

# Biološki učinak proteinskih hidrolizata iz pogače konoplje na tumorsku staničnu liniju MCF-7

---

Kosanović, Jelena

Undergraduate thesis / Završni 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:159:331045>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Jelena Kosanović**

6957/BT

**BIOLOŠKI UČINAK PROTEINSKIH HIDROLIZATA IZ POGAČE  
KONOPLJE NA TUMORSKU STANIČNU LINIJU MCF-7**

**ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:** HRZZ IP-2016-06-3848

Primjena proteinskih hidrolizata iz pogača lana i konoplje u medijima za uzgoj životinjskih stanica

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

**Zagreb, 2018.**

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Biološki učinak proteinskih hidrolizata iz pogače konoplje na tumorsku staničnu liniju MCF-7**

*Jelena Kosanović, 0058205266*

**Sažetak:** Bioaktivni peptidi posjeduju širok raspon bioloških svojstava koja mogu utjecati na poboljšanje ljudskog zdravlja. Zbog toga se smatraju novom generacijom biološki aktivnih regulatora, koji pronalaze potencijalnu primjenu kao sastojci nutraceutika, te farmaceutika. Cilj ovog rada bio je ispitati učinak proteinskog hidrolizata konoplje, kao i njegove frakcije <3 kDa, na rast i proliferaciju tumorske stanične linije MCF-7. Stanice su tretirane različitim koncentracijama proteinskih hidrolizata konoplje (1, 2 i 5 mg/mL), nakon čega je određena vijabilnost stanica (MTS). Rezultati su pokazali da proteinski hidrolizat konoplje, pri koncentracijama 2 i 5 mg/mL, ima inhibitorni učinak na preživljenje stanica i to u rasponu od 53,96% do 62,17%. S druge strane, frakcija proteinskog hidrolizata konoplje <3 kDa je pri maksimalnoj ispitivanoj koncentraciji (5 mg/mL) djelovala blago stimulatивно (10,07%) na preživljenje stanica, dok pri nižim koncentracijama nije zapažen nikakav učinak. Za dobivanje kompletne slike o djelovanju proteinskih hidrolizata konoplje i njihovih frakcija, potrebno je provesti dodatna istraživanja, kako na MCF-7 stanicama, tako i na drugim staničnim linijama.

**Ključne riječi:** bioaktivni peptidi, proteinski hidrolizati konoplje, MCF-7 stanična linija, vijabilnost

**Rad sadrži:** 33 stranice, 3 slike, 1 tablicu, 29 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:** Marijan Logarušić, mag. ing.

**Datum obrane:** 19. rujan 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

**Department of Bioengineering**  
**Laboratory for Cell Technology and Biotransformation**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

**The biological effect of hemp seed protein hydrolysates on MCF-7 tumor cell line**

*Jelena Kosanović, 0058205266*

**Abstract:** Bioactive peptides have a wide range of biological properties that may affect the improvement of human health. Therefore, they are considered the new generation of biologically active regulators that find their potential use as nutraceuticals and pharmaceuticals ingredients. The aim of this study was to examine the effect of hemp seed protein hydrolysate as well as its peptide fraction <3 kDa on growth and proliferation of the tumor cell line MCF-7. MCF-7 cells were treated with different concentrations of hemp seed protein hydrolysates (1, 2 and 5 mg/mL), and then cell viability was determined (MTS). The results showed that hemp seed protein hydrolysate of 2 and 5 mg/mL had an inhibitory effect on cell viability (53,96% to 62,17%). On the other hand, hemp seed protein hydrolysate fraction <3 kDa has shown slight stimulatory effect (10,07%) on cell viability at maximal examined concentration (5 mg/mL), while at lower concentrations no effect was shown. To obtain a wider picture of the action of hemp seed protein hydrolysates and their fractions, further research is needed, both on MCF-7 cells and other cell lines.

**Keywords:** bioactive peptides, hemp seed protein hydrolysates, MCF-7 cell line, viability

**Thesis contains:** 33 pages, 3 figures, 1 table, 29 references

**Original in:** Croatian

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

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

**Technical support and assistance:** Marijan Logarušić, M.Eng.

**Defence date:** September 19<sup>th</sup> 2018

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA.....	2
2.1.1. Medij za uzgoj životinjskih stanica.....	3
2.1.1.1. Serum .....	6
2.1.2. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica.....	7
2.2. BIOAKTIVNI PEPTIDI.....	9
2.2.1. Enzimska hidroliza proteina .....	10
2.2.2. Konoplja ( <i>Cannabis sativa L.</i> ) i njen utjecaj na ljudsko zdravlje.....	10
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	13
3.1. MATERIJALI .....	13
3.1.1. Kemikalije.....	13
3.1.2. Otopine i puferi .....	13
3.1.3. Uređaji i oprema .....	14
3.1.4. MCF-7 stanična linija.....	14
3.1.5. Proteinski hidrolizati konoplje .....	15
3.2. METODE RADA.....	15
3.2.1. Uzgoj tumorske stanične linije MCF-7 .....	15
3.2.2. Određivanje krivulje rasta tumorske stanične linije MCF-7 .....	16
3.2.2.1. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo .....	16
3.2.2.2. Određivanje koncentracije glukoze u mediju GOD-PAP metodom.....	17
3.2.2.3. Izračunavanje parametara rasta MCF-7 stanica .....	18
3.2.3. Ispitivanje biološke aktivnosti proteinskih hidrolizata konoplje na staničnoj liniji MCF-7.....	19
3.2.3.1. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-ju .....	20
3.2.3.2. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom .....	20

<b>4. REZULTATI</b> .....	22
4.1. Krivulja rasta i utrošak glukoze tijekom uzgoja stanične linije MCF-7 .....	22
4.2. Učinak proteinskih hidrolizata konoplje na proliferaciju tumorske stanične linije MCF-7 .....	24
<b>5. RASPRAVA</b> .....	26
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	30
<b>7. LITERATURA</b> .....	31

## 1. UVOD

Konoplja (*Cannabis sativa L.*) je biljka koja se još u antičko doba koristila kao izvor hrane i vlakana te za medicinske svrhe. Sjeme konoplje pravo je nutritivno "blago" te je dokazano da mnogi prirodni spojevi sjemena konoplje pozitivno utječu na ljudsko zdravlje. Međutim, iako sadrži visokokvalitetne proteine, još uvijek se smatra nedovoljno iskorištenim proteinskim izvorom.

Proteini iz hrane ne služe samo kao izvori hranjivih tvari, već imaju i fiziološku ulogu u organizmu koja utječe na poboljšanje ljudskog zdravlja. Većina fizioloških aktivnosti proteina pripisuje se tzv. bioaktivnim peptidima. Bioaktivni peptidi su peptidne sekvence, koje se nalaze u latentnom obliku unutar primarne strukture proteina, a oslobađanjem (enzimskom proteolizom ili tijekom prerade hrane) iz izvornog proteina postaju aktivni i utječu na mnoge fiziološke procese unutar organizma, što u konačnici može dovesti do poboljšanja ljudskog zdravlja. Tijekom godina zabilježena su mnoga biološka svojstva ovih peptida (protuupalno, antihipertenzivno, antioksidativno itd.), od kojih je najvažnije istaknuti njihovo antikancerogeno djelovanje (Daliri i sur., 2017).

Zajedno s kardiovaskularnim bolestima, rak je jedan od glavnih uzročnika smrti širom svijeta. Konvencionalne kemoterapije pokazale su se vrlo učinkovite u liječenju raka, ali često izazivaju mnogobrojne nuspojave. Isto tako, mnogobrojni tumori razvili su rezistenciju na liječenje kemoterapijom. Stoga se sve više pažnje pridodaje istraživanju bioaktivnih peptida s potencijalnim antikancerogenim djelovanjem. Njihov antitumorni potencijal proizlazi iz činjenice da mogu utjecati na više molekularnih puteva uključenih u karcinogenezu, te da obično nisu genotoksični (Cicero i sur., 2017).

Kako bi se odredio potencijalni biološki učinak nekog spoja provode se preliminarna istraživanja primjenom kulture stanica (*in vitro*). Iako *in vitro* sustavi ne mogu u potpunosti zamjeniti *in vivo* sustave (eksperimentalne životinje), predstavljaju dobar modelni sustav koji omogućava predviđanje citotoksičnosti, odnosno antitumornog djelovanja nekog spoja te ispitivanje njegovog potencijala kao lijeka u razvojnoj fazi (Radojčić Redovniković i sur., 2016).

U ovom radu korištena je tumorska stanična linija MCF-7, a cilj rada bio je odrediti karakteristike rasta MCF-7 stanica te ispitati biološki učinak proteinskih hidrolizata iz pogače konoplje na rast navedene stanične linije.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA

Kultura životinjskih stanica je laboratorijska metoda koja podrazumijeva uzgoj stanica, prethodno izoliranih iz višestaničnih organizama ili tkiva, u *in vitro* uvjetima. Ovakav uzgoj omogućuje ponašanje pojedinačnih stanica kao nezavisnih organizama nalik na mikroorganizme poput bakterija i kvasaca. Proliferacija stanica se događa sve dok u mediju za uzgoj ima dovoljno hranjivih sastojaka i faktora rasta te prostora (Butler, 2004).

Iako su u osnovi tehnike za uzgoj životinjskih staničnih kultura slične tehnikama koje se koriste za uzgoj bakterija, kvasaca i plijesni, postoje karakteristične razlike. U odnosu na mikroorganizme, kultiviranje životinjskih stanica tehnički je složenije, jer životinjske stanice zahtijevaju kompleksnije medije za uzgoj, osjetljivije su i podložnije mehaničkim oštećenjima te imaju nižu specifičnu brzinu rasta zbog čega se uzgoj mora provoditi pri strogo kontroliranim aseptičnim uvjetima kako bi se izbjegle kontaminacije, jer mikroorganizmi rastu puno brže nego životinjske stanice. Unatoč navedenim nedostacima, *in vitro* sustavi kultiviranja životinjskih stanica koriste se u laboratorijima diljem svijeta za proučavanje rasta i diferencijacije stanica te za razumijevanje strukture i funkcije gena zbog mogućnosti primjene genetičkih manipulacija u kulturi stanica (Castilho i sur., 2008; Cooper i Hausman, 2004).

Na temelju brojnih podjela, kulture životinjskih stanica mogu se podijeliti na primarne stanične kulture te na stanične linije. Primarnu staničnu kulturu čine stanice izolirane direktno iz željenog tkiva ili organa. Ovisno o njihovom porijeklu, primarne stanice rastu ili kao adherentni monosloj ili u suspenziji. Adherentne stanice rastu jedino ako su pričvršćene za podlogu, dok stanice u suspenziji rastu neovisno o površini. Uspostavljanje takve kulture provodi se mehaničkim usitnjavanjem ili enzimskom razgradnjom tkiva, primjerice, pomoću tripsina. Primarna stanična kultura uglavnom obuhvaća heterogene stanice, koje se mogu dijeliti u ograničenom vremenskom periodu. Proliferacija stanica se događa sve dok ne postane limitirana nutrijentima i prostorom za rast, što u konačnici dovodi do apoptoze. Stoga je nužno provesti postupak subkultiviranja koji podrazumijeva precijepljivanje stanica u svježi hranjivi medij ili veću posudu za uzgoj. Subkultivacijom primarne stanične kulture prvotno se uspostavlja konačna stanična linija, te se višestrukim subkultiviranjem postiže homogena kultura, odnosno, genotipska i fenotipska uniformnost stanica unutar populacije. Konačna stanična linija ima određeni životni vijek i broj dioba, nakon čega gubi sposobnost proliferacije i odumire, što je posljedica postupnih i spontanih promjena u stanici. Međutim,



*in vitro* transformacijom konačne stanične linije omogućava se neograničeni rast stanica, pri čemu ona postaje kontinuirana stanična linija. Stjecanje beskonačnog životnog vijeka naziva se imortalizacija, a u kulturi životinjskih stanica najčešće se postiže transdukcijom virusima te transfekcijom viralnim genima, iako može biti spontana te inducirana kemijskim sredstvima ili ionizirajućim zračenjem. Glavna obilježja kontinuirane stanične linije su povećana brzina rasta, promijenjena morfologija stanica, smanjena potreba za serumom i faktorima rasta, povećana učinkovitost kloniranja, povećana gustoća stanica, mogućnost rasta u suspenziji te neograničeni životni vijek. Uz svoje prednosti, kontinuirane stanične linije imaju i određene nedostatke, a najznačajniji od njih su kromosomska nestabilnost, povećana sposobnost nastanka tumora, gubitak tkivnih markera te razlika u fenotipu u odnosu na izvorno tkivo. (Castilho i sur., 2008; Freshney, 2005; Khanal, 2017).

Uporaba kulture životinjskih stanica ima određene prednosti i nedostatke. Glavna prednost korištenja kulture stanica je ujednačenost i ponovljivost rezultata, što je posljedica korištenja jednog tipa stanica koje čine homogenu kulturu, za razliku od kulture tkiva u kojoj su stanice heterogene i nalaze se u različitim fazama rasta. Nadalje, u *in vitro* sustavima, u odnosu na *in vivo* sustave (cijela životinja), postiže se bolja kontrola fizikalno-kemijskih parametara poput pH, temperature, koncentracije otopljenog kisika i ugljičnog dioksida, te je omogućeno konstantno praćenje fiziološkog stanja stanica pomoću koncentracije nutrijenata i faktora rasta. Isto tako, kulture stanica koriste se u toksikološkim ispitivanjima, jer omogućuju bolje razumijevanje učinka između ispitivanog spoja i određenog tipa stanica, a uz to su takve analize jeftinije, nego kada se istraživanja provode na eksperimentalnim životinjama. Međutim, nakon razdoblja kontinuiranog rasta stanica, dolazi do promjene svojstava stanica, zbog nedostatka nutrijenata ili nakupljanja međuprodukata procesa. Budući da se stanica adaptira na novonastale uvjete, mijenjaju se biokemijski mehanizmi i enzimska aktivnost unutar stanice. To je ujedno i glavni nedostatak primjene kulture životinjskih stanica. Također, ova metoda zahtijeva visokospecijaliziranu radnu snagu, strogo kontrolirane aseptične uvjete rada, te visoke početne troškove (Arango i sur., 2013; Butler, 2004).

### **2.1.1. Medij za uzgoj životinjskih stanica**

*In vitro* kultivacija animalnih stanica podrazumijeva uzgoj stanica na vrlo složenom tekućem mediju, točno definiranog kemijskog sastava, koji osigurava uvjete što sličnije onima koji prevladavaju u *in vivo* sustavu iz kojeg su stanice izolirane. Dakle, uloga medija za uzgoj stanica je održavanje optimalnih uvjeta (temperatura, pH, koncentracija otopljenog kisika i ugljičnog dioksida, osmotski tlak) i osiguravanje dovoljne količine svih potrebnih nutrijenata i

faktora rasta koji su nužni za rast i umnožavanje stanice te njeno normalno funkcioniranje (Castilho i sur., 2008).

Prvotno su se za uzgoj životinjskih stanica koristili prirodni mediji temeljeni na tkivnim ekstraktima i tjelesnim tekućinama poput ekstrakta embrija, seruma i limfe. Karakteristike ovakvih medija bile su kompleksnost te nedefinirani kemijski sastav, zbog čega je uzgoj stanica bio poprilično otežan. Također, cijena ovakvih medija bila je visoka, zbog smanjene dostupnosti i velike količine potrebne sirovine te složenosti samog proizvodnog procesa. S vremenom je primjena animalnih stanica postala sve češća, a time i potreba za kvalitetnijim i dostupnijim medijem za uzgoj. Značajan pomak dogodio se 1955. godine, kada je Harry Eagle opisao formulaciju prvog kemijski definiranog medija za kultivaciju animalnih stanica. Danas na tržištu postoji mnoštvo kemijski definiranih medija za uzgoj, a ovisno o tipu stanice i svrsi uzgoja izabire se najprikladniji medij (Freshney, 2005). Najčešće korišteni mediji za kultivaciju animalnih stanica su BME (*Eagle's Basal Medium*) koji je originalno dizajniran za uzgoj mišjih L i HeLa stanica, EMEM (*Eagle's Minimal Essential Medium*) koji se koristi za uzgoj različitih tipova staničnih linija, DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*) koji sadrži četiri puta veću koncentraciju aminokiselina i vitamina od BME te GMEM (*Glasgow's Modification of Eagle's Medium*) koji sadrži dva puta veću koncentraciju aminokiselina i vitamina od BME (Butler, 2004).

Hranjivi medij sastoji se od nekoliko temeljnih komponenti, a to su voda, ugljikohidrati, aminokiseline, vitamini, hormoni, anorganske soli, faktori rasta, lipidi, proteini, organske kiseline, te mikronutrijenti. Isto tako, ponekad je potrebno dodati antibiotike i krvni serum. S druge strane, u hranjivom mediju se nikako ne smiju nalaziti toksične komponente te tvari koje mogu inhibirati rast stanice (Castilho i sur., 2008).

Voda je izvor mnogih kontaminanata poput anorganskih (teški metali, kalcij i kloridi) i organskih tvari (detergenti) te mikroorganizama koji značajno utječu na kvalitetu vode. Animalne stanice su osjetljive na prisutnost navedenih kontaminanata, te oni moraju biti uklonjeni iz vode koja se koristi za pripremu hranjivog medija. Stoga, voda za pripremu hranjivog medija mora biti visokog stupnja čistoće kako bi se na bilo koji način izbjegla inhibicija rasta stanica, promjena njihovog metabolizma ili smrt stanice. Pročišćavanje vode se najčešće provodi višestrukom destilacijom ili kombinacijom deionizacije, mikrofiltracije i reverzne osmoze (Castilho i sur., 2008).

Najzastupljeniji izvor ugljikohidrata u hranjivom mediju je glukoza, koju stanice koriste kao izvor energije te kao preteču za biosinteze staničnih komponenti. Glukoza se najčešće

dodaje u koncentraciji 5-25 mM. Većina glukoze se procesom glikolize razgrađuje do piruvata, koji se može reducirati do laktata ili oksidativno dekarboksilirati u acetil-CoA te ući u TCA ciklus i potpuno se oksidirati do CO<sub>2</sub> i vode. U *in vitro* uvjetima se mali dio glukoze potpuno oksidira do CO<sub>2</sub> i vode, dok se većina glukoze prevodi u laktat. Nakupljanje laktata u mediju ukazuje na to da TCA ciklus u *in vitro* uvjetima ne funkcionira jednako kao u *in vivo* uvjetima te snizuje pH medija što inhibira rast stanica. Da bi se smanjila proizvodnja laktata i stabilizirao pH medija, mogu se koristiti alternativni ugljikohidrati poput fruktoze, manoze i galaktoze (Castilho i sur., 2008).

Aminokiseline su također vrlo važne komponente hranjivog medija, jer služe kao prekursori za sintezu proteina. Najčešće se dodaju u koncentraciji 0,1-0,2 mM i to u obliku smjese točno definiranog sastava ili u obliku proteinskih hidrolizata soje, riže ili pšenice. Esencijalne aminokiseline se uvijek dodaju, jer ih organizam ne može sam sintetizirati, dok se neesencijalne aminokiseline dodaju ovisno o potrebama stanice. Za normalno funkcioniranje većine stanica nužno je prisustvo glutamina, jer ga stanice osim za biosintezu proteina koriste i kao prekursor u biosintezi purina, pirimidina i asparagina te kao preteču za intermedijere TCA ciklusa. Stoga se glutamin uvijek dodaje u višoj koncentraciji (1-5 mM) u odnosu na ostale aminokiseline. Međutim, metaboličkom ili toplinskom razgradnjom glutamina nastaje amonijak, koji slično kao laktat, toksično djeluje na stanicu i inhibira njen rast (Castilho i sur., 2008). Zato se često umjesto glutamina dodaje Glutamax, alanil-glutamin dipeptid, koji je stabilniji u širem temperaturnom rasponu te se u stanici ne raspada do amonijaka (Freshney, 2005).

Za rast životinjskih stanica nužna je i prisutnost anorganskih soli, jer one održavaju ionsku ravnotežu i osmotski tlak medija te sudjeluju kao koenzimi u brojnim enzimskim reakcijama. Anorganske soli imaju najveći utjecaj na povećanje osmolalnosti medija. Najčešće se dodaju u obliku iona Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> i HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Primjerice, ioni Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup> imaju važnu ulogu u regulaciji membranskog potencijala, dok ioni SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> i HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sudjeluju u biosintezi makromolekula te u regulaciji unutarstaničnog naboja. Isto tako, glavnu ulogu u puferiranju medija ima bikarbonat koji se zajedno s plinovitim CO<sub>2</sub> nalazi u atmosferi inkubatora i osigurava optimalnu pH vrijednost medija. Budući da ioni Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> imaju svojstvo agregacije stanica, bitno je optimizirati njihovu koncentraciju kako bi se ta pojava izbjegla. Elementi u tragovima (Fe, Mn, Se, Va, Zn, Cu, Mo) važni su za enzimsku aktivnost te vijabilnost stanica, a dodaju se u medij u vrlo malim koncentracijama, jer je potreba za njima uglavnom zadovoljena dodatkom seruma (Castilho i sur., 2008).

Vitamini sudjeluju kao enzimski kofaktori u brojnim enzimskim reakcijama, te su nužni za normalno funkcioniranje staničnog metabolizma. U hranjivi medij se dodaju u vrlo malim koncentracijama i to najčešće vitamini B skupine poput folne kiseline i biotina, dok su ostali vitamini osigurani dodatkom seruma u medij. Dodatak vitamina u medij najviše ovisi o potrebama odabrane stanične linije te o količini dodanog seruma (Castilho i sur., 2008).

Antibiotici poput penicilina, streptomocina i amfotericina B se vrlo često dodaju u hranjivi medij radi suzbijanja potencijalnih kontaminanata. Međutim, uporaba antibiotika mora biti minimizirana, zato što neki antibiotici imaju citotoksični učinak, čak i pri visokoj koncentraciji seruma. S druge strane, kontinuirana uporaba antibiotika može izazvati pojavu rezistencije kod neželjenih mikroorganizama, pri čemu oni postaju neučinkoviti (Castilho i sur., 2008).

U uobičajenim medijima, potreba za hormonima i specifičnim faktorima rasta zadovoljena je dodatkom seruma, pa stoga oni nisu specificirani u formulama većine uobičajenih medija. Međutim, redovito se dodaju kod *serum-free* medija. Njihova prisutnost je iznimno važna za normalno funkcioniranje stanice, jer reguliraju stanične funkcije, pospješuju proliferaciju te iniciraju diferencijaciju stanica, što u konačnici dovodi do uspješnije kultivacije stanica (Freshney, 2005).

#### **2.1.1.1. Serum**

Serum je kompleksna smjesa koja sadrži brojne tvari nužne za rast i održavanje kulture stanica, kao što su proteini, hormoni, faktori rasta, vitamini, lipidi te brojne druge tvari. U osnovi, serum je supernatant zaostao nakon koagulacije proteina krvi životinjskog ili humanog porijekla (Butler, 2004). U medij za uzgoj obično se dodaje u rasponu koncentracija 5-20% (v/v). Najčešće se koriste fetalni goveđi, goveđi, konjski i humani serum. Humani serum se ponekad koristi za uzgoj nekih humanih staničnih linija, ali prije primjene mora biti provjeren kako bi se eliminirala opasnost infekcije virusima, kao što su HIV i hepatitis B (Freshney, 2005). Fetalni goveđi serum (*Fetal Bovine Serum - FBS*) ima prednost u korištenju kao dodatak mediju, zbog niske razine imunoglobulina i visokog udjela embrionalnih faktora rasta, te je pogodan za uzgoj velikog broja staničnih linija. Međutim, serum je ujedno i jedna od najskupljih komponenata medija za uzgoj animalnih stanica. Razlog tome je što proizvodni proces daje vrlo nizak prinos, te posljedično poskupljuje njegovu proizvodnju. Osim ekonomskog nedostatka, postoji i etički, koji uključuje mučenje velikog broja životinja tijekom proizvodnje seruma. Korištenje seruma stoga poskupljuje i cijenu željenog proizvoda, a zbog svog nedefiniranog sastava može stvarati probleme tijekom izolacije i pročišćavanja proizvoda. S obzirom na svoje porijeklo, serum je često izvor

brojnih kontaminanata poput virusa, priona, bakterija i mikoplazmi koje mogu negativno utjecati na stanični rast. Još jedan limitirajući faktor korištenja seruma je i različitost u sastavu, koji varira ovisno o šarži i proizvođaču, čime se u konačnici umanjuje reproducibilnost rezultata. (Castilho i sur., 2008). Stoga se u zadnje vrijeme, sve više pažnje posvećuje razvoju tzv. *serum-free* medija, kojima se nastoje izbjeći navedeni nedostaci korištenja seruma. Postoje različite formulacije ovakvih medija, a temelje se na identifikaciji te nadomještanju komponenata iz seruma koje su nužne za prihvaćanje, rast i proliferaciju stanica. Općenito, ovakvi su mediji specifičniji u odnosu na medije sa serumom, te takav pristup omogućuje razvoj najprikladnijeg medija za uzgoj određenog tipa stanice. Osim toga, promjenom koncentracije određenih sastojaka (npr. faktori rasta) može se utjecati na određene stanične funkcije. S druge strane, adaptacijom stanica na takav medij (postupnim uklanjanjem seruma iz medija) te dodavanjem ključnih komponenti za njihov rast, mogu se prevladati problemi koji se javljaju uporabom ovakvih medija kao što su niža gustoća, sporija proliferacija i manji broj generacija stanica (Butler, 2015; Freshney, 2005).

### **2.1.2. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica**

Osim o sastavu medija za uzgoj, uspješan rast i proliferacija animalnih stanica *in vitro* ovisi i o nekoliko fizikalno-kemijskih čimbenika, koje je potrebno optimirati te regulirati tijekom uzgoja. Neki od njih su pH, temperatura, osmolalnost, koncentracija plinova ( $O_2$  i  $CO_2$ ), te viskoznost (Freshney, 2005).

Optimalna temperatura za uzgoj kulture animalnih stanica prvenstveno ovisi o temperaturi domaćina iz kojeg su stanice izolirane, ali i o vrsti tkiva iz kojeg su izolirane (npr. temperatura kože i testisa može biti manja od temperature u ostatku tijela). Većina humanih i toplokrvnih animalnih staničnih linija najbolje raste pri  $37^\circ C$ . Stanične linije sisavaca toleriraju značajno niže temperature od optimalne, pri čemu ne dolazi do oštećenja, već se samo usporava njihov rast. Primjerice, mogu preživjeti nekoliko dana na  $4^\circ C$  ili mogu biti zamrznute na  $-196^\circ C$ . S druge strane, povišenje temperature za samo  $2^\circ C$  od optimalne ( $39,5^\circ C$ ), letalno je za većinu kultura. Stoga se inkubator uvijek podešava na malo nižu temperaturu od optimalne kako ne bi došlo do pregrijavanja kulture. (Freshney, 2005). Temperatura utječe i na topljivost različitih komponenti hranjivog medija, posebice plinova kao što su  $O_2$  i  $CO_2$  (Castilho i sur., 2008).

Optimalna pH vrijednost prvenstveno ovisi o tipu stanica, ali većina staničnih linija sisavaca uspješno raste i razmnožava se pri pH 7,4. U medij za uzgoj najčešće se dodaje fenol crveno kao pH indikator, koji je osjetljiv na male promjene pH vrijednosti. Pri višim pH vrijednostima

od optimalne, crvena boja prelazi u ružičastu (pH 7,6), odnosno ljubičastu (pH 7,8), dok pri nižim pH vrijednostima, crvena boja prelazi u narančastu (pH 7,0), odnosno žutu (pH 6,5), što često ukazuje na pojavu kontaminacije u kulturi. Međutim, mnogi komercijalno dostupni indikatori sadrže nečistoće koje mogu utjecati na ponašanje stanica. Isto tako, mogu interferirati prilikom provođenja fluorescencijskih i apsorbancijskih metoda, što u konačnici dovodi do pogrešne interpretacije rezultata (Castilho i sur, 2008).

pH medija usko je povezan s ravnotežom između CO<sub>2</sub> u plinskoj i tekućoj fazi, i to tako da se otapanjem CO<sub>2</sub> snižava pH medija. Stoga se u inkubatorima održava kontrolirana atmosfera, najčešće s 5% CO<sub>2</sub> (parcijalni tlak CO<sub>2</sub>=40 mmHg) koja je u ravnoteži s koncentracijom hidrogenkarbonata u mediju (obično 24 mM), čime se postiže hidrogenkarbonat-CO<sub>2</sub> puferski sustav koji omogućuje održavanje optimalne pH vrijednosti medija (Butler, 2004; Castilho i sur. 2008).

Drugi značajan sastojak plinske faze je kisik. Zbog slabe topljivosti u vodi i vodenim otopinama, često je limitirajući faktor rasta stanica. Topljivost kisika može se povećati povećanjem parcijalnog tlaka kisika u plinskoj fazi ili snižavanjem temperature. Međutim, povećana koncentracija otopljenog kisika može biti toksična. Razlog tome je prekomjerno povećanje slobodnih radikala, koji u konačnici mogu dovesti do oštećenja stanica. Za održavanje kultura stanica dovoljan je atmosferski kisik, dok se kulture tkiva održavaju u kontroliranoj atmosferi sa do 95% O<sub>2</sub> (Castilho i sur. 2008; Freshney, 2005).

Promjene osmotskog tlaka dobro tolerira većina staničnih linija. Za optimalan rast većine staničnih linija sisavaca, ta vrijednost se obično kreće u rasponu od 260 do 320 mOsm/kg, ali tijekom uzgoja ne bi smjela odstupati više od ±10 mOsm/kg. Osmolalnost se često mijenja uslijed dodatka različitih tvari u medij za uzgoj, poput soli i antibiotika, ili zbog nastanka određenih međuprodukata tijekom uzgoja kulture stanica. Isto tako, tijekom inkubacije kultura uzgajanih u Petrijevim zdjelicama ili *multiwell* pločama, može doći do povećanja osmolalnosti zbog isparavanja vode. Stoga se preporuča održavanje kultura stanica u blago hipotoničnom mediju, kako bi se izbjegao negativan utjecaj promjene osmolalnosti na rast i proliferaciju stanica (Castilho i sur., 2008).

Viskoznost medija najviše ovisi o količini seruma i uglavnom ne utječe na rast kulture. Međutim, viskoznost postaje bitan čimbenik kada se koriste sustavi za miješanje stanica ili nakon tripsinizacije, kada su stanice disocirane. Bilo kakvo oštećenje stanica koje se javlja u ovakvim uvjetima, može se umanjiti povećanjem viskoznosti medija s dodavanjem karboksimetilceluloze (CMC) ili polivinilpirolidona (PVP). Viskoznost medija također je bitan

čimbenik u medijima s malom koncentracijom seruma ili u medijima koji uopće ne sadrže serum (Freshney, 2005).

## **2.2. BIOAKTIVNI PEPTIDI**

Proteini iz hrane, osim mnogih nutritivnih i funkcionalnih svojstava, posjeduju i mnoga biološka svojstva, koja im daju tendenciju da se koriste kao sastojci funkcionalne hrane i nutraceutika. Mnoga od tih svojstava mogu se pripisati fiziološki aktivnim peptidima, tzv. bioaktivnim peptidima, kodiranim u primarnoj strukturi proteina. Posebno bogati izvori ovih peptida su mlijeko i jaja, ali i meso različitog porijekla, kao i mnoge biljke (Korhonen i Pihlanto, 2003).

Bioaktivni peptidi su specifična grupa peptida, koji kada se nađu u ljudskom organizmu mogu potaknuti određene poželjne fiziološke procese te u konačnici pozitivno utjecati na ljudsko zdravlje i dobrobit cjelokupnog organizma (Gnasegaran i sur., 2017). To su kratke sekvence aminokiselina, obično dugačke 2-20 aminokiselinskih ostataka, koje su inaktivne kada se nalaze unutar primarne strukture ishodnog proteina, a oslobađaju se tijekom probave u gastrointestinalnom traktu, tijekom prerade hrane ili hidrolizom korištenjem komercijalnih peptidaza (Di Bernardini i sur., 2011). Međusobno se razlikuju po aminokiselinskom sastavu i kemijskoj strukturi, a posljedično i prema biološkoj funkciji (Lemes i sur., 2016). Bioaktivni peptidi su otporni na djelovanje probavnih peptidaza (Kitts i Weiler, 2003), pa se nakon probave mogu apsorbirati iz crijeva u krvotok te transportirati do ciljnih tkiva (Di Bernardini i sur., 2011), gdje mogu djelovati kao modulatori određenih fizioloških procesa, slično kao endogeni peptidi s hormonskom aktivnošću. Njihovi brojni fiziološki učinci povezani su s regulacijom povišenog krvnog tlaka (inhibicija angiotenzina i konvertirajućeg enzima), antioksidativnom aktivnošću, sprječavanjem agregacije trombocita, modulacijom imunološkog sustava, snižavanjem razine kolesterola i triglicerida u plazmi, stimulacijom funkcija živčanog sustava, antimikrobnim djelovanjem te poboljšanjem transporta i apsorpcije minerala (Hadnađev i sur., 2018). Neki bioaktivni peptidi mogu utjecati na više fizioloških funkcija u ljudskom tijelu (Di Bernardini i sur., 2011). Biološka aktivnost bioaktivnih peptida usko je povezana sa njihovom strukturom. Primarni slijed aminokiselina (broj, vrsta i položaj) i njihove karakteristike (npr. naboj, hidrofobnost) određuju konformaciju peptida, a time i njihova biološka svojstva. Na primjer, antioksidativna svojstva pokazuju peptidi koji sadrže hidrofobne i sulfidne grupe. S druge strane, sposobnost peptida da se vežu na receptor i provode određenu biološku aktivnost proizlazi iz njihove sekundarne strukture (Agyei i sur., 2017).

Stoga se, bioaktivni peptidi, smatraju novom generacijom biološki aktivnih regulatora, koji ne samo da sprječavaju oksidaciju i mikrobnu razgradnju u hrani, već se mogu koristiti i kao sastojci farmakoloških pripravaka za liječenje raznih poremećaja i bolesti, što u konačnici utječe na kvalitetu života (Lemes i sur., 2016).

### **2.2.1. Enzimska hidroliza proteina**

Proteinski hidrolizat se definira kao kompleksna smjesa koja sadrži oligopeptide, peptide i slobodne aminokiseline. Općenito, proteinski hidrolizati s biološki aktivnim komponentama mogu se proizvesti kemijskom hidrolizom, enzimskom hidrolizom pomoću proteolitičkih enzima te mikrobnom fermentacijom pomoću proteolitičkih bakterija (Nasri, 2017).

*In vitro* hidroliza proteina pomoću prikladnih egzogenih proteolitičkih enzima je najčešći postupak dobivanja proteinskih hidrolizata i peptida s poželjnim biološkim svojstvima. Enzimska hidroliza u odnosu s drugim postupcima ima niz prednosti. Enzimska hidroliza provodi se pri puno blažim uvjetima (pH 6,00-8,00, temperatura 40-60°C), te omogućuje bolju kontrolu procesa, u odnosu na kemijski postupak. Osim toga, enzimskom hidrolizom dobije se hidrolizat gotovo jednakog aminokiselinskog sastava kakav je bio u proteinu prije hidrolize, s manjim modifikacijama, što ovisi o korištenom enzimu. Isto tako, enzimska hidroliza ne koristi organska otapala i toksične kemikalije, pa je stoga pogodna za primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Korištenjem specifičnih proteaza, također je moguće kontrolirati enzimski proces da se dobiju reproducibilni biološki aktivni proteinski hidrolizati. S druge strane, u usporedbi s mikrobnim postupkom, uporabom različitih proteaza i različitog omjera koncentracije enzima i supstrata omogućuje se dobivanje raznovrsnih proteinskih hidrolizata, koji sadrže različite vrste peptida (Nasri, 2017).

U konačnici, biološka svojstva proteinskih hidrolizata ovise o specifičnosti enzima i stupnju hidrolize, kao i o svojstvima dobivenih peptida poput molekulske mase, aminokiselinskog sastava, te hidrofobnosti. (Nasri, 2017).

### **2.2.2. Konoplja (*Cannabis sativa* L.) i njen utjecaj na ljudsko zdravlje**

*Cannabis sativa* L. je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice *Cannabaceae* koju karakteriziraju dugi i tanki cvjetovi te šiljasti listovi. Konoplja se još u antičko doba koristila kao izvor hrane i vlakana te u medicinske svrhe. Za razliku od marihuane, industrijska konoplja sadrži vrlo nizak udio  $\delta$ -9-tetrahidrokanabinola (THC), psihoaktivne tvari koja marihuani daje terapeutska svojstva. Sjeme konoplje, nusproizvod koji se dobije nakon iskorištavanja usjeva za vlakna, sadrži više od 30% ulja, oko 25% proteina te je značajan



izvor prehrambenih vlakana, vitamina i minerala. Koristi se u proizvodnji brojnih kozmetičkih i terapijskih pripravaka, kao i funkcionalne hrane i nutraceutika (Girgih i sur., 2011; Yan i sur., 2015).

Osim visoke nutritivne vrijednosti sjeme konoplje pokazuje i mnoge pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Općenito, mnogi sastojci sjemena konoplje pokazuju brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje kao što su ublažavanje simptoma konstipacije ili dijareje, regulacija razine kolesterola u krvi, sprječavanje kardiovaskularnih oboljenja, imunomodulacijski učinci, ublažavanje raznih dermatoloških stanja, itd. (Yan i sur., 2015). Važno je istaknuti da je sjeme konoplje bogat izvor polinezasićenih masnih kiselina, pogotovo linolenske (18:2 *omega-6*) i  $\alpha$ -linoleinske kiseline (18:3 *omega-3*), koje imaju važnu ulogu u poboljšanju ljudskog zdravlja, posebno u prevenciji kardiovaskularnih bolesti te u regulaciji kolesterola. Međutim, sjeme konoplje smatra se nedovoljno iskorištenim proteinskim izvorom. Sjeme konoplje bogato je visokokvalitetnim proteinima, uglavnom edestinom i albuminom, koji su lako probavljivi i sadrže sve esencijalne aminokiseline za normalno funkcioniranje organizma. Osim što se smatraju vrlo vrijednim nutritivnim izvorom, nedavna istraživanja su pokazala da proteinski hidrolizati ili čisti peptidi dobiveni iz proteina konoplje mogu imati pozitivan učinak za ljudsko zdravlje te potencijalnu primjenu u prevenciji i liječenju kroničnih stanja poput raka i kardiovaskularnih bolesti (Girgih i sur., 2011). Brojne studije dokazale su da peptidi izvedeni iz proteina konoplje posjeduju mnoga biološka svojstva, posebice antioksidativno i antihipertenzivno svojstvo. Dva su poznata multifunkcionalna bioaktivna peptida, koja posjeduju oba navedena svojstva, a to su WVYY i PLSPA. Antioksidativna aktivnost se često veže uz smanjenje oksidativnog stresa, čime se smanjuje mogućnost oboljenja od raznih kroničnih bolesti. Oksidativni stres je stanje u organizmu do kojeg dolazi zbog prekomjerne proizvodnje slobodnih radikala, reaktivnih kisikovih čestica (*ROS-Reactive Oxygen Species*), čime se narušava ravnoteža između proizvodnje slobodnih radikala i sposobnosti endogenih antioksidansa da ih uklone. Prekomjerna proizvodnja ROS-a u organizmu dovodi do oštećenja staničnih membrana, proteina, enzima i DNA što rezultira nastankom bolesti (Girgih i sur., 2014). Smatra se da bioaktivni peptidi dobiveni iz proteina konoplje posjeduju antioksidativna svojstva zato što sadrže visoku razinu negativno nabijenih aminokiselinskih ostataka koji sudjeluju kao elektron donori reaktivnim kisikovim česticama i na taj način ih deaktiviraju. S druge strane, bioaktivni peptidi konoplje sadrže visoku razinu arginina i glutaminske kiseline, koji su metabolički prekursori za sintezu dušikovog oksida. Smatra se da zbog toga imaju antihipertenzivno svojstvo, jer dušikov oksid sudjeluje u inicijaciji

vazodilatacijskih procesa, što u konačnici dovodi do snižavanja krvnog tlaka (Girgih i sur., 2013).

Iako proteini konoplje zbog prisutnosti svih esencijalnih aminokiselina i lake probavljivosti imaju visok potencijal za proizvodnju bioaktivnih peptida, koji mogu pozitivno utjecati na ljudsko zdravlje, još postoje mnogobrojne nepoznanice koje je potrebno istražiti.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Kemikalije

- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- 0,25% Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev hidroksid, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev karbonat, Kemika, Zagreb, RH
- Bakrov sulfat pentahidrat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalij natrij tartarat, Kemika, Zagreb, RH
- MTS reagens ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijevazol)), Promega, SAD
- Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Folin-Ciocalteu-ov reagens, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Glukoza – PAP kolorimetrijski test, Greiner Diagnostic GmbH, Bahlingen, Njemačka

##### 3.1.2. Otopine i puferi

- PBS pufer (pH=7,4)

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44 g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,24 g
Destilirana voda	do 100 mL

- 0,2% otopina tripan – plavo

Boja tripan-plavo	0,02 g
PBS pufer	10,00 mL

- Reagens A
 

Natrijev hidroksid	2 g
Natrijev karbonat	10 g
Destilirana voda	do 500 mL
  
- Reagens B1
 

Bakrov sulfat pentahidrat	1 g
Destilirana voda	do 100 mL
  
- Reagens B2
 

Kalij natrij tartarat	2 g
Destilirana voda	do 100 mL
  
- Reagens C
 

Reagens A	50 mL
Reagens B1	0,5 mL
Reagens B2	0,5 mL

### 3.1.3. Uređaji i oprema

- Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija
- Hladnjak (4°C i -20°C), Gorenje, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO<sub>2</sub>, Kambič, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Neubauerova komorica za brojanje stanica, Buffalo, NY, SAD
- Spektrofotometar, Thermo Scientific Genesys 10S UV/VIS, SAD
- Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, kivete, Eppendorf kivete)
- Ploče s 12 jažica, Corning, SAD
- Ploče s 96 jažica, Corning, SAD

### 3.1.4. MCF-7 stanična linija

U ovom radu korištena je humana stanična linija MCF-7, dobivena iz *American Type Culture Collection* (ATCC) radne banke stanica. Morfološki su to epitelne, a prema načinu uzgoja adherentne stanice. Uzgajaju se u T-bocama, Petrijevim zdjelicama i pločama s jažicama, u

inkubatoru pri reguliranim uvjetima atmosfere koju čine 95% zraka i 5% CO<sub>2</sub> te na temperaturi od 37°C. Za rast se koristi DMEM hranjivi medij s 10% FBS-a.

MCF-7 stanična linija izolirana je iz pleuralnog izljeva 69-godišnje pacijentice oboljele od metastaziranog raka dojke. Skraćenica MCF-7 izvedena je od Michigan Cancer Foundation-7, instituta u Detroitu, na kojem je uspostavljena 1973. godine. Za proliferaciju ove stanične linije nužan je estrogen, te vezanjem tamoksifena, antagonista estrogena dolazi do inhibicije rasta (Comşa i sur., 2015). Zbog te činjenice, MCF-7 stanična linija, je izvrstan model za *in vitro* istraživanja mehanizama tumorskih odgovora na endokrinu terapiju raka dojke, te složenih odnosa između vezanja i biološke aktivnosti terapijskih hormona (Levenson i Jordan, 1997).

### **3.1.5. Proteinski hidrolizati konoplje**

Proteinski hidrolizati konoplje pripremljeni su iz komercijalnog brašna sjemena konoplje, korištenjem enzima alkalaze, u Laboratoriju za primjenu i tehnologiju stanica i biotransformacije, PBF, Zagreb.

## **3.2. METODE RADA**

Rad s kulturama stanica odvija se u komori za sterilni rad sa sterilnim laboratorijskim priborom, jer je potrebno osigurati aseptične uvjete rada kako bi se izbjegle kontaminacije stanica. Prije rada potrebno je ruke te radnu površinu prebrisati 70%-tnim etanolom.

### **3.2.1. Uzgoj tumorske stanične linije MCF-7**

U ovom radu korištene su dvije šarže prethodno uzgojenih MCF-7 staničnih linija u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF, Zagreb, od kojih je jedna korištena za praćenje dinamike rasta MCF-7 stanične linije, a druga za ispitivanje biološkog učinka proteinskih hidrolizata konoplje na proliferaciju tumorske stanične linije MCF-7. Budući da se radi o adherentnom tipu stanica, prije postavljanja pokusa bilo je nužno podvrgnuti stanice djelovanju tripsina kako bi se odvojile od podloge. U dobivenim suspenzijama je zatim određen ukupan broj stanica metodom tripan-plavo (opisana u poglavlju 3.2.2.1.), kako bi se odredili potrebni volumeni suspenzije stanica za postavljanje pokusa.

### **3.2.2. Određivanje krivulje rasta tumorske stanične linije MCF-7**

Prethodno uzgojene MCF-7 stanice, nacijepu se u ploču s 12 jažica u početnoj koncentraciji od  $1 \times 10^5$  st/mL. Svaka jažica nacijepi se sa 500  $\mu$ L suspenzije stanica. Ploča s jažicama se stavlja u inkubator, gdje se stanice uzgajaju tijekom 96 sati pri kontroliranim uvjetima. Svaka 24 sata određen je broj stanica brojanjem u Neubauer-ovoj komorici uz dodatak boje tripan-plavo. Za svaki vremenski interval uzgoja stanica postavljene su po tri paralele. Budući da se radi o adherentnom tipu stanica, stanice se pomoću specifičnih staničnih proteina međusobno povezuju te pričvršćuju za površinu posude za uzgoj. Stoga, da bi se mogao pripremiti uzorak za brojanje stanica, stanice je potrebno prethodno odvojiti od podloge. U tu svrhu, kulturi stanica dodaje se proteolitički enzim tripsin, koji razgrađuje prethodno spomenute proteine, što rezultira međusobnim razdvajanjem stanica, te njihovim odvajanjem od podloge. Najprije se iz jažice, pomoću sterilne pipete, ukloni sav volumen medija za uzgoj. Za potrebe ovog rada, uklonjeni medij za uzgoj se ne baca, već se prebaci u Eppendorf kivetu, koja se zamrzne do određivanja sadržaja glukoze u mediju. Zatim se doda 100  $\mu$ L tripsina, koji je prethodno odmrznut i inkubiran na radnu temperaturu. Ploča s jažicama se, nakon dodatka tripsina, nježno protrese kružnim pokretima kako bi se tripsin ravnomjerno rasporedio unutar jažica, te se stavi u inkubator 5-7 minuta, jer tripsin brže djeluje pri višoj temperaturi. Nakon navedenog vremena stanice se izvade iz inkubatora te se pod inverznim mikroskopom provjerava jesu li se odvojile od podloge. Stanice koje su pričvršćene za podlogu su izdužene te nepravilnog oblika, dok stanice koje se odvoje od podloge poprime pravilniji oblik, zaokruže se te plivaju u tripsinu. Djelovanje tripsina zaustavlja se dodatkom 400  $\mu$ L hranjivog medija s 10% FBS-a, jer se u serumu nalazi tripsin inhibitor, koji će inaktivirati tripsin kako ne bi došlo do razgradnje samih stanica. Kao rezultat tripsinizacije dobije se suspenzija stanica.

#### **3.2.2.1. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo**

Prethodno dobivena suspenzija stanica najprije se nekoliko puta resuspendira te se zatim iz nje izuzme alikvot od 10  $\mu$ L koji se pomiješa sa 10  $\mu$ L boje tripan-plavo. Tako priređena suspenzija se također resuspendira te se alikvot od 10  $\mu$ L nanese na Neubauer-ovu komoricu za brojanje. Neubauer-ova komorica se sastoji od 9 kvadrata, te je svaki kvadrat površine 1 mm<sup>2</sup>. Stanice se broje u 4 velika kvadrata koji se nalaze na kutovima, a svaki je još podijeljen na 16 manjih kvadrata. Ova metoda razlikuje mrtve od živih stanica, jer mrtve stanice zbog oštećene membrane propuštaju molekule boje i boje se plavo, dok žive stanice ostaju nebojene. Broj živih stanica po mililitru suspenzije iskazuje se prema formuli:

*broj stanica / mL suspenzije = srednja vrijednost broja stanica unutar četiri kvadrata x 5000*

### **3.2.2.2. Određivanje koncentracije glukoze u mediju GOD-PAP metodom**

GOD-PAP metoda je enzimsko-kolorimetrijska metoda koja se često koristi u dijagnostici za određivanje glukoze u krvnom serumu, plazmi te likvoru. Metoda se temelji na dvije enzimске reakcije. Glukoza se u prisustvu kisika i vode, djelovanjem glukoza-oksidge, oksidira do glukonske kiseline i vodikovog peroksida. Nastali vodikov peroksid, uz pomoć peroksidaze, reagira s fenolom i 4-aminoantipirinom, tvoreći crveno obojeni produkt – kinonimin. Koncentracija nastalog kinonimina proporcionalna je intenzitetu obojenja otopine, a budući da je kinonimin u ekvimolarnom odnosu s glukozom, intenzitet obojenja otopine je zapravo proporcionalan koncentraciji glukoze u uzorku. Intenzitet obojenja otopine mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 500 nm.

Uzorci za mjerenje apsorbancije pripreme se tako da se u 10 mL reagensa doda alikvot od 10 µL uzorka. U slijepu probu se umjesto uzorka dodaje 10 µL destilirane vode, dok se u standard dodaje 10 µL standarda. Za određivanje početne koncentracije glukoze, koristi se 10 µL originalnog medija. Sva mjerenja su provedena u dvije paralele. Da bi došlo do karakterističnih reakcija i stvaranja obojenog produkta, potrebno je pripremljene uzorke ostaviti 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon navedenog vremena mjeri se asporbancija pri 500 nm, te se koncentracija glukoze odredi prema izrazu:

$$\text{koncentracija glukoze} = [A_{500}(\text{uzorak}) / A_{500}(\text{standard})] \times c$$

c – standardna koncentracija (g/L: c=1; mmol/L: c=5,56)

Reagens sadrži fosfatni pufer (pH=7,5), fenol, 4-aminoantipirin, glukoza-oksidge te peroksidazu.

### 3.2.2.3. Izračunavanje parametara rasta MCF-7 stanica

#### Određivanje specifične brzine rasta ( $\mu$ )

Specifična brzina rasta stanica ( $\mu$ ) opisana je izrazom:

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad [\text{h}^{-1}]$$

x – masa stanica

dx – povećanje biomase stanica

dt – vremenski interval

$\mu$  je konstantna u log fazi, a približno vrijedi i za fazu usporenog rasta pa vrijedi jednadžba:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t$$

S obzirom da je masa proporcionalna broju stanica, onda je:

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{\Delta t} \quad [\text{h}^{-1}]$$

N – broj stanica u 1 mL na kraju log faze

$N_0$  – broj stanica u 1 mL na početku log faze

$\Delta t$  – vremenski interval (h)

#### Određivanje vremena udvostručenja stanica ( $t_D$ )

Vrijeme udvostručenja stanica ( $t_D$ ) računa se prema izrazu:

$$t_D = \frac{\ln 2}{\mu} \quad [\text{h}]$$

$\mu$  – specifična brzina rasta ( $\text{h}^{-1}$ )

#### Određivanje prinosa stanica

*Prinos stanica = broj stanica na kraju log faze – broj stanica na početku uzgoja*



### Određivanje specifične potrošnje glukoze ( $q_s$ )

Specifična potrošnja glukoze ( $q_s$ ) određuje se prema izrazu:

$$q_s = \frac{2}{X_0 + X_t} \frac{S_t - S_0}{t}$$

$X_0$  – početna koncentracija stanica u vremenu t

$X$  – konačna koncentracija stanica u vremenu t

$S_0$  – početna koncentracija supstrata

$S_t$  – koncentracija supstrata u vremenu t

### Određivanje ukupne potrošnje supstrata ( $\Delta S$ )

$$\Delta S = S - S_0$$

$S_0$  – koncentracija supstrata na početku uzgoja

$S$  – koncentracija supstrata na kraju uzgoja

### **3.2.3. Ispitivanje biološke aktivnosti proteinskih hidrolizata konoplje na staničnoj liniji MCF-7**

Nakon uzgoja i provedene tripsinizacije MCF-7 stanica, u mikrotitarsku ploču s 96 jažica naciepljeno je po 100  $\mu$ L suspenzije stanica u početnoj koncentraciji od  $2,5 \times 10^4$  st/mL. Ploča s naciepljenim stanicama stavljena je 24 h u inkubator s kontroliranom atmosferom i temperaturom od 37°C, kako bi se stanice prihvatile za podlogu, adaptirale na nove uvjete i nastavile rasti. Nakon 24 sata inkubacije stanice su tretirane s dva različita proteinska hidrolizata konoplje u koncentracijama od 1, 2 i 5 mg/mL. Kontrolnim stanicama ne dodaju se proteinski hidrolizati. Za svaku koncentraciju uzorka postavljene su četiri paralele. Nakon 72 sata od dodatka proteinskih hidrolizata, MTS metodom određena je vijabilnost stanica izražena kao postotak preživljenja u odnosu na kontrolne stanice.

### **3.2.3.1. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-ju**

Lowry-jeva metoda određivanja proteina temelji se na dvije kemijske reakcije. Najprije se  $\text{Cu}^{2+}$  ioni reduciraju u  $\text{Cu}^+$ , u reakciji sa peptidnim vezama proteina u lužnatom mediju, tvoreći  $\text{Cu}^+$ -protein kompleks. Zatim se u reakcijsku smjesu dodaje Folin-Ciocalteu reagens koji sadrži fosfomolibdensku i fosfovolframatnu kiselinu. Nastali  $\text{Cu}^+$ -protein kompleks zajedno sa pobočnim aminokiselinskim ostacima proteina, triptofanom i tirozinom, reducira fosfomolibdensku i fosfovolframatnu kiselinu, pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks sa apsorpcijskim maksimumom pri 750 nm (Noble i Bailey, 2009). Intenzitet obojenja proporcionalan je koncentraciji proteina u uzorku.

Kako bi se mogla odrediti koncentracija proteina u uzorku (ovom metodom), potrebno je najprije konstruirati baždarni dijagram ovisnosti apsorbanције ( $A_{740}$ ) o koncentraciji proteina. U tu svrhu prirede se standardne otopine BSA, različite koncentracije proteina, čija se apsorbancija mjeri na 740 nm. Za potrebe ovog rada, baždarni dijagram konstruiran je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF, Zagreb.

Određivanje proteina u željenom uzorku provodi se na način da se prvo pripreve odgovarajuća razrjeđenja uzorka, jer ako su uzorci prekoncentrirani, metoda izlazi iz područja linearnosti te dobiveni rezultati nisu valjani. U ovom radu, ishodni proteinski hidrolizat konoplje razrijeđen je 500x, dok je frakcija proteinskog hidrolizata konoplje (<3 kDa) razrijeđena 100x. Zatim se u svaku epruvetu otpipetira po 200  $\mu\text{L}$  prethodno razrijeđenog uzorka i 1000  $\mu\text{L}$  reagensa C. U slijepu probu se umjesto uzorka dodaje 200  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Dobivena smjesa se zatim promješa na vortex mješalici te se ostavi stajati 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 15 minuta, u svaku epruvetu se naglo dodaje po 100  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa na vortexu, te se smjesa ostavi stajati 40-60 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon što su uzorci uspješno pripremljeni, mjeri se apsorbancija na 740 nm, te se iz baždarnog dijagrama očitaju koncentracije proteina u uzorcima. Sva mjerenja provedena su u tri paralele.

### **3.2.3.2. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom**

MTS metoda je kolorimetrijska metoda koja se najčešće koristi za određivanje preživljenja i proliferacije stanica, a temelji se na metaboličkoj aktivnosti živih stanica. Naime, u točno definiranim uvjetima, žive stanice uz pomoć NAD(P)H-ovisnih oksidoreduktaza imaju sposobnost redukcije MTS reagensa ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol)) u ljubičasto obojani produkt, formazan, koji je topljiv u

staničnom mediju. Količina nastalog formazana proporcionalna je metaboličkoj aktivnosti mitohondrijskih enzima, koje proizvode žive stanice. Prema tome, intenzitet obojenja proporcionalan je broju živih stanica, a mjeri se na čitaču mikrotitarskih ploča, pri apsorpcijskom maksimumu od 490 nm (Arab-Bafrani i sur., 2016).

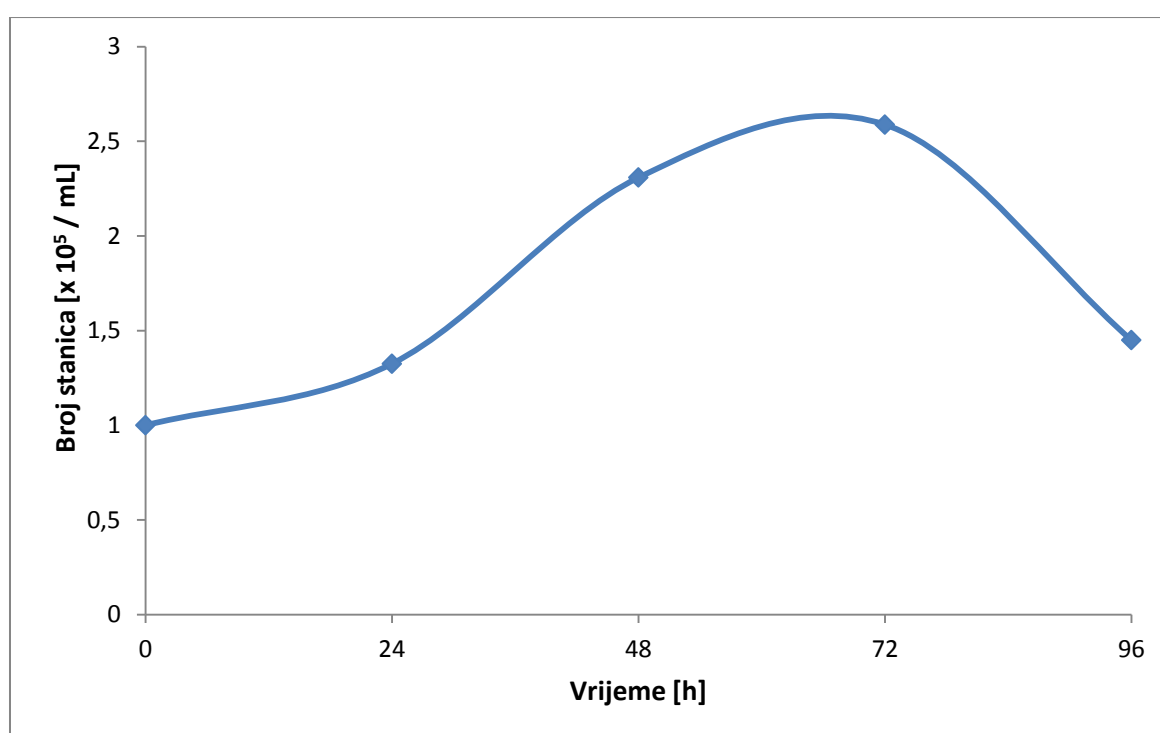
Nakon tretmana stanica sa proteinskim hidrolizatima konoplje, u svaku jažicu dodano je 10  $\mu$ L MTS reagensa, te su stanice inkubirane 3 sata pri kontroliranim uvjetima atmosfere (95% zraka i 5% CO<sub>2</sub>) i temperature (37°C). Apsorbancija je izmjerena na čitaču mikrotitarskih ploča pri valnoj duljini od 492 nm. Dobiveni rezultati izraze se kao postotak preživljenja tretiranih stanica u odnosu na kontrolne (netretirane) stanice, prema sljedećem izrazu:

$$\text{Preživljenje (\%)} = [ A_{492} (\text{tretirane stanice}) / A_{492} (\text{kontrolne stanice}) ] \times 100$$

## 4. REZULTATI

### 4.1. Krivulja rasta i utrošak glukoze tijekom uzgoja stanične linije MCF-7

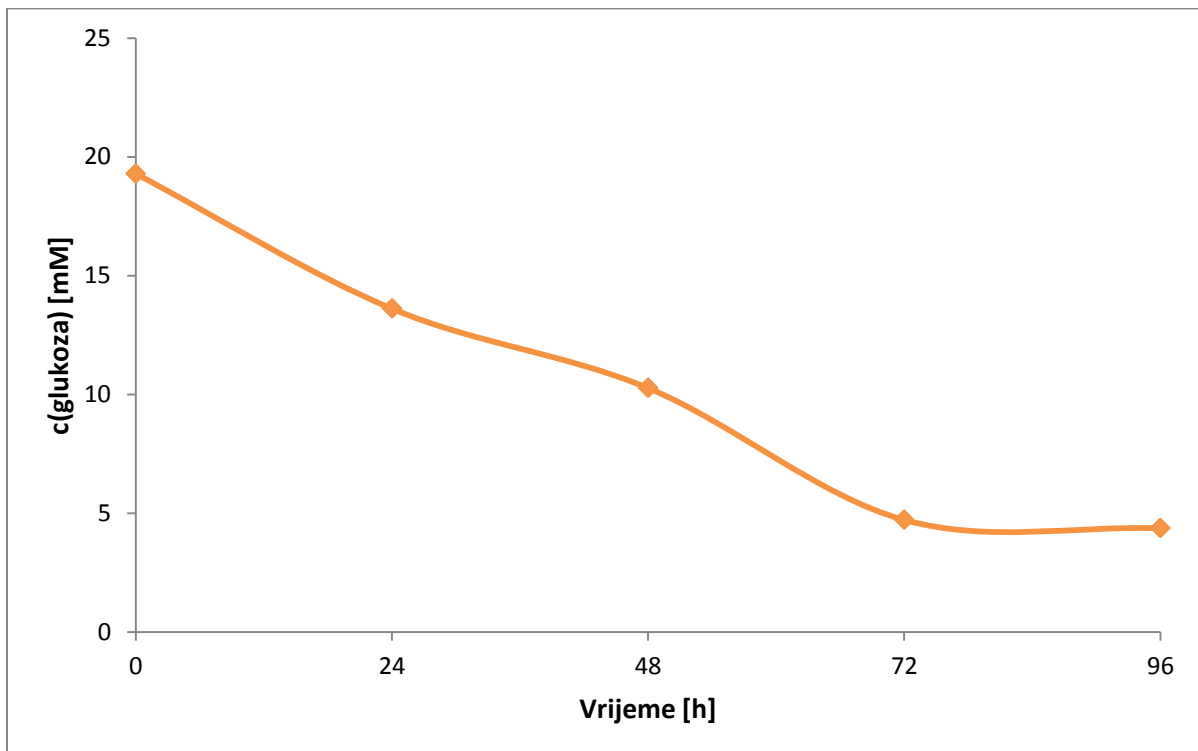
Prethodno uzgojene stanice MCF-7, naciepljene su u ploču s 12 jažica u početnoj koncentraciji  $1 \times 10^5$  st/mL. Stanice su uzgajane tijekom 96 sati, u 0,5 mL DMEM medija za uzgoj s 10% FBS-a. Dinamika rasta praćena je svaka 24 sata, brojanjem stanica u Neubauer-ovoj komorici uz dodatak boje tripan-plavo. Iz dobivenih rezultata konstruirana je krivulja rasta MCF-7 stanica uzgajanih tijekom 96 sati na DMEM mediju s 10% FBS-a (Slika 1.).



**Slika 1.** Krivulja rasta MCF-7 stanica uzgajanih tijekom 96 h na DMEM mediju s 10% FBS-a

Na temelju krivulje rasta izračunati su parametri rasta stanica MCF-7 uzgajanih tijekom 96 h u DMEM mediju sa 10% FBS-a. Maksimalna koncentracija MCF-7 stanica od  $2,588 \times 10^5$  st/mL postignuta je nakon 72 h, iako je iz krivulje rasta vidljivo da se tada većina stanica nalazi u stacionarnoj fazi rasta zbog neznatnog prirasta stanica ( $2,79 \times 10^4$  st/mL) u odnosu na eksponencijalnu fazu rasta (između 24 i 48 h) kada je postignut 3 puta veći prirast stanica ( $9,83 \times 10^4$  st/mL). Osim toga, nakon 72 h uzgoja zapaženo je da se većina stanica nalazi u fazi odumiranja. Prinos stanica tijekom 96 h uzgoja iznosi  $1,588 \times 10^5$  st/mL, uz specifičnu brzinu rasta ( $\mu$ ) od  $0,023 \text{ h}^{-1}$  i vrijeme udvostručenja ( $t_D$ ) od 30,137 h u log fazi rasta.

Osim uzgoja MCF-7 stanica, praćena je i koncentracija glukoze u mediju za uzgoj s ciljem utvrđivanja povezanosti između rasta stanica i potrošnje glukoze (Slika 2.). U tu svrhu, svaka 24 h prikupljani su uzorci medija u kojima su stanice rasle, te je određena koncentracija glukoze pomoću glukoza PAP testa. Početna koncentracija glukoze u mediju iznosila je 19,26 mM, dok je na kraju uzgoja izmjerena koncentracija glukoze od 4,37 mM. Također, prema Slici 2. vidljivo je da se koncentracija glukoze u mediju tijekom uzgoja smanjuje, što ukazuje na činjenicu da stanice troše glukozu kao izvor energije.



**Slika 2.** Utrošak glukoze u mediju (DMEM + 10% FBS) za uzgoj MCF-7 stanica tijekom 96 sati

Maksimalna potrošnja glukoze u mediju zapažena je u prva 24 h uzgoja (5,64 mM), dok je minimalna potrošnja glukoze zapažena između 72 i 96 h uzgoja (0,34 mM). Ukupna potrošnja glukoze u mediju iznosila je 14,92 mM, dok je specifična brzina potrošnje glukoze iznosila  $1,22 \times 10^{-9}$  mmol/(st h).

## 4.2. Učinak proteinskih hidrolizata konoplje na proliferaciju tumorske stanične linije MCF-7

Kako bi se priredile željene koncentracije proteinskih hidrolizata konoplje za ispitivanje biološkog učinka na MCF-7 stanicama, prije postavljanja pokusa, metodom po Lowry-ju određena je ukupna koncentracija proteina u proteinskim hidrolizatima. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 1.

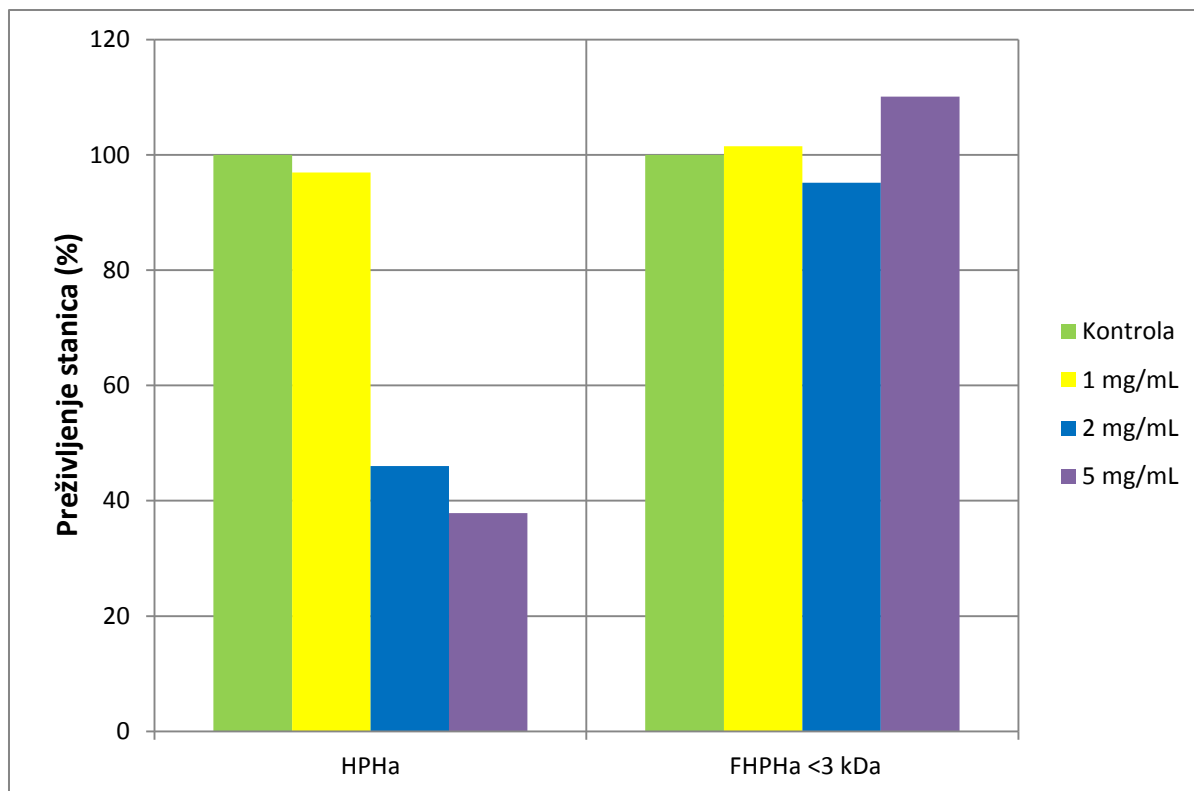
**Tablica 1.** Ukupne koncentracije proteina određene u proteinskim hidrolizatima konoplje

Proteinski hidrolizat konoplje	Koncentracija proteina (mg/mL)
HPHa	59,81
FHPHa <3 kDa	19,20

\*HPHa – označava proteinski hidrolizat konoplje koji sadrži sve proteinske fragmente dobivene enzimskom hidrolizom primjenom alkalaze

\*FHPHa <3 kDa – označava frakciju proteinskog hidrolizata konoplje dobivenu korištenjem ultrafiltracijske membrane, koja sadrži samo proteinske fragmente <3 kDa

Za određivanje biološke aktivnosti proteinskih hidrolizata konoplje, prethodno uzgojene MCF-7 stanice naciepljene su u mikrotitarsku ploču s 96 jažica u početnoj koncentraciji od  $5 \times 10^4$  st/mL. 24 sata nakon naciepljivanja, stanice su tretirane sa proteinskim hidrolizatima konoplje (spomenuta u Tablici 1.) u koncentracijama 1, 2 i 5 mg/mL. Nakon 72-satnog tretmana, MTS metodom određena je vijabilnost stanica, a rezultati su prikazani kao graf ovisnosti postotka preživljenja stanica o koncentraciji korištenih proteinskih hidrolizata konoplje (Slika 3.).



**Slika 3.** Učinak proteinskih hidrolizata konoplje na vijabilnost MCF-7 stanica

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da proteinski hidrolizat konoplje (HPHa) ima inhibitorno djelovanje na rast MCF-7 stanica pri koncentracijama 2 i 5 mg/mL proteina, te slijedi pravilo doza-učinak, odnosno povećanjem koncentracije proteinskog hidrolizata povećava se inhibicija rasta stanica. Maksimalna koncentracija proteinskog hidrolizata konoplje kojom su tretirane MCF-7 stanice iznosi 5 mg/mL i uzrokuje inhibiciju 62,17% populacije, te je ujedno pri toj koncentraciji postignut maksimalni inhibitorni učinak.

Međutim, frakcija proteinskog hidrolizata konoplje (FHPHa <3 kDa) pri nižim ispitivanim koncentracijama nije djelovala niti stimulatивно niti inhibitorno na rast MCF-7 stanica, dok je pri maksimalnoj ispitivanoj koncentraciji (5 mg/mL) zapažen blago stimulatívni učinak na rast stanica (10,07%).

## 5. RASPRAVA

Stanične linije se često koriste u ispitivanju biološke aktivnosti spojeva prisutnih u biljkama, kao i proizvoda dobivenih iz njih. Primjena staničnih kultura u *in vitro* testovima citotoksičnosti temelji se na interakciji ispitivane tvari i bioloških sustava, koja se primarno odvija na staničnoj razini. Takvim testovima najčešće se određuje učinak ispitivane tvari na preživljenje stanica u kulturi tzv. bazalna citotoksičnost. Iako *in vitro* testovi ne mogu u potpunosti odgovoriti na pitanja tkivno-specifične toksičnosti, pojavu adaptivnog odgovora te metaboličke promjene koje se zbivaju u živom organizmu, rezultati dobiveni *in vitro* testovima mogu poslužiti kao smjernice za daljnja *in vivo* istraživanja. Također, u prilog im ide i činjenica da se rezultati istraživanja toksičnosti primjenom različitih *in vitro* i *in vivo* testova podudaraju za oko 80%, kao i da omogućuju brža i ekonomičnija istraživanja u odnosu na *in vivo* istraživanja (Radojčić-Redovniković i sur., 2016).

Kako bi se primjenom kulture stanica u raznim eksperimentima dobili reprezentativni i reproducibilni rezultati, stanice je potrebno održavati u eksponencijalnoj fazi rasta. Stoga je nužno prije postavljanja eksperimenata poznavati rast i kinetičke parametre rasta određenog tipa stanica, prema kojima je moguće odrediti optimalnu početnu koncentraciju stanica kao i vrijeme između dva uzastopna precjepljivanja za uspješno provođenje eksperimenta. Prema tome, prvi cilj ovog rada bio je odrediti krivulju rasta i kinetičke parametre rasta MCF-7 stanica.

Za određivanje krivulje rasta MCF-7 stanica, prethodno uzgojene stanice nacijepljene su u ploču s 12 jažica te su uzgajane u inkubatoru tijekom 96 h, pri kontroliranim uvjetima atmosfere (5% CO<sub>2</sub> i 95% zraka) i temperature (37°C). Svaka 24 h određen je broj stanica brojanjem u Neubauer-ovoj komorici uz dodatak boje tripan-plavo. Dobiveni rezultati prikazani su grafički kao krivulja rasta MCF-7 stanične linije (Slika 1.). Na temelju krivulje rasta izračunati su parametri rasta MCF-7 stanica. Iako nema točnih saznanja o kinetičkim parametrima rasta navedene stanične linije, Sutherland i sur. (1983) navode da su mnoga prijašnja istraživanja pokazala da je prosječno vrijeme udvostručenja MCF-7 stanica 36 sati, iako su rezultati njihovog istraživanja pokazali da ono iznosi 24 sata. Iz navedenih istraživanja može se zaključiti da kinetički parametri MCF-7 stanične linije podosta variraju, te da uvelike ovise o vrsti korištenog medija za uzgoj, vrsti i količini seruma dodanog u medij te o gustoći stanica u inokulumu. Budući da je vrijeme udvostručenja stanica u korelaciji sa specifičnom brzinom rasta, te da vrijednost dobivena u ovom istraživanju odgovara rasponu vrijednosti prijašnjih istraživanja, može se zaključiti da su parametri kinetike rasta MCF-7 stanica u skladu s prijašnjim istraživanjima.



Također, tijekom uzgoja MCF-7 stanica praćen je i utrošak glukoze u mediju za uzgoj, s ciljem utvrđivanja povezanosti između rasta stanica i potrošnje glukoze. U tu svrhu, svaka 24 h prikupljani su uzorci medija te je glukoza PAP testom određena koncentracija glukoze u uzorcima. Dobiveni rezultati prikazani su kao graf ovisnosti koncentracije glukoze o vremenu uzgoja (Slika 2.). Na temelju dobivenih rezultata prikazanih na Slici 1. i Slici 2. vidljivo je kako se porastom broja stanica smanjuje koncentracija glukoze u mediju iz čega se može zaključiti kako stanice troše glukozu kao izvor energije. Međutim, u stacionarnoj fazi rasta postignut je značajno manji prinos stanica u odnosu na eksponencijalnu fazu rasta, iako je potrošnja glukoze u ove dvije faze bila gotovo jednaka. To upućuje na činjenicu da osim kao izvor energije stanice troše glukozu i kao izvor ugljika za produkciju staničnih metabolita, jer iako nema značajnijeg porasta stanica u stacionarnoj fazi rasta, one su i dalje metabolički aktivne (Butler, 2004). Također, iz rezultata je vidljivo da se nakon 72 sata uzgoja većina stanica nalazi u fazi odumiranja, što se podudara sa vrijednostima dobivenim za potrošnju glukoze u tom vremenskom intervalu, koja gotovo stagnira.

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti da je MCF-7 stanice potrebno pasažirati svaka 2-3 dana, kako bi se održale u eksponencijalnoj fazi rasta, te da stanice troše glukozu za svoj rast i održavanje. Međutim, provedeno istraživanje ne otkriva da li rast MCF-7 stanica ovisi isključivo o prisustvu glukoze ili i o nekim drugim nutrijentima prisutnim u mediju za uzgoj.

Tijekom godina, otkriveno je mnoštvo bioaktivnih peptida, dobivenih iz proteina porijeklom iz prirodnih izvora (životinje, biljke itd.), kojima su dokazani razni biološki učinci koji mogu poboljšati ljudsko zdravlje. Klasični pristup otkrivanja ovih peptida podrazumijeva enzimsku hidrolizu proteina primjenom prikladnih proteaza, pri čemu nastaje hidrolizat proteina koji sadrži brojne peptidne fragmente. Zatim se ispituje biološka aktivnost dobivenih hidrolizata u *in vitro* uvjetima te ako rezultati pokažu dobru biološku aktivnost ona se potvrđuje *in vivo* ispitivanjima. Biološki aktivni hidrolizati, kao i pročišćeni peptidi se nakon provedenih testiranja mogu primjeniti u razvoju funkcionalne hrane i nutraceutika, koji se mogu koristiti u prevenciji nastanka kao i u liječenju raznih kroničnih oboljenja (Daliri i sur., 2017). Stoga je, drugi cilj ovog rada bio ispitati biološki učinak proteinskih hidrolizata konoplje na rast i proliferaciju tumorske stanične linije MCF-7. Prethodno uzgojene stanice nacijepljene su u mikrotitarsku ploču s 96 jažica. Stanice su zatim inkubirane 24 sata u uvjetima kontrolirane atmosfere (5% CO<sub>2</sub> i 95% zraka) i temperature (37°C), kako bi se adaptirale na novonastale uvjete. Nakon vremena prilagodbe, MCF-7 stanice su tretirane s proteinskim hidrolizatom konoplje (HPHa) kao i s frakcijom proteinskog hidrolizata konoplje (FHPHa <3 kDa), u

koncentracijama 1, 2 i 5 mg/mL. Tretman stanica trajao je 72 sata, nakon čega je MTS metodom određena vijabilnost stanica. Dobiveni rezultati iskazani su kao graf ovisnosti postotka preživljenja stanica o koncentraciji proteinskog hidrolizata konoplje (Slika 3.). Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako proteinski hidrolizat konoplje (HPHa) inhibira rast i proliferaciju MCF-7 stanične linije slijedeći ovisnost doza-učinak. Maksimalna inhibicija rasta postignuta je pri maksimalnoj koncentraciji proteinskog hidrolizata konoplje te izaziva inhibiciju od 62,17%. Međutim, frakcija proteinskog hidrolizata konoplje (FHPHa <3 kDa) pri nižim koncentracijama nije djelovala niti stimulatивно niti inhibitorno, dok je pri maksimalnoj ispitivanoj koncentraciji (5 mg/mL) zapažen blago stimulatívni učinak od 10,07%. Prema dosadašnjim saznanjima nisu provedena istraživanja o antiproliferativnom učinku proteinskih hidrolizata konoplje. Međutim, brojna istraživanja koja su provedena u svrhu ispitivanja antiproliferativnog učinka proteinskih hidrolizata iz raznih biljnih izvora upućuju na nekoliko činjenica koje mogu utjecati na antiproliferativnu aktivnost proteinskih hidrolizata. Odabir enzima, trajanje hidrolize, kao i stupanj hidrolize proteina imaju ključnu ulogu u dobivanju biološki aktivnih proteinskih frakcija i hidrolizata. Primjerice, Jahanbani i sur. (2016) su u svom istraživanju antitumornog potencijala hidrolizata oraha i njegovih frakcija dokazali da najjače inhibitorno djelovanje imaju proteinski hidrolizati dobiveni hidrolizom pomoću kimotripsina u trajanju od 1 h. Oni pretpostavljaju da se varijacije u inhibitornom učinku pojavljuju zbog različitih aminokiselinskih sekvenci prisutnih u različitim hidrolizatima. Također, istraživanja su provodili na MDA-MB231 i HT-29 tumorskoj staničnoj liniji te je jači inhibitorni učinak zapažen na MDA-MB231 tumorskoj staničnoj liniji. S druge strane, Kannan i sur. (2009) su ispitivali antitumorni učinak frakcija proteinskih hidrolizata riže (>50, 10-50, 5-10 i <5 kDa) na HCT-116 i HTB-26 tumorskoj staničnoj liniji te je jaki inhibitorni učinak zapažen kada su stanice bile tretirane s 500 µg/mL, odnosno 750 µg/mL frakcije proteinskog hidrolizata riže <5 kDa. Iz navedenih istraživanja može se zaključiti da hidrolizati proteina iz biljnih izvora imaju potencijalno antitumorno djelovanje, ali da ono ovisi o nizu faktora prethodno navedenih kao i o profilu samih proteina prisutnih u biljci.

Iz istraživanja provedenog u ovom radu, može se zaključiti da proteinski hidrolizat konoplje ima snažan inhibitorni učinak pri maksimalnoj ispitivanoj koncentraciji od 5 mg/mL na rast i proliferaciju MCF-7 stanične linije, te se taj učinak može pripisati proteinskim frakcijama većim od 3 kDa. Međutim, za utvrđivanje potencijalnog antitumornog djelovanja provedeno istraživanje trebalo bi proširiti tako da se ispita djelovanje proteinskih hidrolizata konoplje dobivenih različitim proteazama, s različitim stupnjem hidrolize i različitim vremenom hidrolize. Isto tako, ispitivanja bi trebalo provesti sa različitim frakcijama proteinskih

hidrolizata (npr. 3-5, 5-10, 10-50, >50 kDa ) te ispitati njihov učinak na različitim tumorskim, kao i na normalnim staničnim linijama. Ako bi se inhibitorni učinak primjetio samo na tumorskim staničnim linijama, provedena istraživanja mogla bi se dalje potvrditi raznim *in vivo* istraživanjima. Nakon potvrde *in vivo* ispitivanjima, proteinski hidrolizati konoplje kao i njihove frakcije mogli bi se primjeniti u razvoju terapeutika.

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata iz provedenog istraživanja, može se zaključiti sljedeće:

1. Uzgojem MCF-7 stanične linije tijekom 96 sati u DMEM mediju s 10% FBS-a postignut je prinos stanica od  $1,588 \times 10^5$  st/mL, sa specifičnom brzinom rasta ( $\mu$ ) od  $0,023 \text{ h}^{-1}$  i vremenom udvostručenja stanica ( $t_D$ ) od 30,137 h u log fazi rasta.
2. Tijekom 96 sati uzgoja MCF-7 stanica u DMEM mediju s 10% FBS-a utrošeno je ukupno 14,92 mM glukoze, sa specifičnom brzinom potrošnje glukoze od  $1,22 \times 10^{-9} \text{ mmol}/(\text{st h})$ .
3. Metodom po Lowry-ju određene su koncentracije proteina u proteinskom hidrolizatu konoplje (HPHa) i frakciji proteinskog hidrolizata konoplje (FHPHa <3 kDa) te su iznosile 59,81 mg/mL, odnosno 19,20 mg/mL.
4. Dodatak proteinskog hidrolizata konoplje (HPHa) u koncentracijama 2 i 5 mg/mL djeluje inhibirajuće na rast i proliferaciju MCF-7 stanične linije u rasponu od 53,96% do 62,17%.
5. Dodatak frakcije proteinskog hidrolizata konoplje (FHPHa <3 kDa) u koncentracijama 1 i 2 mg/mL ne pokazuje nikakav učinak na rast i proliferaciju MCF-7 stanične linije, dok je pri maksimalnoj ispitivanoj koncentraciji od 5 mg/mL zapažen blago stimulatívni učinak (10,07%).

## 7. LITERATURA

Agyei D., Pan S., Acquah C., Bekhit A.E.A., Danquah M.K. (2017) Structure-informed detection and quantification of peptides in food and biological fluids, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfbc.12482>, pristupljeno 27. kolovoza 2018.

Arab-Bafrani Z., Shahbazi-Gahrouei D., Abbasian M., Fesharaki M. (2016) Multiple MTS Assay as the Alternative Method to Determine Survival Fraction of the Irradiated HT-29 Colon Cancer Cells. *Journal of Medical Signals and Sensors* **6**: 112-116.

Arango M. T., Quintero-Ronderos P., Castiblanco J., Montoya-Ortíz G. (2013) Cell culture and cell analysis. U: Autoimmunity: From Bench to Bedside, Anaya J.M., Shoenfeld Y., Rojas-Villarraga A., Levy R.A., Cervera R., ur., El Rosario University Press, Kolumbija, str. 741-754.

Butler M. (2004) *Animal Cell Culture and Technology*, 2. izd., Garland Science/Bios Scientific Publishers, New York.

Butler M. (2015) Serum and Protein Free Media. U: *Cell Engineering: Animal Cell Culture*, Al-Rubeai, ur., Springer International Publishing, str. 223-236.

Castilho L.R., Moraes A.M., Augusto E.F.P., Butler M. (2008) *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, Taylor & Francis, New York.

Cicero A.G.F., Fogacci F., Colletti A. (2017) Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. *British Journal of Pharmacology* **174**: 1378–1394.

Comşa Ş., Cîmpean A.M., Raica M. (2015) The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research* **35**: 3147-3154.

Cooper G.M., Hausman R.E. (2004) *Stanica - Molekularni pristup*, 3. izd., Medicinska naklada Zagreb, str. 29-33.

Daliri E.B.M., Oh D.H., Lee B.H. (2017) Bioactive Peptides. *Foods* **6**: 32.

Di Bernardini R., Harnedy P., Bolton D., Kerry J., O'Neill E., Mullen A. M., Hayes M. (2011) Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry* **124**: 1296-1307.

Freshney I.R. (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 5. izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

- Girgih A.T., Alashi A., He R., Malomo S., Aluko R.E. (2013) Preventive and treatment effects of a hemp seed (*Cannabis sativa L.*) meal protein hydrolysate against high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Nutrition* **53**: 1237-1246.
- Girgih A.T., He R., Malomo S., Offengenden M., Wu J., Aluko R.E. (2014) Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa L.*) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides. *Journal of Functional Foods* **6**: 384-394.
- Girgih A.T., Udenigwe C.C., Aluko R.E. (2011) *In Vitro* Antioxidant Properties of Hemp Seed (*Cannabis sativa L.*) Protein Hydrolysate Fractions. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **88**: 381-389.
- Gnasegaran G. K., Acquah C., Danquah M.K., Agyei D., Pan S., Sarethy I.P. (2017) Process Development for Bioactive Peptide Production. U: Food Bioactives: Extraction and Biotechnology Applications, Puri M., ur., Springer, str. 91-100.
- Hadnađev M., Dizdar M., Dapčević Hadnađev 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.
- Jahanbani R., Ghaffari S.M., Salami M., Vahdati K., Sepehri H., Sarvestani N.N., Sheibani N., Moosavi-Movahedi A.A. (2016) Antioxidant and Anticancer Activities of Walnut (*Juglans regia L.*) Protein Hydrolysates Using Different Proteases. *Plant Foods for Human Nutrition* **71**: 402-409.
- Kannan A., Hettiarachchy N., Narayan S. (2009) Colon and Breast Anti-cancer Effects of Peptide Hydrolysates Derived from Rice Bran. *The Open Bioactive Compounds Journal* **2**: 17-20.
- Khanal S. (2017) Animal Cell Culture: Introduction, Types, Methods and Applications, <https://microbeonline.com/animal-cell-culture-introduction-types-methods-applications/>, pristupljeno 06.kolovoza 2018.
- Kitts D.D., Weiler K. (2003) Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design* **9**: 1309-1323.
- Korhonen H., Pihlanto A. (2003) Food-derived Bioactive Peptides - Opportunities for Designing Future Foods. *Current Pharmaceutical Design* **9**: 1297-1308.

- Lemes A.C., Sala L., da Costa Ores J., Cavalcante Braga A.R., Buranelo Egea M., Fernandes K. F. (2016) A Review of the Latest Advances in Encrypted Bioactive Peptides from Protein-Rich Waste. *International Journal of Molecular Sciences* **17**: 950.
- Levenson A.S., Jordan V.C. (1997) MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line. *Cancer Research* **57**: 3071-3078.
- Nasri M. (2017) Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review. *Advances in Food and Nutrition Research* **81**: 109-159.
- Noble J.E., Bailey M.J. (2009) Quantitation of protein. *Methods in Enzymology* **463**: 73-95.
- Radojčić Redovniković I., Cvjetko Bubalo M., Gaurina Srček V., Radošević K. (2016) The use of cell cultures for determination of biological activity of the compounds from plants. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**: 169-175.
- Sutherland R.L., Hall R.E., Taylor I.W. (1983) Cell Proliferation Kinetics of MCF-7 Human Mammary Carcinoma Cells in Culture and Effects of Tamoxifen on Exponentially Growing and Plateau-Phase Cells. *Cancer Research* **43**: 3998-4006.
- Yan X., Tang J., dos Santos Passos C., Nurisso A., Simões-Pires C.A., Ji M., Lou H., Fan P. (2015) Characterization of Lignanamides from Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seed and Their Antioxidant and Acetylcholinesterase Inhibitory Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**: 10611-10619.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Jelena Kosanović

ime i prezime studenta