 11. Pri koncentracijama $< 2 \text{ mg mL}^{-1}$ HKN ima bolji proliferativni učinak na tretirane HaCaT stanice u odnosu na IK. Također, vidljiv je odnos doza – učinak jer se povećanjem koncentracije HKN kojima su stanice tretirane povećava udio živih stanica. Čak dodatak male koncentracije HKN od $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ dovoljan je

da potakne rast stanica pa tako udio živih stanica iznosi 103,57%. IK je pokazao slabi antiproliferativni učinak pri nižim koncentracijama, dok je pri koncentraciji od 2 mg mL⁻¹ znatnije inhibirao rast stanica pa je udio živih stanica 57,82%.

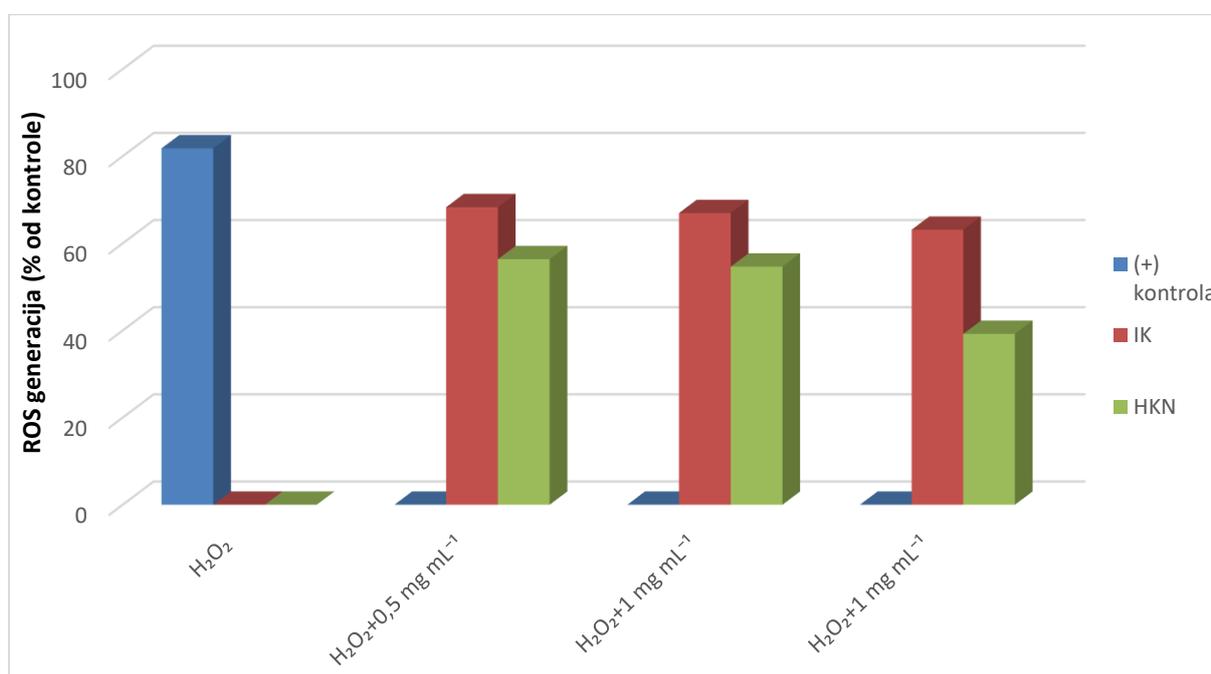
Iz rezultata prikazanih na Slici 10. vidljivo je da najjači antiproliferativni učinak na HeLa staničnu liniju pokazuje HKA što znači da je od ispitivanih hidrolizata on najviše citotoksičan. Stoga bi se moglo pretpostaviti antitumorsko djelovanje HKA, odnosno taj hidrolizat bi vrijedilo nadalje istraživati u smislu terapijskog djelovanja na rak grlića maternice zbog dokazane antiproliferativne aktivnosti prema HeLa stanicama. Stoga je u ovom radu istražen mehanizam kojim HKA inhibira rast tumorskih stanica.

4.2. Zaštitni učinak izolata i hidrolizata uljne pogače konoplje na HaCaT stanice u kojima je induciran oksidativni stres

Jedna od prirodnih pojava koja se javlja u aerobnom staničnom metabolizmu je stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (eng. Reactive Oxygen Species, ROS). Organizmi koji stvaraju ROS – ove održavaju ih u ravnoteži pomoću mehanizama i enzima koji ih uklanjaju. U slučaju narušavanja ravnoteže, dolazi do nakupljanja ROS vrsta te nastaje oksidativni stres. Oksidativni stres povezuje se s mnogim kroničnim oboljenjima, ali i razvojem raka zbog sudjelovanja u procesima proliferacije stanica, inhibicije apoptoze, metastaziranja i angiogeneze. U prevenciji oboljenja nastalih djelovanjem antioksidativnog stresa sudjeluju antioksidansi. Upravo zato se antioksidacijska aktivnost mnogih proteina iz hrane zadnjih godina sve se više ispituje zbog pozitivnih učinaka na zdravlje ljudi (Bagović, 2018).

Stoga je u ovome radu ispitan zaštitni učinak izolata i hidrolizata uljne pogače konoplje dobiven enzimom neutrazom na inducirani oksidativni stres u HaCaT stanicama. HKN je imao najvišu ORAC vrijednost, približno 700 μM TE g⁻¹ proteina (Logarušić i sur., 2019) te ima najveći antioksidativni kapacitet. Za ispitivanje zaštitnog djelovanja na nastanak unutarstaničnih ROS-ova korištene su koncentracije HKN od 0,5 mg mL⁻¹, 1 mg mL⁻¹ i 2 mg mL⁻¹ zato što pri tim koncentracijama nije bilo negativnog učinka na rast HaCaT stanica, dapače zabilježeno je proliferativno djelovanje (Slika 12.). Antioksidativna aktivnost određivana je DCF metodom primjenom čitača ploča. U stanicu ulazi DCFH-DA kojeg esterase hidroliziraju u DCFH. On zaostaje u stanici te ga aktivni unutarstanični ROS oksidiraju u fluorescentni DCF

čiji se intenzitet fluorescencije mjeri spektrofotometrijski. U stanicama koje stvaraju više unutarstaničnih ROS – ova očekuje se veći intenzitet fluorescencije, pa se najveća fluorescencija očekuje u stanicama kojima je dodan samo H_2O_2 kako bi inducirao oksidativni stres (+ kontrola), dok bi ta vrijednost očekivano trebala biti niža u stanicama predtretiranim hidrolizatom koji posjeduje određeni antioksidacijski kapacitet. Rezultati analize prikazani su na Slici 13. kao postotak omjera intenziteta fluorescencije tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolne stanice, koje nisu predtretirane hidrolizatom i u kojima nije induciran oksidativni stres.



Slika 13. Učinak 24-satnog predtretmana različitim koncentracijama izolata (IK) i hidrolizata uljne pogače konoplje pripremljenog enzimom neutrazom (HKN) na nastajanje unutarstaničnog ROS – a u HaCaT stanicama pri tretmanu s H_2O_2 , praćeno DCF metodom

Kao što je prikazano na Slici 13. predtretman HKN je smanjio stvaranje unutarstaničnih ROS-ova već pri koncentraciji od $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ s obzirom na smanjenje od 25,4% u odnosu na (+) kontrolu, stanice u kojima je dodan H_2O_2 , ali nisu predtretirane s HKN. Najveći protektivni učinak postignut je u stanicama tretiranim HKN koncentracije 2 mg mL^{-1} gdje je zbog predtretmana nastalo znatno manje ROS-ova. U usporedbi sa stanicama (+) kontrole u kojima je induciran oksidativni stres, ali koje nisu tretirane hidrolizatom, čak je 42,6% manje nastalih

ROS – ova. Time je potvrđena pretpostavka dobivena na temelju ORAC vrijednosti da HKN posjeduje antioksidativnu aktivnost i da može zaštititi stanice od oksidativnog stresa. IK pokazao je slabiji protektivni učinak od HKN, što je u skladu s izmjerenim ORAC vrijednostima izolata i hidrolizata. Naime, prema ORAC vrijednostima IK ima oko 14 puta niži antioksidacijski potencijal od HKN (Logarušić i sur., 2019).

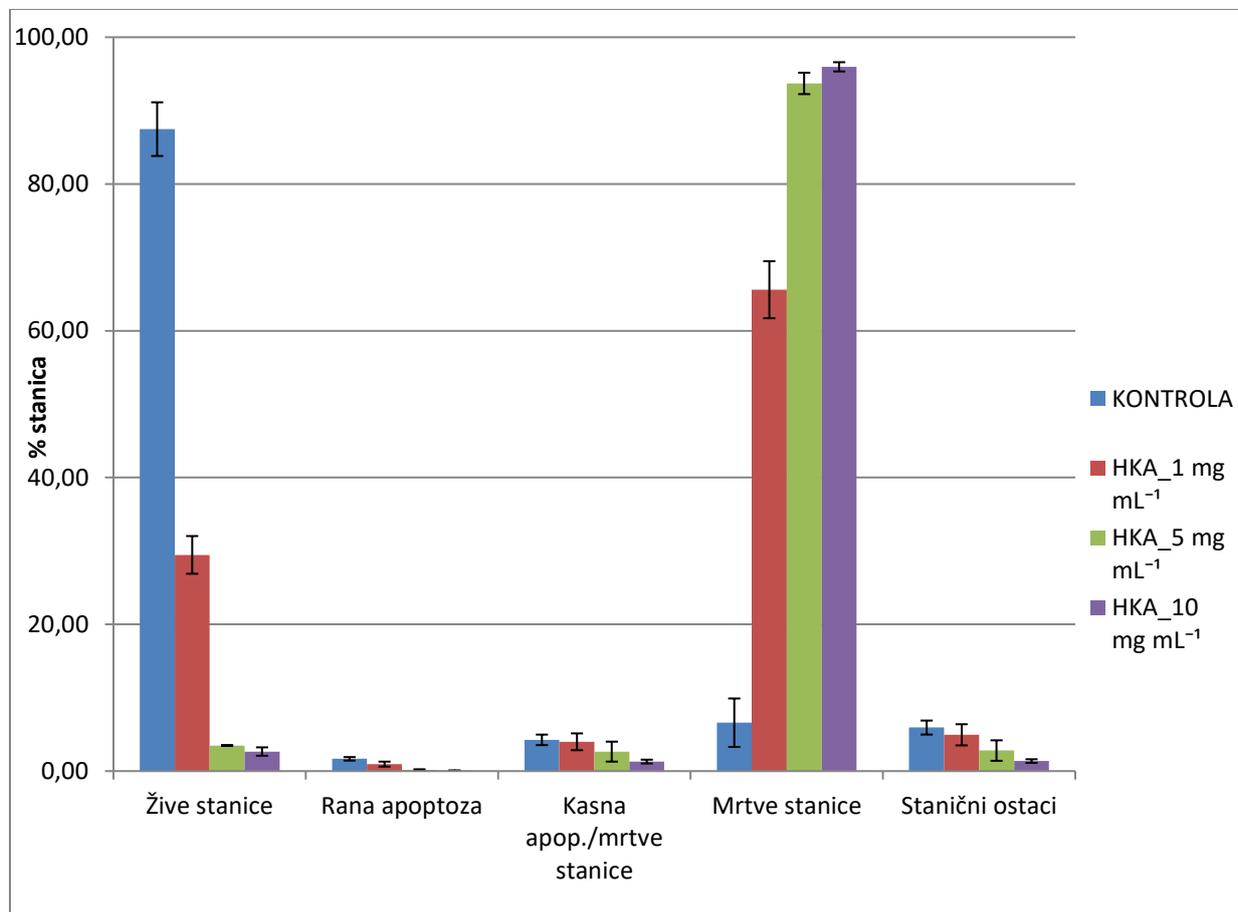
Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima prethodno objavljenih studija (Lee i sur., 2010; Hadnađev i sur., 2018) u kojima je navedeno da proteinski hidrolizati konoplje posjeduju antioksidativnu aktivnost. Dobiveni rezultati ukazuju na to da bi se hidrolizat uljne pogače konoplje mogao koristiti u zaštiti zdravih stanica od antioksidacijskog stresa i time eventualno spriječiti razvoj bolesti povezanih s oksidativnim stresom.

4.3. Učinak hidrolizata uljne pogače konoplje na indukciju stanične smrti u HeLa stanicama

Apoptoza je poseban oblik stanične smrti kojim organizam održava ravnotežu između gubitka i stvaranja stanica tijekom života, odnosno održava staničnu homeostazu. Radi se o programiranoj staničnoj smrti, mehanizmu kojim se uz utrošak energije i aktivaciju gena potrebnih za sintezu proteina aktivira vlastita smrt kao odgovor na patološka stanja i vanjske štetne utjecaje. Aktivatori programirane stanične smrti uništavaju esencijalne strukture što rezultira smežuravanjem stanice, kondenzacijom kromatina, cijepanjem DNA, pupanjem dijelova stanične membrane i formiranjem apoptotskih tjelešaca koja fagocitiraju susjedne stanice, a ne izazivaju upalni proces. Poremećaji u apoptozi vežu se uz neke bolesti poput tumora, autoimunih bolesti (reumatoidni artritis), degenerativnih procesa (Alzheimerova bolest), AIDS, infarkt, anomalije tkiva. Upravo zato pravilna regulacija i aktivacija apoptoze može pomoći u sprječavanju razvoja i liječenju navedenih bolesti (Žlender, 2006).

U ovom radu ispitivan je učinak hidrolizata uljne pogače konoplje dobiven enzimom alkalazom na indukciju stanične smrti tumorskih HeLa stanica budući da je upravo taj hidrolizat prema rezultatima prikazanim na Slici 10. pokazivao najjaču antiproliferacijsku aktivnost, tj. iskazivao najveću citotoksičnost. Stoga je u tretiranim HeLa stanicama određen tip stanične smrti primjenom mini protočnog citometra tj. analizatorom staničnog zdravlja Muse®.

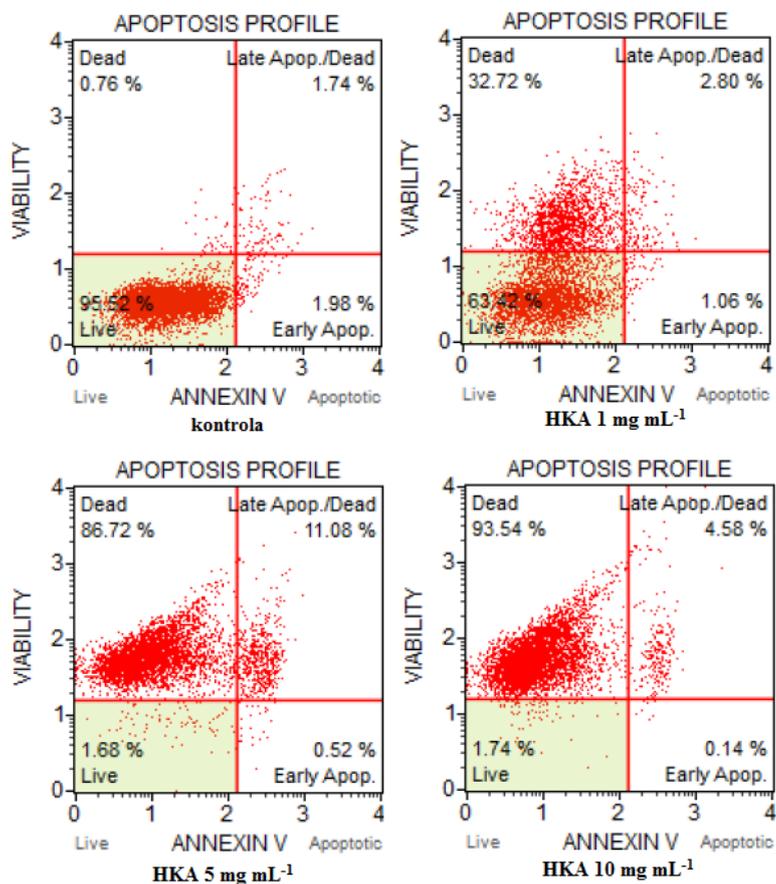
Primjenom kita za određivanje stanične smrti razlikuju se četiri populacije stanica: žive i zdrave stanice, rano apoptotične stanice, kasnoapoptotične stanice te mrtve stanice i stanični ostaci.



Slika 14. Učinak 72-satnog tretmana različitim koncentracijama hidrolizata uljne pogače konoplje pripravljenog enzimom alkalazom (HKA) na induciranje stanične smrti u HeLa stanicama

Iz rezultata prikazanih na Slici 14. jasno se vidi kako HKA inducira staničnu smrt. U usporedbi sa kontrolnim HeLa stanicama koje nisu tretirane hidrolizatom, čak i najmanja koncentracija HKA inducirala je staničnu smrt. Pri koncentraciji HKA od 1 mg mL⁻¹ udio živih stanica je 29,46% dok je udio mrtvih stanica 65,59%. Također, vidljiv je odnos doza – učinak jer je povećanjem koncentracije HKA, kojim su tretirane stanice, sve više izražena razlika u udjelu živih i mrtvih stanica, odnosno raste postotak mrtvih stanica. Pri koncentraciji HKA od 5 mg mL⁻¹ udio živih stanica je 3,49%, dok je udio mrtvih stanica čak 93,71%, dok su kod

stanica tretiranih najvećom koncentracijom HKA od 10 mg mL^{-1} skoro sve stanice mrtve, njih čak 95,57%, a svega 2,67% ih je preostalo živo.



Slika 15. Reprezentativni histogrami provedenog Muse® Annexin V & Dead Cell testa nakon 72-satnog tretmana HeLa stanica s različitim koncentracijama hidrolizata uljne pogače konoplje pripremljenog enzimom alkalazom (HKA).

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti HKA inducira staničnu smrt i to procesom nekroze. U istraživanju Lu i sur. (2010) dodatak HKA inducirao je apoptozu, također u ovisnosti o dozi.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih eksperimenata i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Ispitivanjem utjecaja izolata i hidrolizata uljne pogače konoplje dokazan je antiproliferativni učinak na tumorsku staničnu liniju HeLa i netumorsku staničnu liniju HaCaT, ovisan o vrsti i koncentraciji hidrolizata. HeLa stanice su osjetljivije na učinak hidrolizata. Najjači antiproliferativni učinak imao je hidrolizat dobiven pomoću enzima alkalaze.
2. Hidrolizati konoplje pokazuju i proliferativni učinak na normalnu HaCaT staničnu liniju, pri čemu najizraženije pozitivno djelovanje na rast stanica ima hidrolizat dobiven pomoću enzima neutraze.
3. Dokazan je zaštitni, antioksidativni učinak HKN na HaCaT stanice u kojima je induciran oksidativni stres dodatkom vodikovog peroksida.
4. Citotoksičnost HKA za tumorske HeLa stanice rezultira indukcijom stanične smrti nekrozom.

6. LITERATURA

Anonymous 1 (2019): <<https://www.bulkhempwarehouse.com/organic-usa-hemp-seed-cake-50lb/>>. Pristupljeno 23. srpnja 2019

Anonymous 2 (2019): <<https://www.etsy.com/no-en/listing/238660504/vintage-cannabis-sativa-print-botanical>>.

Anonymous 3 (2019): <https://clsgmbh.de/p800_HaCaT.html>. Pristupljeno 22. srpnja 2019.

Bagović, M. (2018) In vitro biološka svojstva hidrolizata proteina iz pogače konoplje. Diplomski rad, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska.

Berridge, M., Tan, A. (1993) Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 474-482.

Boyd M.R., Paull K.D. (1995) Some Practical Considerations and Applications of the National Cancer Institute in Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. *Drug Develop. Res.* **34**, 91-109.

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

Cell biolabs, inc. <<https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/AKR-213-gfp-hela-cell-line.pdf>> Pristupljeno 28. srpnja 2019.

Chalamaiah, M., Yu, W., Wu, J. (2018) Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chem.* **245**, 205-222.

Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., Fumagalli, M., Carlino, C., Corsetto, P., Scaccabarozzi, D., Calvieri, S., Gismondi, A., Taramelli, D., Dell'Agli, M. (2017) HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediat. Inflamm.* **2017**, 1-12.

Dong, W., Simeonova, P. P., Gallucci, R., Matheson, J., Flood, L., Wang, S., Hubbs, A., Luster, M. I. (1998) Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharm.* **151**, 359-366.

- Dubreta, N. (2006) Konoplja – sociološki aspekti uzgoja i upotrebe. *Soc. Ekol. Zagreb* **15**, 103-123.
- Faussadier, X. (2017) Faussadier Xavier <<https://www.tebu-bio.com/blog/2017/11/28/hela-cells-the-first-cell-line/>>. Pristupljeno 23. srpnja 2019.
- Fotakis, G., Timbrell, J. A. (2006) In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* **160**, 171-177.
- Fukumoto, M., Kujiraoka, T., Hara, M., Shibasaki, T., Hosoya, T., Yoshida, M. (2001) Effect of cadmium on gap junctional intercellular communication in primary cultures of rat renal proximal tubular cells. *Life Sci.* **69**, 247-254.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C. (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Bioph. Meth.* **65**, 45-80.
- Hadnađev, M., Dizdar, M., Hadnađev-Dapčević, T., Jovanov, P., Mišan, A., Sakač, M. (2018) Hydrolyzed hemp seed proteins as bioactive peptides. *Journal on Processing and Energy in Agriculture* **22**, 90-94.
- Hernandez-Ledesma, B., Quiros, A., Amigo, L., Recio, I. (2007) Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *Int. Dairy J.* **17**, 42-49.
- Isinguzo, G. (2011) Physicochemical, functional and in vitro bioactive properties of hempseed (*Cannabis sativa*) protein isolates and hydrolysates. Master thesis, Faculty of Graduate Studies of the University of Manitoba
- Logarušić, M., Slivac, I., Radošević, K., Bagović, M., Radojčić Redovniković I., Gaurina Srček, V. (2019) Hempseed protein hydrolysates' effects on the proliferation and induced oxidative stress in normal and cancer cell lines. *Molecular Biology Reports* **46**, 6079-6085.
- Lu, R., Qian, P., Sun, Z., Zhou X., Chen T. P., He, J. F., Zhang, H., Wu, Jianping (2010) Hempseed protein derived antioxidative peptides: Purification, identification and protection from hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Food Chem.* **123**, 1210-1218.

Montserrat-de la Paz, S., Marín-Aguilar, F., García-Gimenez, M. D., Fernández-Arche, M. A. (2014) Hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil: analytical and phytochemical characterization of the unsaponifiable fraction. *J. Agr. Food Chem.* **62**, 1105-1110.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.

National Centre for Biotechnology education (NCBE) <<http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/neutrased.html>>. Pristupljeno 23. srpnja 2019.

Pojić, M., Dapčević Hadnađev, T., Hadnađev, M., Rakita, S., Brlek, T. (2015) Hemp Seed Cake in Bread Making. *J. Food. Qual.* **38**, 431-440

Pravilnik o uvjetima za uzgoj konoplje, načinu prijave uzgoja maka te uvjetima za posjedovanje opojnih droga u veterinarstvu (2012) *Narodne novine* **505**, Zagreb

Promega.com (2019):<<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol.pdf>>.

Pristupljeno 22. srpnja 2019.

Radojčić Redovniković, I., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2016) Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Hrvat. Čas. Prehrambenu Tehnol. Biotehnol. Nutr.* **11**, 169-175.

Ramachandran, S., Singh, S. K., Larroche, C., Soccol, C. R., Pandey, A. (2007) Oil cakes and their biotechnological applications – A review. *Bioresource Technol.* **98**, 2000-2009.

Sivaramakrishnan S., Gangadharan D. (2009) Edible Oil Cakes. U: *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, (Singh nee' Nigam P., Pandey A., ured.), Springer, Dordrecht

Slivac, I., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2016) Osnove tehnologije životinjskih stanica. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V., Peričin, D. (2011). Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chem.* **124**, 1316–1321.

Wang i sur. (2019) Cryoprotective Effects of Protein Hydrolysates Prepared from By-Products of Silver Carp (*Hypophthalmichthys Molitrix*) on Freeze-Thawed Surimi. *Appl. Sci.* **9**, 563.

Zhao, Y., Wang, Y., Wang, H., Wu, Y., Makkar, H. P., Liu, J. (2018) Nutritional value of detoxified *Jatropha curcas* seed cake protein isolates using rats as an animal model. *Anim. Nutr.* **4**, 429-434.

Žlender, V. (2006). Detekcija apoptoze. *Arh. Hig. rada Toksikol.* **57**, 229-236.