

Priprava i in vitro biološka aktivnost hidrolizata proteina iz pogače lana

Bis, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:102713>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Ana Bis
1035/MB

**PRIPRAVA I *in vitro* BIOLOŠKA
AKTIVNOST HIDROLIZATA
PROTEINA IZ POGAČE LANA**

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. Višnji Gaurini Srček na uloženom trudu i vremenu te prenesenom znanju. Također, željela bih zahvaliti Marijanu Logarušiću, mag. ing. i Manueli Panić, mag. ing. na pomoći prilikom provedbe eksperimentalnog dijela ovog rada, kao i svim ostalim zaposlenicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije.

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

PRIPRAVA I *in vitro* BIOLOŠKA AKTIVNOST HIDROLIZATA PROTEINA IZ POGAČE LANA

Ana Bis, 1035/MB

Sažetak: Lanena pogača, koja zaostaje nakon izdvajanja ulja iz lanenih sjemenki, dugo vremena se smatrala nusproizvodom unatoč značajnom sadržaju proteina. Enzimskom hidrolizom proteina izdvojenih iz pogače lana moguće je pripremiti bioaktivne peptide koji se mogu koristiti kao dodatak prehrani ili za prevenciju određenih oboljenja. Cilj ovog rada bio je pripremiti i ispitati biološka svojstva proteinskih hidrolizata iz pogače lana u *in vitro* uvjetima. Proteinski hidrolizati lana pripremljeni su s tri različita hidrolitička enzima (Alkalaza, Neutraza, Protamex) nakon čega je ORAC metodom određen njihov antioksidacijski potencijal. Učinak proteinskih hidrolizata lana na proliferaciju stanica određen je na HeLa i HaCaT staničnoj liniji. HaCaT stanična linija korištena je i za određivanje protektivnog djelovanja hidrolizata lana nakon indukcije oksidacijskog stresa pomoću H₂O₂. Dobiveni rezultati ukazuju da pripremljeni hidrolizati lana posjeduju visoku antioksidacijsku aktivnost koja se povećava s vremenom hidrolize. Hidrolizat lana pripremljen enzimom Alkalazom pokazao je antiproliferacijski učinak u HeLa stanicama. Ujedno je utvrđeno da svi pripremljeni proteinski hidrolizati pokazuju stimulacijski učinak na proliferaciju HaCaT stanica, pri čemu je taj učinak najizraženiji za hidrolizat pripremljen enzimom Alkalazom. Proteinski hidrolizat pripremljen enzimom Alkalazom pokazao je protektivni učinak nakon indukcije oksidacijskog stresa u kulturi HaCaT stanica.

Ključne riječi: pogača lana, proteinski hidrolizati, antioksidacijsko djelovanje, proliferacija

Rad sadrži: 41 stranicu, 11 slika, 55 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Pomoć pri izradi: Marijan Logarušić, mag. ing.

Manuela Panić, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević
2. Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček
3. Doc. dr. sc. Teuta Murati
4. Doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc-zamjena

Datum obrane: 30. rujan 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

PREPARATION AND *in vitro* BIOLOGICAL ACTIVITY OF PROTEIN HYDROLYSATES OBTAINED FROM FLAXSEED MEAL

Ana Bis, 1035/MB

Abstract: Flaxseed meal was for a long time considered as a by-product after obtaining oil from flaxseed despite its high protein content. Peptides with biological activity can be prepared by enzymatic hydrolysis and be used as a dietary supplement or for disease prevention. The aim of this thesis was to investigate biological activity of protein hydrolysates from flaxseed meal in *in vitro* conditions. Protein hydrolysates were prepared using different hydrolytic enzymes and ORAC method was used to determine their antioxidant capacity. Proliferative effects were studied in two cell lines (HeLa and HaCaT). HaCaT cell line was also used to determine protective effect of flaxseed protein hydrolysates after oxidative stress induction. Results show that flaxseed protein hydrolysates have high antioxidant activity which grows with time of hydrolysis. Cytotoxic activity at HeLa cell line was observed only in hydrolysates obtained by Alcalase. All protein hydrolysates stimulated HaCaT cell proliferation, although the highest effect showed protein hydrolysates obtained by Alcalase. Furthermore, protein hydrolysates obtained by Alcalase showed protective effect after oxidative stress induction in HaCaT cell culture.

Key words: flaxseed meal, protein hydrolysates, antioxidant activity, proliferation

Thesis contains: 41 pages, 11 figures, 55 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: PhD Višnja GaurinaSrček

Technical support and assistance: BSc Marijan Logarušić, Scientific Assistant

BSc Manuela Panić, Scientific Assistant

Reviewers:

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

Thesis defended: 30th September 2019

| Sadržaj | stranica |
|--|-----------------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. Značaj i uloga proteina i peptida iz hrane | 3 |
| 2.1.1. Antioksidacijsko djelovanje proteinskih hidrolizata | 3 |
| 2.1.2. Antitumorsko djelovanje proteinskih hidrolizata..... | 4 |
| 2.1.3. Imunomodulacijsko i protuupalno djelovanje proteinskih hidrolizata | 6 |
| 2.1.4. Lan kao izvor biološki aktivnih spojeva..... | 7 |
| 2.2. Oksidacijski stres u stanicama | 9 |
| 2.2.1. Oksidacijski stres u kulturi stanica..... | 10 |
| 2.2.2. Metode određivanja oksidacijskog stresa | 11 |
| 2.3. Kulture životinjskih stanica | 12 |
| 2.3.1. Primjena hidrolizata proteina u medijima za uzgoj životinjskih stanica | 13 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 15 |
| 3.1. Materijali | 15 |
| 3.1.1. Kemikalije..... | 15 |
| 3.1.2. Otopine i puferi..... | 15 |
| 3.1.3. Uređaji i oprema | 16 |
| 3.1.4. Stanična linija HaCaT | 17 |
| 3.1.5. Stanična linija HeLa..... | 17 |
| 3.2. Metode rada | 18 |
| 3.2.1. Enzimski hidroliza proteinskog izolata lana i određivanje stupnja hidrolize | 18 |
| 3.2.2. Određivanje antioksidacijskog potencijala hidrolizata proteina lana ORAC metodom..... | 18 |
| 3.2.3. Određivanje učinka hidrolizata proteina lana na proliferaciju HaCaT i HeLa stanica MTS metodom | 19 |
| 3.2.4. Određivanje učinaka hidrolizata proteina lana na inducirani oksidacijski stres u HaCaT stanicama DCFH-DA metodom..... | 20 |
| 3.2.5. Statistička obrada rezultata..... | 21 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 22 |
| 4.1. Priprava hidrolizata proteina lana | 23 |
| 4.2. Antioksidacijski potencijal pripremljenih hidrolizata proteina lana | 27 |
| 4.3. Učinci hidrolizata proteina lana na proliferaciju HeLa i HaCaT stanične linije | 30 |
| 4.4. Učinci hidrolizata proteina lana na inducirani oksidacijski stres u HaCaT staničnoj liniji | 34 |
| 5. ZAKLJUČCI | 36 |
| 6. LITERATURA | 37 |

1. UVOD

Od davnina je poznato da hrana, osim osnovne životne potrebe, predstavlja izvor tvari korisnih za ljudsko zdravlje. Tako je, prije više od 2500 godina, Hipokrat uspostavio načelo „Neka hrana bude tvoj lijek, a neka lijek bude tvoja hrana“. Ipak, ta je filozofija pala u drugi plan tijekom 19. stoljeća kada je svoj procvat doživjela suvremena terapija lijekovima. Tek je pedesetih godina prošlog stoljeća uviđena važnost konzumacije hrane s niskim udjelom zasićenih masnih kiselina, odnosno hrane biljnog podrijetla, u sprječavanju kroničnih bolesti kao što su srčana oboljenja, tumori, osteoporoza i dijabetes. Osim navedenih oboljenja, pojave kao što su starenje, zdravstveno osvijestena populacija i promjene u zakonskim odrednicama vezanim uz hranu dovele su do razvoja trenda nazvanog funkcionalna hrana. Iako je sva hrana u jednom pogledu funkcionalna jer ima određenu nutritivnu vrijednost, pod pojmom funkcionalne hrane smatra se hrana koja ima pozitivne fiziološke učinke na ljudsko zdravlje i time smjenjuje rizik od razvoja kroničnih bolesti ili na neki drugi način pridonosi poboljšanju zdravlja.

Lan (*Linum usitatissimum* L.) je biljka dugo korištena kroz povijest i služila je kao izvor ulja za industrijske boje, ali i kao hrana. Znanstveni radovi objavljeni u posljednjih nekoliko godina pokazali su da proteini iz lana mogu poslužiti kao izvor bioaktivnih peptida koji djeluju kao inhibitori angiotenzin-konvertirajućeg enzima ili neutraliziraju slobodne radikale. Osim navedenog, pozitivan učinak peptida dobivenih iz lana očituje se u svojstvima koja pridonose poboljšanju zdravlja te uključuju antimikrobno, antihipertenzijsko, protuupalno i antioksidacijsko djelovanje. Stoga peptidi dobiveni iz lanenih proteina mogu poslužiti kao koristan dodatak funkcionalnoj hrani i na taj način spriječiti i/ili odgoditi razvoj navedenih kroničnih bolesti (Nwachukwu i Aluko, 2018).

Slobodni radikali kao što su reaktivne kisikove vrste (eng. *Reactive Oxygen Species – ROS*) uključuju vodikov peroksid, hidroksilne radikale, radikale superoksidnog aniona, a nastaju tijekom normalnog staničnog metabolizma. ROS, zbog svoje visoke reaktivnosti, imaju mogućnost inducirati oksidacijska oštećenja makromolekula kao što su lipidi, proteini i nukleinske kiseline unutar stanice. Tijekom izlaganja stanica oksidacijskom stresu, dolazi do smanjenja razine prirodno prisutnih antioksidansa u stanici. To za posljedicu ima pojavu oštećenja posredovanu radikalima koja mogu rezultirati kroničnim degenerativnim bolestima

kao što su hipertenzija, ateroskleroza, preuranjeno starenje, dijabetes te oštećenja tkiva povezana s upalom.

Uzimajući u obzir sve navedeno, cilj ovog diplomskog rada bit će pripraviti proteinske hidrolizate iz proteina izoliranih iz uljne pogače lana pomoću tri različita enzima: Neutraza, Alkalaza i Protamex. Pripravljenim hidrolizatima odredit će se antioksidacijski potencijal ORAC (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metodom. Biološka aktivnost proteinskih hidrolizata s najvišim ORAC vrijednostima istražiti će se u dvije stanične linije: tumorskoj HeLa i normalnoj HaCaT. U obje stanične linije pratit će se imaju li pripravljeni proteinski hidrolizati proliferacijski učinak na stanice, dok će se u HaCaT staničnoj liniji dodatno istražiti imaju li pojedini hidrolizati lana protektivno djelovanje na stanice u kojima je induciran oksidacijski stres pomoću H₂O₂.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Značaj i uloga proteina i peptida iz hrane

Proteini, kao važni makronutrijenti, izvor su esencijalnih aminokiselina i energije. Osim osnovne uloge makronutrijenata, neki proteini iz hrane imaju pozitivan učinak na zdravlje jer njihovom hidrolizom nastaju bioaktivni peptidi (Chalamaiah i sur., 2018). Peptidi niske molekulske mase lakše su probavljivi, biodostupniji te pokazuju veću biološku aktivnost od ishodnih proteina čijom su hidrolizom nastali. Zadnjih je godina dokazano da proteinski hidrolizati posjeduju širok raspon različitih bioloških aktivnosti, uključujući imunomodulatorno, antitumorsko, antihipertenzijsko, antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje (Garcia i sur., 2013). Osim navedenih bioloških aktivnosti, proteinski hidrolizati posjeduju različita fizikalno-kemijska svojstva kao što su topljivost, vezanje lipida te stvaranje emulzija.

Proteinski hidrolizati mogu poslužiti kao dodatak funkcionalnoj hrani te na taj način smanjiti vjerojatnost pojave pojedinih bolesti. Kardiovaskularna oboljenja vodeći su uzrok smrtnosti u svijetu. Povišen krvni tlak, oksidacijski stres uzrokovan slobodnim radikalima te visoka razina kolesterola u krvi neki su od čimbenika koji pridonose razvoju kardiovaskularnih oboljenja. Trenutno, tretman kardiovaskularnih oboljenja uključuje lijekove čiji se mehanizam djelovanja zasniva na inhibiciji angiotenzin-konvertirajućeg enzima, spojeve koji imaju antioksidacijski učinak te one koji snižavaju razinu kolesterola u krvi (Maramba i sur., 2008).

2.1.1. Antioksidacijsko djelovanje proteinskih hidrolizata

Reaktivne kisikove vrste nastaju kao posljedica disanja u aerobnim organizmima te mogu reagirati s DNA, membranskim lipidima i proteinima. Oksidacijski stres je posljedica neravnoteže između oksidacijskih vrsta i prirodnih antioksidansa te je povezan sa starenjem, apoptozom i bolestima kao što su tumori (Garcia i sur., 2013). Antioksidacijski spojevi prisutni su u hrani, a njihovo istraživanje interesantno je ne samo zbog pozitivnih učinaka na zdravlje, već i zbog njihove povezanosti s organoleptičkim svojstvima hrane. Oksidacija lipida posredovana slobodnim radikalima uzrokuje užegao okus, gubitak boje hrane te joj skraćuje rok trajanja. Dodatak sintetskih spojeva s antioksidacijskim svojstvima tijekom obrade hrane postao je uobičajena praksa kako bi se izbjegli navedeni problemi. Zbog mogućih štetnih posljedica sintetskih antioksidansa na ljudsko zdravlje, brojna su istraživanja

orijentirana na pronalazak prirodnih antioksidansa koji mogu zaštititi ljudski organizam, ali i hranu od slobodnih radikala i na taj način usporiti njihovo djelovanje.

Antioksidacijska svojstva proteinskih hidrolizata očituju se u uklanjanju ili suzbijanju reaktivnih kisikovih vrsta i slobodnih radikala te u inhibiciji oksidacije bioloških molekula inducirane reaktivnim kisikovim vrstama. Uklanjanje slobodnih radikala moguće je jer antioksidansi mogu sudjelovati u reakcijama prijenosa jednog elektrona. Prema tome, broj aminokiselinskih ostataka koji mogu prenijeti elektrone na slobodne radikale pri fiziološkom pH može pridonijeti povećanoj antioksidacijskoj aktivnosti. Ostali mehanizmi antioksidacijskog djelovanja peptida uključuju keliranje prijelaznih metala i smanjenje aktivnosti željeza (eng. *Ferric Reducing Power*).

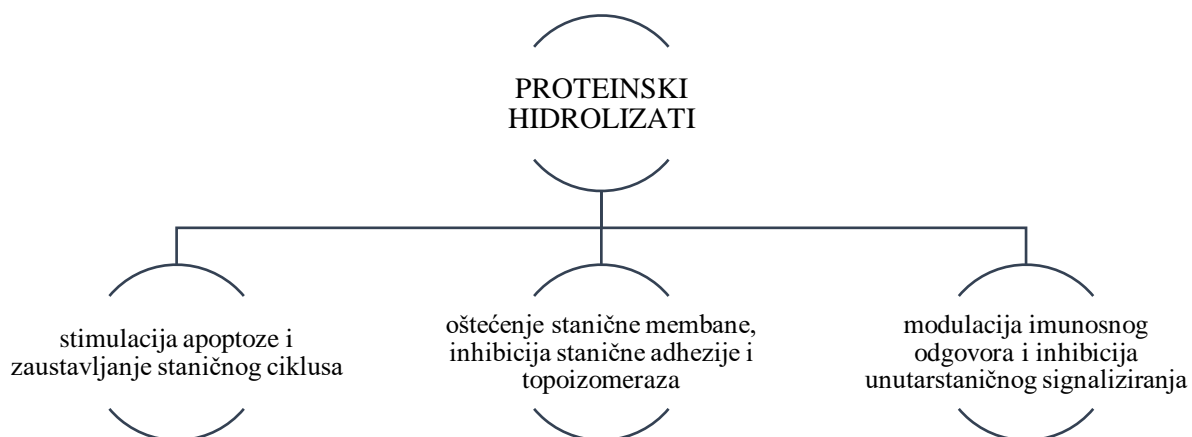
Različiti faktori utječu na antioksidacijsku aktivnost proteinskih hidrolizata, uključujući proteazu korištenu za pripravu hidrolizata, stupanj hidrolize te svojstva nastalih peptida kao što su molekulska masa, hidrofobnost i aminokiselinski sastav. Povećani udio histidina, cisteina, prolina, metionina i aminokiselina s aromatskim pobočnim ograncima u peptidima pridonosi povećanoj antioksidacijskoj aktivnosti peptida. Histidinski pobočni ogranak može kelirati metalne ione i neutralizirati djelovanje reaktivnih kisikovih vrsta, uključujući hidroksilni radikal. Ta se svojstva pripisuju imidazolnoj skupini u pobočnom ogranku histidina koja može sudjelovati u reakcijama prijenosa vodikova atoma i prijenosa jednog elektrona. Peptidi s većim udjelom hidrofobnih aminokiselinskih ogranka pokazuju veće antioksidacijsko djelovanje zbog toga što stupaju u kontakt s hidrofobnim molekulama u stanici kao što su polinezasićeni lanci masnih kiselina. Nadalje, aromatski prstenovi visoke gustoće elektrona koji su sastavni dio fenilalanina, tirozina i triptofana pokazuju sposobnost keliranja metalnih iona, dok fenilalanin na sebe veže \bullet OH radikale što rezultira formiranjem stabilnijih hidroksiliranih derivata. Stoga, specifični doprinos svake pojedine aminokiseline u peptidu uvelike ovisi o prirodi reaktivnih kisikovih vrsta i slobodnih radikala te o reakcijskom mediju (Udenigwe i Aluko, 2012).

2.1.2. Antitumorsko djelovanje proteinskih hidrolizata

Zahvaljujući istraživanjima u zadnjih nekoliko godina došlo se do novih spoznaja o povezanosti pojave tumora i prehrane. Većina se peptida s antitumorskim djelovanjem sastoji od sekvence koju čini 3 do 25 aminokiselina. Antitumorska aktivnost peptida zasnovana je na njihovim strukturnim karakteristikama kao što su aminokiselinski sastav, sekvenca, dužina,

ukupni naboj i hidrofobnost. Hidrofobne aminokiseline povećavaju interakcije između peptida s antitumorskim djelovanjem i vanjske membrane tumorskih stanica što rezultira selektivnim i jačim citotoksičnim učinkom na tumorske stanice. Pokazano je da prisutnost nabijenih (glutaminska kiselina) i heterocikličkih aminokiselina (prolin) može pridonijeti antitumorskoj aktivnosti peptida. Prema istraživanjima, peptidi manjih molekulskih masa i većih udjela hidrofobnih aminokiselina pokazuju veću antitumorsku aktivnost (Chalamaiah i sur., 2018).

Istraživanja provedena na kulturama stanica pokazuju da proteinski hidrolizati antitumorsku aktivnost iskazuju kroz sljedeće mehanizme: stimulacija apoptoze, zaustavljanje staničnog ciklusa, oštećenje stanične membrane, inhibicija stanične adhezije, modulacija imunskog odgovora i inhibicija međustanične komunikacije (Slika 1). Iako je točan mehanizam antitumorskog djelovanja proteinskih hidrolizata iz hrane i dalje nepoznat, zna se da neke aminokiseline kao što su prolin, leucin, glicin, alanin, lizin, serin, treonin, glutamat i tirozin imaju ključnu ulogu u antitumorskom djelovanju proteinskih hidrolizata (Chalamaiah i sur., 2018).



Slika 1. Mehanizam antitumorskog djelovanja proteinskih hidrolzata (prilagođeno prema Chalamaiah i sur., 2018).

Iako je do sada objavljeno mnogo radova koji se bave problematikom antitumorskog djelovanja proteinskih hidrolizata iz biljaka, glavnina je autora u svoj fokus stavila lunasin, peptid koji se može pronaći u soji i nekim drugim žitaricama. Antitumorska svojstva lunasina očituju se u tumorima induciranim kemijskim i viralnim onkogenima, a zasnovana su na modulaciji acetilacije i deacetilacije histona. Lunasin inhibira histon acetil transferaze i na taj način sprječava acetilaciju histona H3 i H4 te zaustavljanje staničnog

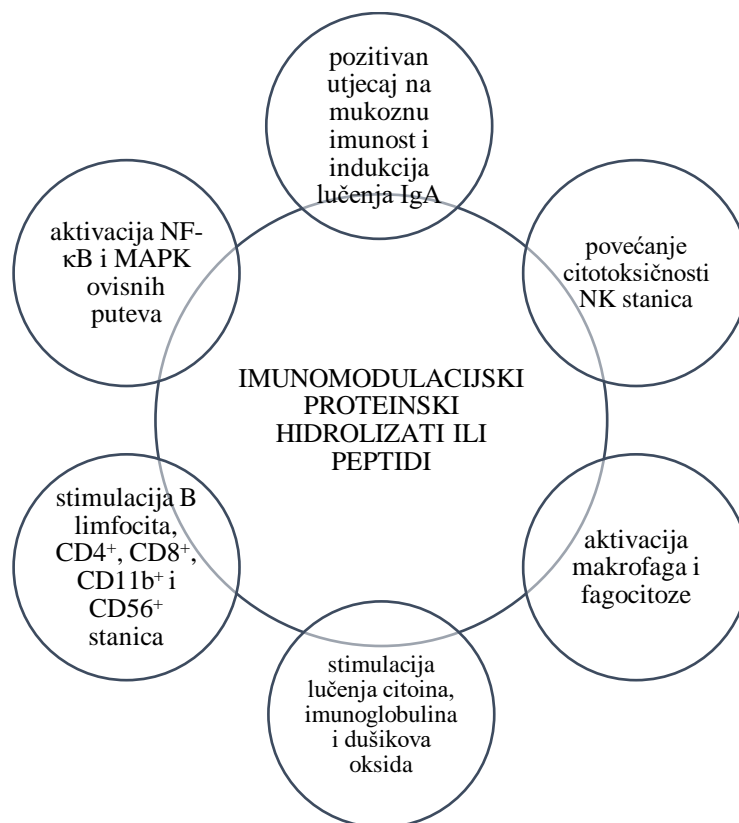
ciklusa i apoptozu tumorskih stanica. Iako lunasin pokazuje jak citotoksičan učinak na tumorske stanice u kulturi, i dalje je upitno hoće li se moći primjenjivati u kliničke svrhe zbog velike molekulske mase koja sprječava apsorpciju i smanjuje njegovu biodostupnost (Udenigwe i Aluko, 2012).

Enzimskom hidrolizom biljnih proteina moguće je pripremiti peptide s antitumorskom aktivnošću. Prema Kim i sur. (2000) proteinski hidrolizat soje dobiven termoazom pokazuje citotoksičan efekt na P388D1 staničnu liniju tako što sprječava prelazak iz G2 u M fazu staničnog ciklusa. Proteinski hidrolizati riže uzrokovali su inhibiciju rasta staničnih linija tumora debelog crijeva (Caco-2, HCT-116), dojke (MCF-7, MDA-MB-231) i jetre (HepG-2) u koncentracijama 600-700 mg mL⁻¹ (Kannan i sur., 2010).

2.1.3. Imunomodulacijsko i protuupalno djelovanje proteinskih hidrolizata

Peptidi dobiveni iz hrane pokazuju različite učinke na urođenu i specifičnu imunost organizma djelujući na proizvodnju citokina i antitijela, stimulaciju proliferacije limfocita, povećanje fagocitnih sposobnosti makrofaga, povećanje aktivnosti NK stanica, povećanje obrambenih sposobnosti organizma protiv patogena te inhibiciju proinflamatornih odgovora stanice domaćina na komponente bakterijskih stanica kao što su lipopolisaharidi. Ovi učinci mogu biti posljedica direktnog vezanja peptida na receptore na površini stanica imunskog sustava. Peptidi ne stupaju u interakcije sa patogenima, ali mogu pridonijeti obrambenim sposobnostima organizma.

Imunomodulacijski su peptidi izolirani iz proteinskih hidrolizata raznih izvora, uključujući soju, rižu i lan. Aktivnost koju će dobiveni peptid iskazati ovisi o njegovu aminokiselinskom sastavu, sekvenci, dužini, naboju i hidrofobnosti. Proteinski hidrolizati s najizraženijim imunomodulacijskim učinkom sačinjeni su od dvije do deset hidrofobnih aminokiselina.



Slika 2. Mehanizam djelovanja imunomodulacijskih proteinskih hidrolizata ili peptida dobivenih iz hrane (prilagođeno prema Chalamaiah i sur., 2018)

Ciljna mjesta i rezultati djelovanja imunomodulacijskih proteinskih hidrolizata ili peptida dobivenih iz hrane prikazani su na Slici 2, iako još uvijek nije poznat točan mehanizam njihova djelovanja. Poznato je da se djelovanje imunomodulacijskih proteinskih hidrolizata ili peptida očituje kroz aktivaciju makrofaga, stimulaciju fagocitoze, povećanje broja leukocita, indukciju citokina, NO i imunoglobulina te stimulaciju NK stanica (Chalamaiah i sur., 2018).

Protuupalna svojstva proteinskih hidrolizata većinom se očituju u modulaciji proinflamatornih odgovora makrofaga izazvanih endotoksinima. Već spomenuti lunasin i njemu slični peptidi djeluju protuupalno tako što smanjuju produkciju reaktivnih kisikovih vrsta i razinu TNF- α , IL-6, IL-1 β , NF- κ β (Udenigwe i Aluko, 2012).

2.1.4. Lan kao izvor biološki aktivnih spojeva

Lan (*Linum usitatissimum* L.) je biljka prisutna kroz gotovo čitavu ljudsku povijest, a njezinu korist odražava i samo ime jer latinska riječ *usitatissimum* znači „najkorisniji“. Lanene su se sjemenke koristile u ljudskoj prehrani 5 do 8 tisuća godina prije nove ere, a

smatraju se vrijednim zbog visokog sadržaja ulja. Lanene sjemenke bogate su mastima (30-41%), vlaknima (20-35%) i proteinima (20-30%), dok je sadržaj škroba u njima nizak. Lanene sjemenke sadrže visoku razinu dušika koji ne potječe iz proteina, već iz vitamina, sinapina, kolina i cijanogenih glikozida. Stoga se procjenjuje da je stvarna razina proteina u lanenim sjemenkama oko 18% (Bekhit i sur., 2018).

Pozitivni učinci lanenih sjemenki na zdravlje ljudi pripisuju se ulju bogatom α -linolenskom kiselimon (ALA), lignanu i vlaknima. Konzumacija lanenih sjemenki i njihovih produkata povećava razinu ALA i drugih Ω -3 masnih kiselina u krvi, što za posljedicu ima smanjenje razine ukupnog kolesterola i lipoproteina niske gustoće (LDL). Visok sadržaj lignana također može sniziti razinu kolesterola u krvnoj plazmi, a to se objašnjava činjenicom da lignan djeluje kao selektivni modulator estrogenskih receptora (eng. *Selective Estrogen Receptor Modulator – SERM*). Također, lignan se smatra potencijalnim antitumorskim agensom, posebice protiv tumora induciranih hormonima (npr. tumor prostate). Topiva vlakna dobivena iz lanenih sjemenki pokazuju pozitivan učinak na smanjenje razvoja dijabetesa, pretilosti, raka debelog crijeva, dok netopiva vlakna imaju laksativni učinak (Bekhit i sur., 2018).

Proteini dobiveni iz lanenih sjemenki bogati su asparaginom, glutaminskom kiselinom, leucinom i argininom, a siromašni aminokiselinama koje sadrže sumpor – metioninom i cisteinom (Bekhit i sur., 2018). Prisutnost arginina u vaskularnom endoteliju može sniziti krvni tlak (Udenigwe i sur., 2012). Proteini iz lana mogu utjecati na razinu glukoze u krvi djelujući na izlučivanje inzulina. Osim toga, interakcije između proteina iz lana i topivih polisaharida imaju značajnu ulogu u snižavanju razine amonijaka u debelom crijevu i na taj način štite organizam od kancerogenog djelovanja amonijaka (Oomah, 2001).

Cjelovite lanene sjemenke široko su prihvaćene kao zdrava hrana sa antitumorskom aktivnošću. Laneno brašno smanjuje proliferaciju epitelnih stanica i stanične aberacije u mliječnim žlijezdama ženskih štakora. Ova se spoznaja može iskoristiti u sprječavanju napredovanja tumora mliječnih žlijezdi (Serraino i Thompson, 1991). Osim toga, pokazano je da lignan iz lanenih sjemenki može reducirati rast tumora u kasnijim fazama karcinogeneze (Thompson i sur., 1996). Zamjenom kukuruznog brašna lanenim ili kukuruznog ulja lanenim uljem u svakodnevnoj prehrani dolazi do smanjenja umnažanja tumorskih stanica i njihove veličine u tankom i debelom crijevu laboratorijskih miševa (Bommareddy i sur., 2009).

U štakora čija je hrana sadržavala 20% lanenih sjemenki došlo je do smanjenja ukupnog kolesterola u krvi, triglicerida te lipoproteina niske gustoće (LDL) za 21, 34 i 23%. Povećanjem udjela lanenih sjemenki na 30% pokazan je izraženiji učinak snižavajući već navedene faktore za 33, 67 i 23% (Ratnayake i sur., 1992). U studijama koje su uključivale ljude, unosom 15 grama lanenih sjemenki dnevno, kroz tri je mjeseca došlo do smanjenja razine triglicerida i lipoproteina niske gustoće (LDL), bez ikakvog utjecaja na razinu lipoproteina visoke gustoće (HDL; Bierenbaum i sur., 1993). Istraživanja su također pokazala da unosom 50 grama lanenih sjemenki dnevno kroz 4 tjedna dolazi do smanjenja razine LDL-a za 8% u zdravih odraslih osoba (Cunnane i sur., 1995).

2.2. Oksidacijski stres u stanicama

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

Ljudski organizam ima kompleksan sustav koji uključuje enzimske (superoksid dismutaza, katalaza) i ne-enzimske mehanizme (glutation, vitamin A, vitamin E, vitamin C i flavonoidi) obrane od oksidansa kojima je svakodnevno izložen. Ipak, navedeni mehanizmi nisu uvijek dostatni za učinkovitu zaštitu od ROS-a, što rezultira stanjem oksidacijskog stresa (Martindale i Holbrook, 2002). Oksidacijski stres definira se kao znatna neravnoteža između nastanka reaktivnih vrsta i sposobnosti obrane stanice od istih. Visoka razina oštećenja uzrokovanih oksidacijom ne rezultira samo oksidacijskim stresom, već i nefunkcionalnošću sustava za popravak ili zamjenu oštećenih molekula. Stanice mogu različito reagirati na oksidacijski stres, pri čemu se stanični odgovori manifestiraju kao povećana proliferacija, zaustavljanje stanične diobe, nekroza, apoptoza ili stanična smrt sa obilježjima nekroze i apoptoze. Koji će se efekt ispoljiti nakon djelovanja ROS-a na stanice u određenoj je mjeri specifičan za tip stanice, a vezan je uz prisutnost specifičnih receptora na površini stanice, mehanizam prijenosa signala te obrambenu sposobnost stanice (Halliwell, 2007).

Na staničnoj razini, oštećenja izazvana reaktivnim kisikovim vrstama izazivaju širok spektar odgovora, od proliferacije stanica, preko zaustavljanja staničnog ciklusa te naposljetku stanične smrti. Koji će se efekt ispoljiti ovisi o tipu stanice, primijenjenom agensu, njegovoj dozi te trajanju izloženosti. Najčešće vrijedi pravilo da niske doze ROS-a, posebice vodikova peroksida, potiču proliferaciju stanica, dok srednje doze uzrokuju zaustavljanje staničnog ciklusa i starenje stanica. Vrlo visoke doze rezultiraju staničnom smrću, bilo apoptozom ili nekrozom. Neovisno o ispoljenom efektu, on je odraz ravnoteže između različitih signalnih puteva unutar stanice koji se aktiviraju tijekom oksidacijskog stresa. Stanični se odgovor na oksidacijski stres najčešće sastoji od modulacije aktivnosti transkripcijskih faktora te posljedično i ekspresije gena (Martindale i Holbrook, 2002).

Slobodni su radikali odgovorni za razvoj mnogih bolesti uključujući tumore, kardiovaskularna oboljenja, neuralne poremećaje, Alzheimerovu bolest, Parkinsonovu bolest i mnoge druge. Mnogi dokazi upućuju na to da hrana koja sadrži antioksidanse ili nutrijente s antioksidacijskim djelovanjem može imati ključnu ulogu u sprječavanju bolesti (Alam i sur., 2013).

2.2.1. Oksidacijski stres u kulturi stanica

Kultura stanica koristi se u laboratorijima širom svijeta za proučavanje metaboličkih puteva, mehanizama prijenosa signala, regulaciju ekspresije gena, staničnu proliferaciju i smrt. Stanice u kulturi razlikuju se od onih u organizmu. Pokazano je da kisikovi slobodni radikali (uključujući superoksidni O_2^- i hidroksilni $OH\cdot$ radikal) i ostale reaktivne kisikove vrste (npr. vodikov peroksid) sudjeluju u promoviranju rasta, metaboličkim i citostatičkim učincima mnogih faktora rasta i citokina u kulturi stanica. Ne postoje dokazi da su navedeni učinci reaktivnih kisikovih vrsta zapaženi u stanicama u organizmu (Halliwell, 2003).

Medij u kojemu stanice rastu u pravilu sadrži manjak molekula sa antioksidacijskim djelovanjem (npr. vitamini C i E) kao i prekursora molekula s antioksidacijskim djelovanjem (npr. selen). Stanice za svoj rast zahtijevaju ione prijelaznih metala, posebice željezo i bakar. Samo u slučaju da nisu pročišćene, sve laboratorijske otopine, kao i medij za uzgoj stanica, kontaminirani su navedenim ionima. U neke se medije dodaju anorganske soli metala, dok Dulcecco's modified Eagle's medium (DMEM) sadrži željezov (III) nitrat ($Fe(NO_3)_3$). U drugim je medijima željezo dodano u obliku vezanom na transferin te u takvom obliku ne može katalizirati reakcije koje uključuju slobodne radikale (Halliwell, 2003).

2.2.2. Metode određivanja oksidacijskog stresa

Većina reaktivnih vrsta (eng. *Reactive Species – RS*) su visoko reaktivne i kratkog životnog vijeka te ih je stoga teško odrediti unutar stanice. Reaktivne se vrste mogu odrediti bilo specifično ili određivanjem produkata nastalih njihovim djelovanjem, kao što su oksidirani lipidi, proteini ili nukleinske kiseline (Rani i sur., 2015).

Ovisno o kemijskoj reakciji na kojoj se zasnivaju, metode za određivanje oksidacijskog stresa mogu se podijeliti u dvije skupine: metode temeljene na prijenosu atoma vodika (eng. *Hydrogen Atom Transfer – HAT*) i metode bazirane na prijenosu elektrona (eng. *Electron Transfer – ET*). Većina HAT metoda zasnovana je na kompetitivnoj reakciji u kojoj se antioksidans i supstrat natječu za termički generiran peroksidni radikal. U testove temeljene na prijenosu atoma vodika spadaju ORAC (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), TRAP (eng. *Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*) i test obezbojenja β -karotena. ET metode temelje se na antioksidacijskoj sposobnosti neke tvari da spriječi redukciju oksidansa koji se ujedno koristi i kao kontrola. Primjeri ET metoda su TEAC (eng. *Trolox Ekvivalent Antioxidant Capacity*), FRAP (eng. *Ferric Ion Reduction Antioxidant Power*) i DPPH (eng. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging Capacity*) (Sarmadi i Ismail, 2010).

Zbog sve većeg interesa za slobodne radikale i njihovu ulogu u patogenezi ljudskih bolesti postoji i sve izraženija težnja ka razvitku zadovoljavajućih metoda za određivanje slobodnih radikala u *in vivo* sustavima. Najveći problem pri tome je visoka reaktivnost slobodnih radikala i velika brzina stupanja u reakciju sa molekulama koje im se nađu u blizini. Stoga za određivanje slobodnih radikala u *in vivo* sustavima nisu pogodni direktni testovi, već se slobodni radikali najčešće određuju indirektnim metodama mjerenja različitih produkata koji nastaju kao posljedica reakcije slobodnih radikala s lipidima, proteinima ili DNA. Neke od metoda koje se danas koriste za *in vivo* sustave su ESR (eng. *Electron Spin Resonance*) spektrometrija te EPR (eng. *Electron Paramagnetic Resonance*) (Palmieri i Sblendorio, 2007).

Treba napomenuti da se rezultati dobiveni u *in vitro* testovima ne mogu direktno povezati sa antioksidacijskim djelovanjem tvari u *in vivo* sustavima zbog toga što se dostupnost tvari, reaktivnost, stabilnost i pohranjivanje u tkivima ne može uzeti u obzir tijekom provođenja *in vitro* testova.

2.3. Kulture životinjskih stanica

Kultura životinjskih stanica i tkiva opće je prihvaćena i široko rasprostranjena tehnika koja uključuje izolaciju stanica, tkiva ili organa iz životinjskih organizama i njihov daljnji rast u *in vitro* uvjetima. Različiti tipovi stanica mogu biti uzgojeni u kulturi, a uključuju fibroblaste, stanice epitela, neurone te različite tipove tumorskih stanica. Kultura stanica pokazala se kao najučinkovitija metoda za praćenje staničnih funkcija i mehanizama. Određene se stanice mogu uzgojiti u velikim količinama u svrhu proučavanja staničnih aktivnosti, diferencijacije i proliferacije. Kultura je stanica od esencijalne važnosti u biotehnologiji jer može poslužiti za istraživanje tumora, proizvodnju cjepiva i rekombinantnih proteina, testiranje lijekova, gensku terapiju te proizvodnju matičnih stanica (Oyeleye i sur., 2016).

Životinjske stanice u kulturi mogu se, prema podrijetlu i svojstvima, podijeliti u primarne kulture i stanične linije. Tek izolirane kulture stanica poznate su pod nazivom primarna kultura i taj naziv zadržavaju do prvog pasažiranja. Primarne kulture najčešće su heterogene i ograničenog životnog vijeka, ali su svojstvima najbližije tkivu iz kojeg potječu. Stanične linije nastaju subkultiviranjem primarnih linija te mogu biti konačne ili kontinuirane. Glavne prednosti kontinuiranih staničnih linija su brži rast, mogućnost postizanja veće gustoće stanica (posebice u bioreaktorima), mogućnost korištenja medija bez seruma i proteina te mogućnost rasta u obliku suspenzije. Ipak, kontinuirane stanične linije pokazuju nedostatke koji se očituju u kromosomskoj nestabilnosti, varijacijama u fenotipu te gubitku tkivno specifičnih markera (Alves i sur., 2008).

Sustavi za uzgoj životinjskih stanica moraju osigurati optimalne fiziološke uvjete za stanični rast i proliferaciju. U *in vitro* uvjetima, rast životinjskih stanica ovisi o nekoliko faktora kao što su pH, temperatura, osmolarnost, koncentracija plinova (CO_2 i O_2), dostatnoj površini za prihvaćanje te stanju stanica u trenutku inokulacije. Većina staničnih linija sisavaca rastu pri pH vrijednosti 7,4 pri čemu se u medij za rast stanica trebaju dodati puferi da bi spriječili promjenu pH vrijednosti uzrokovanu nastankom CO_2 i mliječne kiseline kao produkata metabolizma glukoze. Većina staničnih linija pokazuje toleranciju na velik raspon osmotskog pritiska. Kao generalno se pravilo uzima da je optimalan osmotski pritisak za stanice sisavaca u kulturi između 260 i 320 mOsm kg^{-1} , dok je za stanice insekata u kulturi nešto viši, između 340 i 390 mOsm kg^{-1} . Temperatura ima kritičnu ulogu u uspostavi i održavanju stanične kulture jer utječe na rast stanica, kao i na topivost raznih komponenti

medija (posebice plinova CO₂ i O₂). Optimalna temperatura za rast stanica sisavaca u kulturi kreće se između 35 i 37 °C. Kulture stanica značajno se razlikuju s obzirom na potrebu za kisikom, ali općenito govoreći, preferira se parcijalni tlak kisika nešto niži od atmosferskog tlaka. Stoga je nužno održavati razinu otopljenog kisika između 30 i 60% (Leo i sur., 2008).

Medij za uzgoj stanica mora sadržavati nutrijente esencijalne za rast i diobu stanica kao i supstrate za odvijanje staničnog metabolizma. Da bi se održali uvjeti što sličniji onima u tkivu iz kojeg je stanična kultura uspostavljena, hranjivi medij mora sadržavati anorganske soli, šećere, aminokiseline, vitamine, lipide, organske kiseline, proteine, hormone, izvore dušika i ugljika, minerale, kao i supstrate specifične za pojedini tip stanica. Ponekad je u medij potrebno dodati serum i antibiotike. Glavni izvor ugljika i energije najčešće je glukoza, pri čemu njezina koncentracija u mediju iznosi između 5 i 25 mM. Esencijalne aminokiseline stanice ne mogu same sintetizirati te ih je nužno dodati u hranjivi medij. Ovisno o staničnoj liniji, zahtjevi za aminokiselinama se razlikuju. Aminokiseline se u medij mogu dodati u obliku proteinskih hidrolizata, pri čemu je do sada zabilježeno dodavanje hidrolizata laktoalbumina, proteina iz soje, pšenice i riže. Fetalni goveđi serum (eng. *Fetal Bovine Serum* – *FBS*) sadrži aminokiseline, faktore rasta, vitamine, proteine, hormone, lipide i minerale, a u medij se dodaje u koncentraciji između 2 i 20% v/v. Osim što je izvor faktora koji pospješuju staničnu adheziju i nutrijenata, serum je bogat faktorima koji stimuliraju stanični rast (faktori rasta, hormoni, proteini) te tvarima s protektivnim djelovanjem (antioksidansi, inhibitori proteaza). Ipak, FBS je jedna od najskupljih komponenti medija za uzgoj stanica. Osim toga, dodatak seruma značajno povećava kompleksnost medija i samim time otežava izolaciju proizvoda i njegovo pročišćavanje. Još neki od nedostataka korištenja seruma kao dodatka mediju za uzgoj stanica su potencijalni rizik za ljudsko zdravlje zbog moguće prisutnosti virusa i priona, kao i velika varijabilnost između šarži što smanjuje reproducibilnost postupka. Stoga je sve veća tendencija ka uzgoju životinjskih stanica u medijima bez seruma (Moraes i sur., 2008).

2.3.1. Primjena hidrolizata proteina u medijima za uzgoj životinjskih stanica

Da bi se izbjegli problemi vezani za uporabu seruma navedeni u prethodnom poglavlju, pristupilo se razvoju medija bez seruma. Danas na tržištu postoji više različitih modifikacija medija za uzgoj stanica, pri čemu su neki u potpunosti bez komponenti animalnog podrijetla, drugi su tzv. *serum-free* mediji, dok neki ne sadrže proteine, ali sadrže komponente biljnog i životinjskog podrijetla ili hidrolizat kvasca (Moranes i sur., 2008). Osim

navedenih, postoje i kemijski definirani mediji za koje se smatra da su najbolji za uzgoj stanica u istraživačke svrhe, ali oni nisu toliko rašireni zbog visoke cijene (Calle i sur., 2008). Iako dobra praksa za uzgoj životinjskih stanica (eng. *Good Cell Culture Practice – GCCP*), prema kojoj valja izbjegavati uporabu seruma nije uvrštena ni u kakav zakon, smatra se da bi trebala postati dijelom dobre laboratorijske prakse (eng. *Good Laboratory Practice – GLP*) i dobre proizvođačke prakse (eng. *Good Manufacturing Practice – GMP*) (Van der Valk i sur., 2010).

Pozitivni učinci proteinskih hidrolizata na rast stanica u kulturi poznati su već nekoliko desetljeća. Ipak, još uvijek nije poznato jesu li pozitivni učinci proteinskih hidrolizata na rast stanica posljedica djelovanja frakcija malih peptida ili igraju li ulogu i veliki peptidi. Mali peptidi, kao i slobodne aminokiseline, poboljšavaju nutritivnu vrijednost medija, dok se za velike peptide smatra da oponašaju djelovanje faktora rasta i preživljavanja (Franek i sur., 2000). Proteinski hidrolizati sadrže oligopeptide, peptide i slobodne aminokiseline dobivene enzimskom ili kemijskom hidrolizom kazeina, biljnih i životinjskih tkiva ili kvasca. Osim kao izvor nutrijenata, hidrolizati proteina osiguravaju stanicama u kulturi faktore rasta i antiapoptotičke faktore te stimuliraju proizvodnju proteina (Moranes i sur., 2008).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Alkalaza[®] (2,4 Au/g), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
- Neutrase[®] (0,8 Au/g) Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
- Protamex[®], Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
- 2, 2'-azobis(2-metilpropionamid)-dihidroklorid (AAPH), Acros Organics, New Jersey, SAD
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetraetilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Diklorohidrofluorescein-diacetat (DCF-DA), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Sigma, St. Louis, SAD
- FBS (Fetal Bovine Serum), Gibco BRL, SAD
- Fluorescein, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- MTS reagens (The CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent), Promega, Madison, SAD
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Tripan-plavo, Sigma, St. Louis, SAD
- Tripsin-EDTA, Sigma, St. Louis, SAD
- Vodikov peroksid (30%), Gram-mol, Zagreb, RH

3.1.2. Otopine i puferi

- PBS pufer (pH=7,4)

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

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

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

- Fosfatni pufer (0,075 M, pH=7)

| | |
|------------------------|-----------|
| Fosfatni pufer (0,2 M) | 75 mL |
| Destilirana voda | do 200 mL |

- Otopina fluoresceina

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

Ishodna otopina 2: 100 μ L ishodne otopine 1 nadopuniti do 10 mL 0,075 M fosfatnog pufera

Ishodna otopina 3: 50 μ L ishodne otopine 2 nadopuniti do 50 mL 0, 075 fosfatnog pufera

- Otopina AAPH

| | |
|--------------------------|----------|
| AAPH | 0,414 g |
| Fosfatni pufer (0,075 M) | do 10 mL |

- Otopina Trolox-a (50 μ M)

| | |
|--------------------------|--------|
| Trolox | 6,26 g |
| Fosfatni pufer (0,075 M) | 50 mL |

3.1.3. Uređaji i oprema

- Cary Eclipse Fluorescence Spectrofotometar, Varian, Mulgrave, Australija
- Čitač ploča, TECAN, Mannedorf, Švicarska
- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Hladnjak (-80 °C), TT 80 FRYKA, Njemačka
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Iskra PIO, Slovenija
- Komora za sterilni rad (*laminar flow cabinet*), Kambič, Slovenija
- Laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, kivete, epruvete)
- Laboratorijska vaga, Boeco, Njemačka

- Neubaerova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright - Line, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, Thermo Scientific BioLite, SAD
- Ploče s jažicama, Corning, SAD
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Vodena kupelj, Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK

3.1.4. Stanična linija HaCaT

HaCaT stanična linija uspostavljena je spontanom transformacijom keratinocita odraslog čovjeka. Radi se o normalnoj staničnoj liniji uspostavljenoj pri niskim koncentracijama kalcija i povišenoj temperaturi (38,5 °C). HaCaT stanice su stanice klonalnog tipa, određene specifičnim i stabilnim citogenetičkim markerima.

Za razliku od humanih stanica transformiranih pomoću virusa, HaCaT stanice, iako se radi o kontinuiranoj staničnoj liniji, zadržavaju mogućnost rekonstrukcije dobro strukturiranog epidermisa nakon transplantacije *in vivo*. Nadalje, HaCaT stanice mogu se reproducibilno i efikasno transfecirati humanim Ha-ras-1 onkogenom čime se dobiva model za proučavanja uloge onkogeno i drugih faktora u procesu maligne transformacije epitelnih stanica (Boukamp i sur., 1988).

3.1.5. Stanična linija HeLa

HeLa stanična linija prva je stanična linija ljudskih stanica, uspostavljena nakon biopsije karcinoma vrata maternice. U usporedbi s drugim humanim staničnim linijama, HeLa stanična linija kontinuirana je linija tumorskih stanica sa izrazito velikom specifičnom brzinom rasta. Zbog tih je svojstava HeLa stanična linija korištena u velikom broju istraživanja i prisutna u mnogim laboratorijima te je primijećena kontaminacija drugih staničnim linijama HeLa staničnom linijom (Lucy i sur., 2009).

HeLa stanična linija je standardizirana u svrhe istraživanja te se danas na njoj provode reproducibilna istraživanja tumora, toksičnosti kemikalija, djelovanja lijekova, genetička i mnoga druga istraživanja (The Copia Institute, 2015).

3.2. Metode rada

3.2.1. Enzimaska hidroliza proteinskog izolata lana i određivanje stupnja hidrolize

Proteini su izolirani iz odmašćenog lanenog brašna i korišteni kao supstrat za enzimsku hidrolizu. Proteinski izolat lana otopljen je uz miješanje u destiliranoj vodi tako da njegova koncentracija iznosi 5% (w/v). Za enzimsku su hidrolizu korištena tri različita enzima: Alkalaza, Neutraza i Protamex. Uvjeti hidrolize varirali su ovisno o optimalnoj pH vrijednosti i temperaturi pojedinog enzima ($t=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,7$ za Protamex; $t=55\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=8,5$ za Alkalazu te $t=55\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,0$ za Neutrazu), a svima je bilo zajedničko vrijeme trajanja hidrolize koje je iznosilo 4 sata. Zbog oslobađanja slobodnih aminokiselina i manjih peptida, tijekom enzimske hidrolize dolazi do pada pH vrijednosti. Da bi se pH vrijednost održala na optimalnoj za djelovanje pojedinog enzima, korištena je 1M NaOH. Konstantna pH vrijednost znak je završene hidrolize.

U određenim je vremenskim intervalima iz smjese izuzet 1 mL uzorka nakon čega je provedena inaktivacija enzima kipućom vodom tijekom 10 minuta. Ohlađeni je uzorak centrifugiran 10 minuta pri 100000 *rpm*. Dobiveni je supernatant služio za određivanje stupnja hidrolize (DH) prema izrazu [1]. 100 μL supernatanta pomiješano je sa 100 μL TCA (0,44 M) da bi se istaložili nehidrolizirani proteini, a koncentracija zaostalih peptida određena je metodom po Lowry-ju. Metoda po Lowry-ju korištena je i za određivanje koncentracije proteina u uzorku koji nije prošao tretman s TCA (eng. *Pure Sample – PS*). Stupanj hidrolize izražen je kao odnos koncentracija proteina u uzorku tretiranom TCA i PS-a.

$$\text{DH}(\%) = \frac{\text{količina topljivih proteina (mg) u 0,22 M TCA}}{\text{količina ukupnih proteina (mg)}} \times 100 \quad [1]$$

3.2.2. Određivanje antioksidacijskog potencijala hidrolizata proteina lana ORAC metodom

ORAC (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metoda temelji se na stvaranju slobodnih radikala čiji je izvor AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamid)-dihidroklorid). Peroksil radikali ($\text{ROO}\cdot$) oksidiraju fluorescein što rezultira smanjenjem fluorescencije koja se mjeri spektrofotometrijski. Kao standard koristi se Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetraetilkroman-2-karboksilna kiselina; u vodi topiv analog vitamina E) za kojeg je dokazano da ima jako antioksidacijsko djelovanje (Garcia, 2013).

- Mjerenje ORAC vrijednosti

Uzorci za mjerenja pripremljeni su tako da je u kivetu za mjerenje dodano 2,250 mL otopine fluoresceina i 0,375 mL uzorka, odnosno proteinskih hidrolizata pripremljenih na način opisan u poglavlju 3.2.1. Zbog visoke koncentracije proteinskih hidrolizata, uzorci su razrijeđeni. Kivete su termostahirane na 37 °C tijekom 30 minuta. Nakon toga je dodano 0,375 mL otopine AAPH te je provedeno mjerenje. Mjerenje se vrši pomoću fluorescentnog spektrofotometra pri temperaturi od 37 °C tijekom 30 minuta. Valna duljina ekscitacije (λ_{eks}) iznosi 485 nm, a valna duljina emisije (λ_{em}) 520 nm. Slijepa se proba pripremlja na isti način, uz iznimku da se umjesto 0,375 mL uzorka dodaje 0,375 mL fosfatnog pufera (0,075 M). Po istom se principu određuje ORAC vrijednost standarda, odnosno 50 μM Trolox-a.

- Izračun relativne ORAC vrijednosti

Relativna se ORAC vrijednost računa prema sljedećim formulama:

$$\text{Relativna ORAC vrijednost} = \left(\frac{\text{AUC}_{\text{u}} - \text{AUC}_{\text{sp}}}{\text{AUC}_{\text{trx}} - \text{AUC}_{\text{sp}}} \right) \times k \times \alpha \times h \text{ [}\mu\text{mol Trolox ekvivalent g}^{-1}\text{ uzorka]} \text{ [2]}$$

$$\text{AUC} = 0,5 + (\text{R2}/\text{R1}) + (\text{R3}/\text{R1}) + \dots + (\text{Rn}/\text{R1}) \text{ [3]}$$

Pri čemu je:

- AUC_{u} = antioksidacijski kapacitet uzorka
- AUC_{sp} = antioksidacijski kapacitet slijepe probe
- AUC_{trx} = antioksidacijski kapacitet Troloxa
- k = faktor razrijeđenja
- α = molarna koncentracija Troloxa
- $h = \frac{\text{g}_{\text{ekstrakt}}}{V_{\text{uzorak}}}$ [4]

3.2.3. Određivanje učinka hidrolizata proteina lana na proliferaciju HaCaT i HeLa stanica MTS metodom

Redukcija MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid) tetrazolijeve soli bila je prva metoda korištena za određivanje vijabilnosti stanica. Metoda je temeljena na redukciji MTT-a u formazan koji se nakuplja unutar stanice u netopivom obliku te ga je prije mjerenja apsorbancije potrebno prevesti u topiv oblik. Da bi se izbjegao dodatni korak

otapanja formazanskog produkta, razvijen je novi tetrazolijski reagens – MTS. Žive stanice konvertiraju MTS u ljubičasto obojeni formazanski produkt čija se količina određuje mjerenjem apsorbancije pri 570 nm. Kada stanice odumru, gube mogućnost pretvaranja MTS-a u formazan što se očituje kao smanjenje apsorbancije. Točan mehanizam redukcije MTS-a do formazana nije poznat, ali se pretpostavlja da uključuje reakciju sa NADH ili nekom sličnom molekulom koja prenosi elektrone na MTS.

HeLa i HaCaT stanice naciepljene su u ploču sa 96 jažica tako da je koncentracija u svakoj jažici iznosila 3×10^4 stanica mL^{-1} . Stanice su inkubirane 24 sata na 37°C . Nakon prihvaćanja stanica za podlogu, stanice su tretirane sa $10\ \mu\text{L}$ proteinskih hidrolizata lana, pri čemu je koncentracija hidrolizata iznosila 0,5, 1, 2, 5, odnosno $10\ \text{mg mL}^{-1}$. Izlaganje stanica proteinskim hidrolizatima trajalo je 72 sata, a nakon tretmana, u svaku je jažicu dodano $10\ \mu\text{L}$ MTS-a. Inkubacija je trajala 4 sata nakon čega je određen intenzitet obojenja pri 492 nm na čitaču ploča. Preživljenje stanica izraženo je tako što su odnos stavljene dobivene vrijednosti apsorbancije za tretirane i netretirane stanice.

3.2.4. Određivanje učinaka hidrolizata proteina lana na inducirani oksidacijski stres u HaCaT stanicama DCFH-DA metodom

DCFH-DA (diklorodihidrofluorescein diacetat) metoda najčešće je korištena metoda za detekciju intracelularnog H_2O_2 i oksidacijskog stresa. Molekula DCFH-DA može ući u stanicu gdje se hidrolizira na DCFH karboksilatni anion, nakon čega slijedi redukcija do fluorescentnog produkta – diklorofluoresceina (DCF). Količina nastalog DCF-a može se pratiti pomoću tehnika temeljenih na mjerenju fluorescencije, kao što su konfokalna mikroskopija ili protočna citometrija.

Da bi utvrdili imaju li hidrolizati proteina lana protektivno djelovanje na stanice izložene oksidacijskom stresu, korištena je normalna stanična linija HaCaT. $100\ \mu\text{L}$ suspenzije stanica koncentracije 3×10^4 stanica mL^{-1} naciepljeno je u jažice te su stanice inkubirane do prihvaćanja za podlogu. Nakon 24 sata, proveden je predtretman stanica proteinskim hidrolizatima lana pripravljenim djelovanjem Neutraze i Alkalaze. Koncentracije proteinskih hidrolizata kojima su stanice tretirane iznosile su 0,5, 1 i $2\ \text{g L}^{-1}$. Predtretman je trajao 24 sata nakon čega je inducirani oksidacijski stres u kulturi stanica pomoću $100\ \mu\text{L}$ H_2O_2 . Nakon 3 sata, sa stanica je uklonjen medij te je dodano $100\ \mu\text{L}$ $50\ \mu\text{M}$ DCFH-DA.

Stanice su inkubirane 30 minuta na 37 °C, a zatim je izmjerena fluorescencija pri valnoj duljini ekscitacije od 485 nm i valnoj duljini emisije od 530 nm.

3.2.5. Statistička obrada rezultata

Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine (x_{sr}) određenog broja mjerenja (n).

Srednja vrijednost
$$x_{sr} = \sum_{i=1}^n X_i - X \quad [5]$$

Varijanca
$$s^2 = \frac{1}{n-1} n \sum_{i=1}^n (X_i - X)^2 \quad [6]$$

Standardna devijacija
$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - X)^2} \quad [7]$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

Lan (*Linum usitatissimum* L.) jedna je od najvažnijih uljarica korištena u industriji. Uljna pogača smatra se nusproizvodom koji zaostaje nakon izdvajanja ulja iz lanenih sjemenki te, ukoliko se ne odlaže kao otpad, koristi se kao hrana za životinje ili gnojivo unatoč izrazitoj nutritivnoj vrijednosti. U posljednja se dva desetljeća sve više pažnje pridaje lanu kao hrani zbog uočenih pozitivnih učinaka biološki aktivnih spojeva na ljudsko zdravlje. Lanene su sjemenke, osim ω -3 masnim kiselinama (α -linolenskom kiselinom (ALA) i kratkolančanim polinezasićenim masnim kiselinama (eng. *Short Chain Polyunsaturated Fatty Acids*), bogate i topljivim i netopljivim vlaknima, proteinima te mnogim antioksidansima. Pozitivni učinci lanenih sjemenki na ljudsko zdravlje očituju se u suzbijanju kardiovaskularnih oboljenja, antitumorskom i protuupalnom djelovanju (Goyal i sur., 2013). Navedena se svojstva pripisuju proteinskim i ugljikohidratnim frakcijama uljne pogače, stoga postoji velik potencijal korištenja uljnih pogača kao dodatka hrani.

Proteini dobiveni iz lanenih sjemenki mogu se koristiti za pripravu bioaktivnih peptida koji svoje djelovanje iskazuju inhibicijom angiotenzin-konvertirajućeg enzima ili neutralizacijom slobodnih radikala. Stoga, peptidi pripremljeni iz proteina lana mogu poslužiti kao koristan sastojak prilikom proizvodnje funkcionalne hrane i nutraceutika uključenih u sprječavanje i/ili odgađanje određenih bolesti.

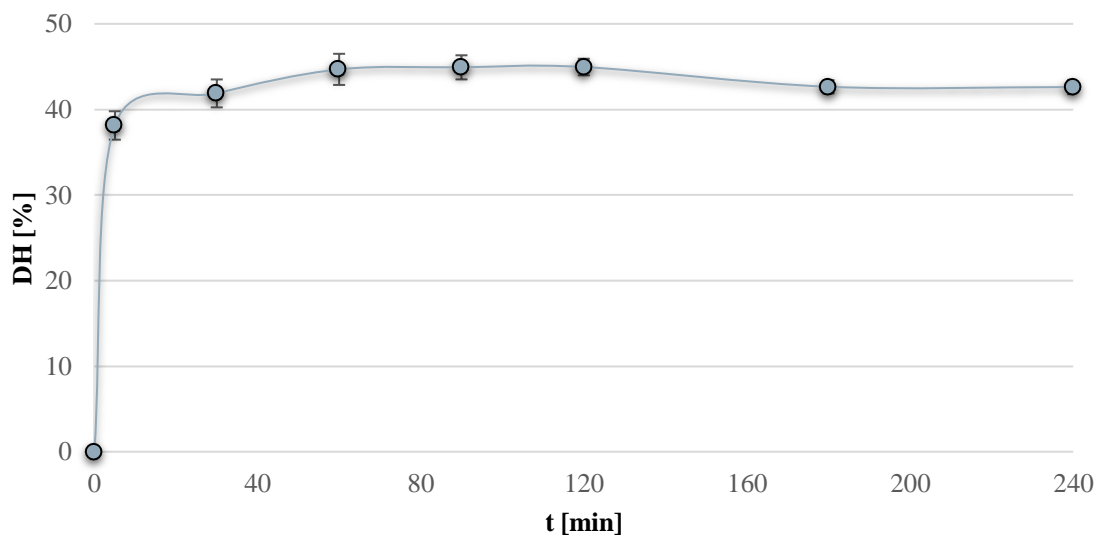
Slobodni radikali nastaju tijekom respiracije u aerobnim organizmima i u niskim koncentracijama imaju različite funkcije u organizmu kao što su prijenos signala unutar stanice ili obrana od infekcija. Ipak, u prevelikoj koncentraciji, slobodni radikali izazivaju oštećenja unutar stanice koja mogu rezultirati razvojem mnogih bolesti kao što su ateroskleroza, artritis, dijabetes i tumori. U normalnim uvjetima, u stanici postoje razni obrambeni mehanizmi protiv djelovanja slobodnih radikala, ali u slučajevima previsoke koncentracije slobodnih radikala, dolazi do stanja oksidacijskog stresa. Zbog navedenih razloga, postoji potreba za sintetskim antioksidansima koji, iako su efikasni, pokazuju toksičan učinak na stanice. Stoga je u fokusu pronaći prirodne antioksidanse koji će biti sigurni za ljudsko zdravlje.

Postoje brojne metode kojima se može odrediti biološka aktivnost i antioksidacijski potencijal proteina/peptida iz hrane pri čemu su ORAC i FRAP vrlo često korištene metode.

Da bi se odredila antioksidacijska aktivnost proteinskih hidrolizata lana, u ovom radu korištena je instrumentalna metoda ORAC. Proteinski hidrolizati sa najvišim relativnim ORAC vrijednostima korišteni su za određivanje antiproliferacijskog/citotoksičnog djelovanja na tumorsku staničnu liniju HeLa, odnosno za određivanje proliferacijske aktivnosti na HaCaT staničnoj liniji. Također, ispitan je protektivni učinak proteinskih hidrolizata lana na inducirani oksidacijski stres u HaCaT staničnoj liniji.

4.1. Priprava hidrolizata proteina lana

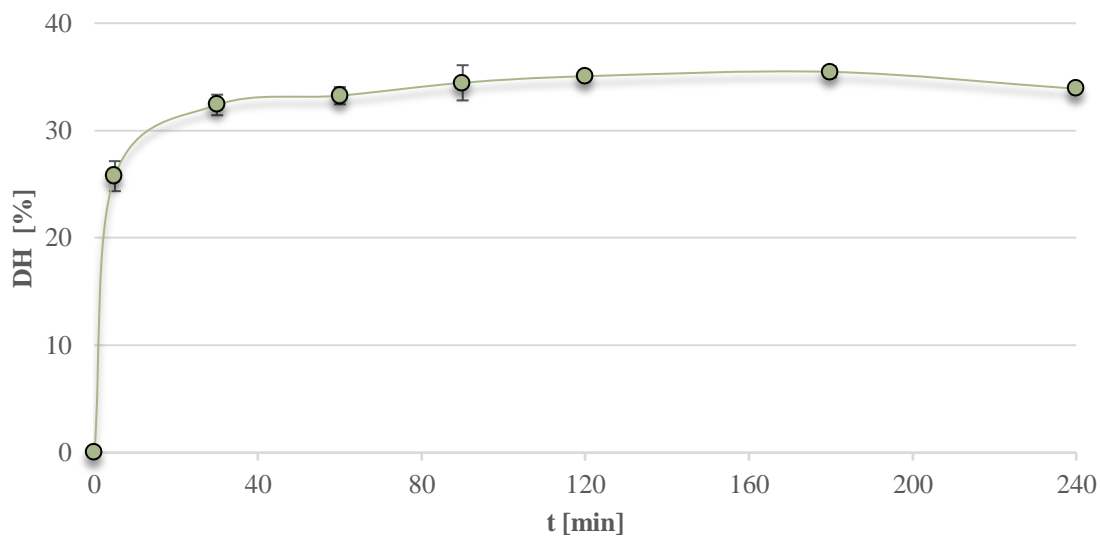
Proteinski hidrolizati lana pripremljeni su iz proteinskog izolata pogače lana djelovanjem tri različita hidrolitička enzima: Alkalaze, Neutrase i Protamex-a. Kako bi se usporedila učinkovitost enzima primijenjena je ista koncentracija supstrata koja je iznosila 5% (w/w). Tijekom hidrolize održavana je optimalna temperatura djelovanja pojedinog enzima, a ukupno vrijeme hidrolize iznosilo je 240 minuta. Uzorcima izuzetim tijekom trajanja postupka hidrolize određena je koncentracija proteina metodom po Lowry-ju. Stupanj hidrolize određen TCA-metodom prema izrazu [1], odnosno stavljanjem u odnos koncentracije proteina istaloženih s TCA i proteina u čistom uzorku te je za svaki pojedini enzim prikazan na slikama 3-5.



Slika 3. Promjena stupnja hidrolize (DH) proteinskog izolata lana djelovanjem enzima Alkalaze tijekom 240 min

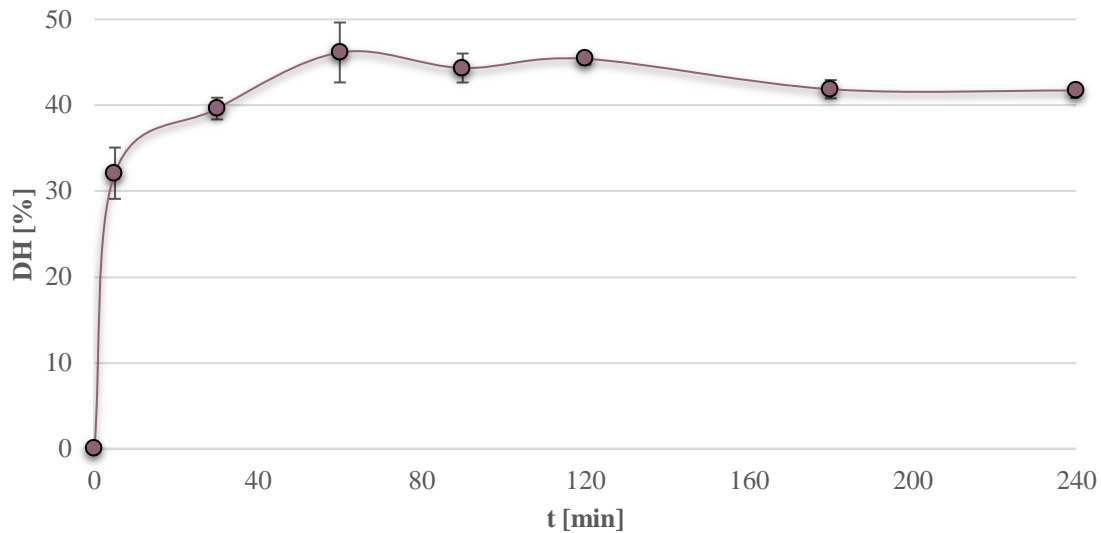
Djelovanjem enzima Alkalaze do najveće promjene u stupnju hidrolize dolazi u vremenskom periodu od početka pa do 10. minute reakcije hidrolize. Nakon toga, pa sve do

završetka hidrolize, ne dolazi do značajnije promjene u stupnju hidrolize. Djelovanjem enzima Alkalaze nakon 240 minuta postiže se stupanj hidrolize od 42,62%. Dobiveni je stupanj hidrolize proteina iz pogače lana gotovo dvostruko viši od vrijednosti navedenih u literaturi kada je za enzim Alkalazu stupanj hidrolize iznosio 19,3%, odnosno za enzim pankreatin 25% (Karamać i sur., 2016 i 2014). Razlike u dobivenom stupnju hidrolize ovise o koncentraciji korištenog enzima, odnosno omjeru enzim/supstrat (E/S) kao i o metodi kojom se određuje stupanj hidrolize.



Slika 4. Promjena stupnja hidrolize (DH) proteinskog izolata lana djelovanjem enzima Neutraze tijekom 240 min

Tijekom postupka hidrolize proteina iz pogače lana djelovanjem enzima Neutraze može se uočiti isti trend kao i kod djelovanja enzima Alkalaze. Naime, najveća promjena u stupnju hidrolize odvija se tijekom prvih 10 minuta hidrolize. Do kraja postupka gotovo da ni ne dolazi do značajnije promjene u stupnju hidrolize, a konačni stupanj hidrolize djelovanjem enzima Neutraze nakon 240 minuta iznosi 33,89%.

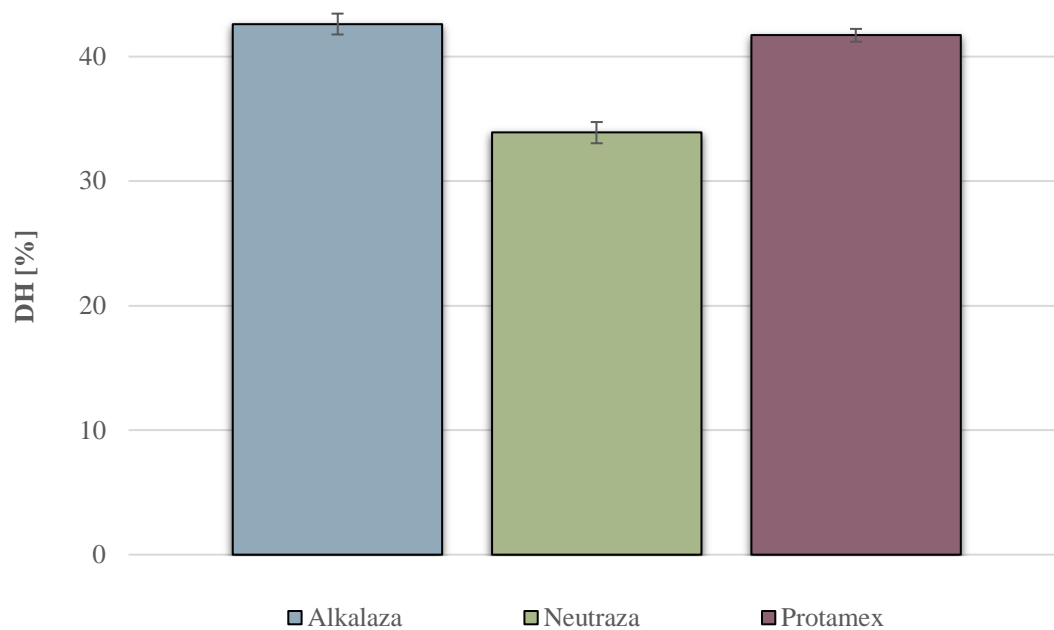


Slika 5. Promjena stupnja hidrolize (DH) proteinskog izolata lana djelovanjem enzima Protamex-a tijekom 240 min

Djelovanjem enzima Protamex-a također je vidljivo da se unutar 20 minuta od početka hidrolize postiže najveća promjena u stupnju hidrolize, koji na kraju postupka iznosi 41,71%.

Uspoređujući stupnjeve hidrolize proteina lana dobivene tijekom 240 minuta dobivene djelovanjem tri različita hidrolitička enzima (Alkalaza, Neutraza i Protamex), uočava se isti trend u promjeni stupnja hidrolize, odnosno promjene su najveće tijekom prvih 20 minuta hidrolize nakon čega ne dolazi do značajne promjene stupnja hidrolize (Slike 3-5). Adler-Nissen (1986) je smanjen stupanj hidrolize pripisao konkurenciji između nehidroliziranog proteina i peptida koji se stalno stvaraju tijekom hidrolize.

Kako bi se usporedila učinkovitost hidrolize proteina iz pogače lana djelovanjem tri različita proteolitička enzima, na Slici 6 prikazana je usporedba vrijednosti stupnjeva hidrolize dobivena djelovanjem Alkalaze, Neutrase i Protamex-a nakon 240 minuta.

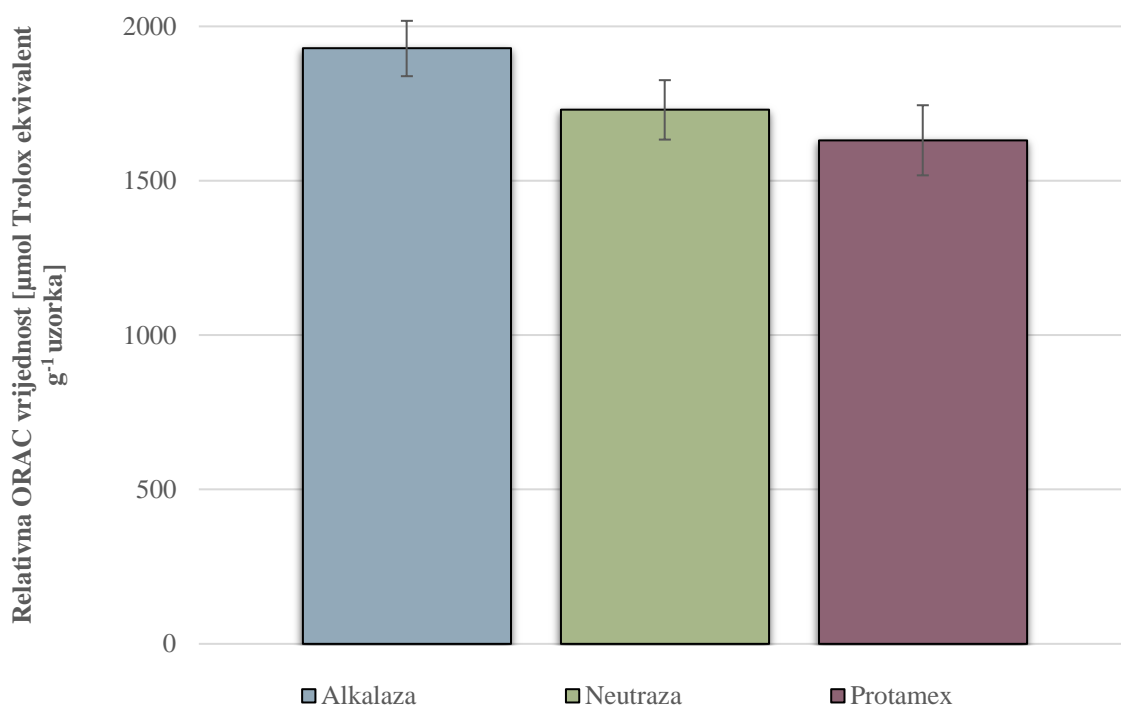


Slika 6. Stupanj hidrolize (DH) proteinskog izolata lana dobiven djelovanjem 3 različita hidrolitička enzima (Alkalaza, Neutraza, Protamex) nakon 240 minuta hidrolize.

Usporedbom stupnjeva hidrolize nakon 240 minuta hidrolize proteina lana vidljivo je da se najveći stupanj hidrolize postiže kada se za hidrolizu proteinskog izolata lana koristi enzim Alkalaza (42,62%). Djelovanjem enzima Protamex konačni stupanj hidrolize iznosi 41,71%, dok se djelovanjem enzima Neutrazze postiže najmanji stupanj hidrolize (33,89%). Stupanj hidrolize (DH) ovisi o uvjetima u kojima se provodi proces hidrolize kao što su vrijeme, temperatura, pH vrijednost, omjer enzim/supstrat te vrsta enzima. Dobiveni rezultati ukazuju da hidroliza proteina ovisi o vrsti enzima, odnosno djelovanjem enzima Alkalaze postiže se najviši stupanj hidrolize proteina iz pogače lana. Također, dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima hidrolize proteina iz pogače konoplje kada je korišteno 6 različitih proteaza (Alkalaza, Neutraza, Protamex, Flavourzyme, pepsin i tripsin) pri čemu je s enzimom Alkalazom dobiven DH od 42%, Protamexom 32% te Neutrazom 20,8% (Tang i sur. 2009). Isti autori ujedno ukazuju na činjenicu da se odabirom odgovarajuće proteaze i vremena hidrolize mogu dobiti hidrolizati s različitim DH vrijednostima.

4.2. Antioksidacijski potencijal pripremljenih hidrolizata proteina lana

Antioksidacijski potencijal proteinskih hidrolizata lana određen je ORAC metodom. Metoda se temelji na smanjenju razine fluorescencije zbog oksidacije fluoresceina izazvane peroksid radikalom koji potječe od AAPH. Cilj eksperimenta bio je utvrditi posjeduju li pripremljeni proteinski hidrolizati lana antioksidacijsku aktivnost, odnosno postoje li razlike u antioksidacijskom potencijalu s obzirom na vrstu enzima korištenog tijekom pripreme hidrolizata. Antioksidacijska aktivnost hidrolizata proteina lana pripremljenih enzimima Alkalaza, Neutraza i Protamex nakon 240 minuta hidrolize izražena je kao ORAC vrijednost i prikazana na Slici 7.

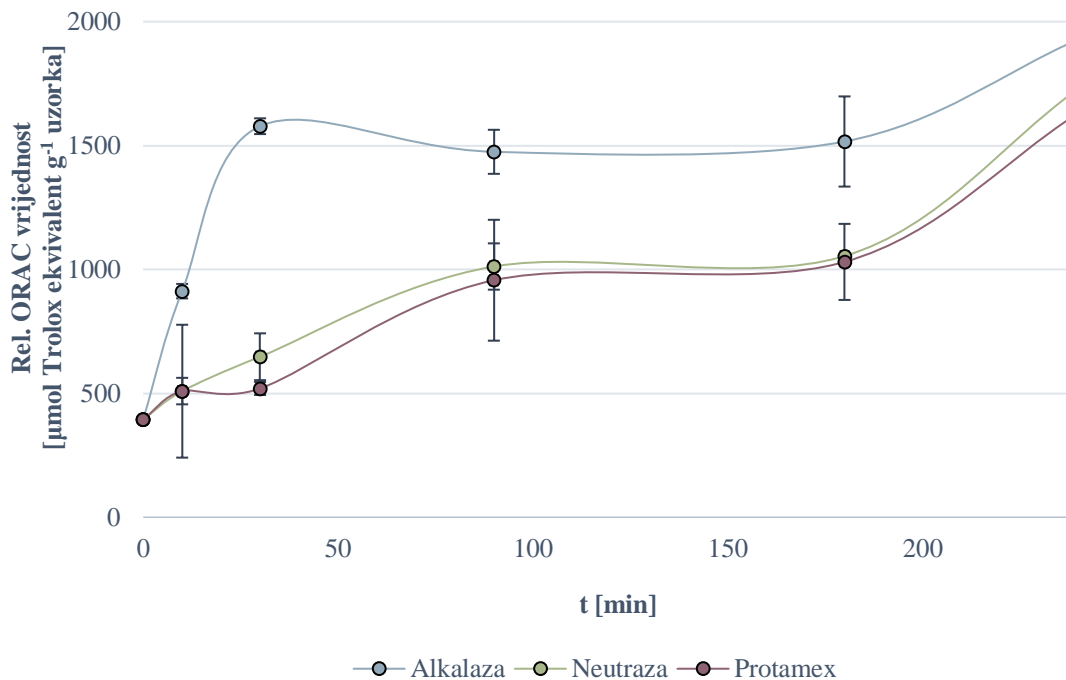


Slika 7. Relativna ORAC vrijednost proteinskih hidrolizata lana dobivenih pomoću enzima Alkalaze, Neutrazze i Protamex-a.

Kao što je vidljivo iz Slike 7, najveću ORAC vrijednost pokazuje proteinski hidrolizat lana pripremljen enzimom Alkalazom (1928,35 μmol Trolox ekvivalent g⁻¹ uzorka). Nakon njega slijedi proteinski hidrolizat pripremljen enzimom Neutrazom (1729,577 μmol Trolox ekvivalent g⁻¹ uzorka), dok proteinski hidrolizat pripremljen Protamex-om pokazuje najmanju ORAC vrijednost (1631,044 μmol Trolox ekvivalent g⁻¹ uzorka). Razlika u izmjerenim ORAC vrijednostima posljedica je specifičnog hidrolitičkog djelovanja pojedinog enzima na proteine

lana. Naime, svaki je enzim proteine hidrolizirao na peptide različitih dužina i sastava te slobodne aminokiseline s različitim antioksidacijskim potencijalom što je rezultiralo i različitim ORAC vrijednostima. U rezultatima istraživanja antioksidacijske aktivnosti peptida koji se oslobađaju tijekom hidrolize proteina lana enzimom Alkalazom utvrđena je ORAC vrijednost hidrolizata od 930 $\mu\text{mol Trolox ekvivalent g}^{-1}$ proteina, dok su ORAC vrijednosti razdvojenih frakcija peptida bile u rasponu 1500-3580 $\mu\text{mol Trolox ekvivalent g}^{-1}$ proteina (Silva i sur. 2017). Nadalje, rezultati koje su objavili Karamać i sur. (2016) ukazuju da je najveći antioksidacijski potencijal hidrolizata proteina lana postignut djelovanjem enzima Alkalaze. Naši rezultati određivanja antioksidacijskog potencijala hidrolizata lana su u skladu s ova dva prethodno spomenuta istraživanja. Nadalje, u istraživanjima hidrolize proteina iz pogače uljane repice, enzimom Alkalazom postignuta je najveća antioksidacijska vrijednost u usporedbi s hidrolizatima dobivenim djelovanjem enzima poput pankreatina, tripsina i pepsina (Alashi i sur., 2014). Iako točan mehanizam antioksidacijskog djelovanja proteinskih hidrolizata nije u potpunosti razriješen, do sada objavljeni literaturni podaci ukazuju da su antioksidacijska svojstva povezana sa sastavom aminokiselina, molekulskom masom, strukturom i hidrofobnošću oslobođenih peptida i aminokiselina (Alashi i sur., 2014; Udenigwe i Aluko, 2012).

Kako bi se utvrdilo mijenja li se antioksidacijski potencijal hidrolizata proteina lana tijekom postupka hidrolize, ORAC metodom praćena je promjena antioksidacijskog potencijala proteinskih hidrolizata lana tijekom trajanja postupka hidrolize (Slika 8). Kao što je prethodno opisano, za djelovanje hidrolitičkih enzima Alkalaze, Neutraze i Protamex-a optimalna temperatura iznosi između 50 i 55 °C, a zagrijavanje reakcijske smjese rezultira značajnim energetskim troškovima. Stoga se htjelo istražiti mogu li se u kraćem vremenu hidrolize pripremiti proteinski hidrolizati s istim ili čak većim antioksidacijskim potencijalom od hidrolizata dobivenih nakon 240 minuta hidrolize.



Slika 8. Promjena relativne ORAC vrijednosti tijekom hidrolize proteina lana djelovanjem enzima Alkalaze, Neutraze i Protamex-a

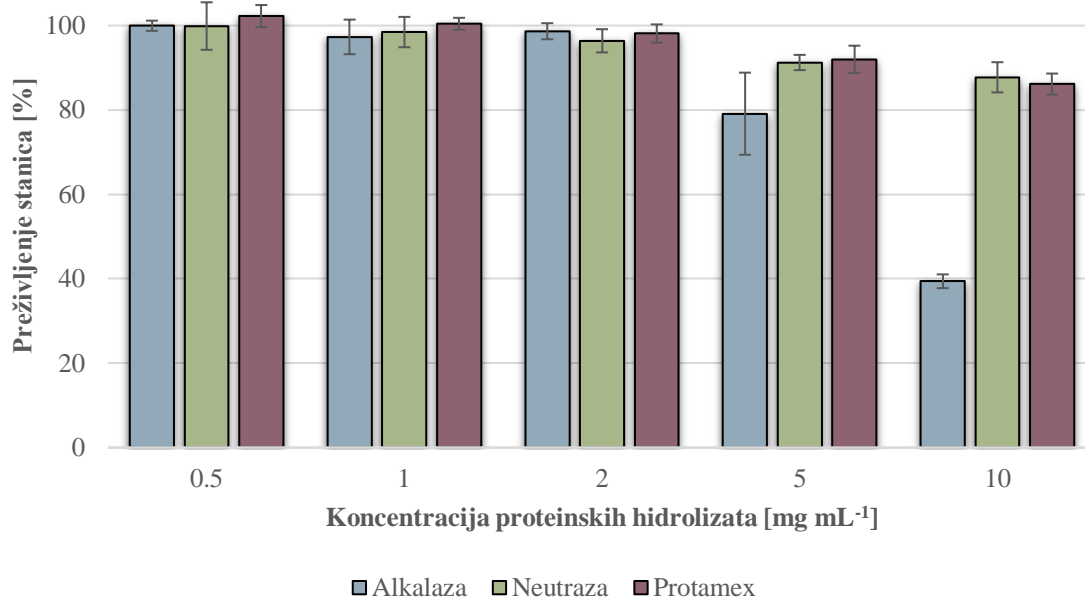
Na Slici 8 prikazana je promjena relativnih ORAC vrijednosti tijekom hidrolize proteina lana izražene u odnosu na standard Trolox. Iz Slike 8 može se zaključiti da se s povećanjem vremena hidrolize povećava i antioksidacijski potencijal izražen kao ORAC vrijednost. U konačnici, najveći antioksidacijski potencijal dobiven je nakon 240 minuta hidrolize i to za sve korištene enzime. Kao što je u opisano u literaturi (Sarmadi i Ismail, 2010), na antioksidacijska svojstva proteina/peptida utječe duljina peptida, odnosno veću antioksidacijsku aktivnost imaju kraći peptidi. Stoga, ako se u obzir uzmu stupnjevi hidrolize opisani u prethodnom poglavlju, može se povući paralela između stupnja hidrolize i antioksidacijske aktivnosti. Kao što je već navedeno, najveći se stupanj hidrolize postiže djelovanjem enzima Alkalaze, a i najveće ORAC vrijednosti izmjerene su u uzorcima pripremljenim pomoću enzima Alkalaze pa su dobiveni rezultati u skladu s literaturnim podacima. Do odstupanja od navedenog dolazi u slučaju hidrolizata pripremljenih djelovanjem enzima Neutraze i Protamex-a. Hidrolitičkom aktivnošću Protamex-a postiže se visok stupanj hidrolize, sličan onome dobivenom djelovanjem enzima Alkalaze, ali hidrolizati pripremljeni Protamex-om pokazuju najnižu ORAC vrijednost. Uzrok toj pojavi može biti otpuštanje slobodnih aminokiselina za koje je pokazano da imaju manju antioksidacijsku aktivnost u

usporedbi s peptidima (Kamau i Lu, 2011). Djelovanjem enzima Neutrase postiže se najniži stupanj hidrolize, dok krivulja promjene ORAC vrijednosti prati onu dobivenu djelovanjem enzima Protamex-a. Iz svega navedenog, a na temelju dobivenih rezultata ne može se utvrditi veza između stupnja hidrolize i antioksidacijske aktivnosti hidrolizata lana. Chen i sur. (1995) ukazuju da je antioksidacijska aktivnost posljedica karakterističnog aminokiselinskog slijeda u nastalom peptidu, a koji će peptid nastati ovisi o korištenom hidrolitičkom enzimu budući da svaki enzim cijepa supstrat na specifičan način. Također, viša ORAC vrijednost manjih peptida može biti posljedica povećane mogućnosti interakcija i doniranja elektrona slobodnim radikalima za razliku od većih peptida koji mogu smanjiti mogućnost da stupaju u interakcije sa slobodnim radikalima (Silva i sur., 201)

4.3. Učinci hidrolizata proteina lana na proliferaciju HeLa i HaCaT stanične linije

Antioksidacijska aktivnost spojeva određuje se različitim kemijskim metodama, a prije njihove *in vivo* primjene, određivanje antioksidacijskog djelovanja u kulturama stanica jedan je od načina da se predvide učinci na staničnoj razini. Da bi se istražilo potencijalno antitumorsko djelovanje proteinskih hidrolizata iz različitih izvora, prati se utjecaj dodatka hidrolizata na proliferaciju raznih tumorskih staničnih linija. Stanice se inkubiraju različitim koncentracijama proteinskih hidrolizata tijekom 12, 24, 48 ili 72 sata, ovisno o korištenoj staničnoj liniji. Nakon tretmana, postoji nekoliko metoda kojima se može odrediti antitumorska aktivnost proteinskih hidrolizata. Za određivanje antiproliferacijskog, odnosno citotoksičnog učinka proteinskih hidrolizata često se koristi MTT metoda ili njene varijante poput MTS metode, a koje se temelje na određivanju aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze u živim stanicama.

Za potrebe ovog diplomskog rada korištena je tumorska stanična linija HeLa. Stanice su nacijeppljene u jažice u koncentraciji 3×10^4 stanica mL^{-1} te su nakon prihvaćanja za podlogu tretirane proteinskim hidrolizatima pripremljenim hidrolitičkim enzimima Alkalazom, Neutrazom i Protamex-om u koncentraciji od 0,5, 1, 2, 5, 10 mg mL^{-1} . Preživljenje stanica određeno je MTS metodom (Slika 9).



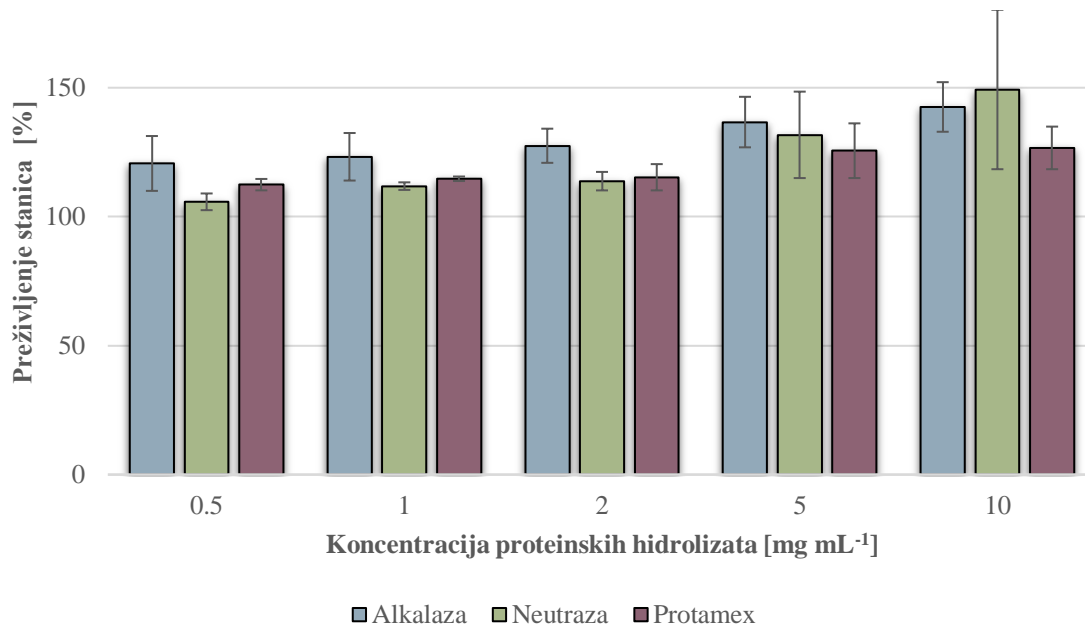
Slika 9. Učinak različitih koncentracija proteinskih hidrolizata lana pripremljenih enzimima Alkalazom, Neutrazom i Protamex-om na proliferaciju HeLa stanične linije.

Na Slici 9 prikazan je postotak preživjelih stanica u ovisnosti o koncentraciji proteinskih hidrolizata pripremljenih različitim hidrolitičkim enzimima. Neovisno o korištenom enzimu, koncentracije hidrolizata od 0,5, 1 i 2 mg mL⁻¹ ne pokazuju značajno antiproliferacijsko djelovanje na tumorsku staničnu liniju HeLa. Dodatkom hidrolizata pripremljenog enzimom Alkalazom u koncentraciji od 5 mg mL⁻¹ zapažen je antiproliferacijski učinak na HeLa stanice pri čemu je preživljenje stanica iznosilo 79,96±9,72%. Dodatkom 5 mg mL⁻¹ hidrolizata pripremljenih enzimima Neutraza i Protamex nije uočen značajan citotoksičan učinak te je postignuto slično preživljenje HeLa stanica od 91,25% odnosno 91,98%. Citotoksičan efekt proteinskih hidrolizata izraženiji je kod tretmana pri koncentraciji od 10 mg mL⁻¹, pri čemu je djelovanjem hidrolizata dobivenog enzimom Alkalazom postignuto preživljenje stanica od 39,83%. Također, pri tretmanu HeLa stanica s 10 mg mL⁻¹ hidrolizata pripremljenih enzimima Neutrazom i Protamex-om uočen je blagi citotoksičan učinak te je preživljenje stanica iznosilo 87,7% i 86,13%. Prema našim saznanjima, u dostupnoj literaturi ne postoje podaci o *in vitro* učincima proteina/peptida iz pogača lana na proliferaciju stanica. Udenigwe i sur. (2009) ispitivali su učinke peptidnih frakcija proteina lana na indukciju proizvodnje NO u mišjim makrofagima te pri tom nisu uočili citotoksične učinke u rasponu koncentracija 0,2 -1 mg mL⁻¹. Također, u istom radu autori su objavili da tijekom tretmana dvije tumorske stanične linije (HL-60 i MCF-7) s 0,2 mg mL⁻¹ frakcija

peptida lana nisu uočeni citotoksični učinci. S druge strane, citotoksični učinci etanolnih ekstrakata klica lana pokazani su na dvije tumorske stanične linije MCF-7 i MDA-MB-231 pri čemu je došlo do značajnog smanjenja rasta obje stanične linije te induciranja apoptoze (Lee i Cho, 2012). Ti se učinci povezuju s djelovanjem različitih bioaktivnih tvari (α -linoleinskoj kiselini i prekursorima lignana) te niskoj razini za ljudsko konzumiranje toksičnih cijanogenih glikozida prisutnih u klicama lana.

Ako se uzmu u obzir izmjerene ORAC vrijednosti proteinskih hidrolizata i njihov utjecaj na preživljenje tumorske stanične linije HeLa, može se uočiti da najveći citotoksični utjecaj ima proteinski hidrolizat pripremljen enzimom Alkalazom kojem je ujedno određena i najveća ORAC vrijednost. Dobiveni su rezultati u skladu s rezultatima koje su objavili You i sur. (2011) koji su utvrdili korelaciju između antioksidacijske aktivnosti peptida izoliranih iz ribe čikov i njihovog antiproliferacijskog djelovanja na tumorske stanice dojke i debelog crijeva. Nadalje, González-Montoya i sur. (2016) također su objavili rezultate koji ukazuju na povezanost visoke antioksidacijske aktivnosti peptidnih frakcija dobivenih simuliranom gastrointestinalnom digestijom iskljanih sjemenki soje i antiproliferacijske aktivnosti na tumorske stanične linije dojke (MCF-7, MDA-MB-231) i vrata maternice (HeLa, SiHa, CasKi). Stoga se može pretpostaviti da antioksidansi iz različitih prirodnih izvora mogu imati utjecaj na sprečavanje razvoja oboljenja uzrokovanih reaktivnim kisikovim vrstama, posebice nekih oblika tumora.

Tijekom praćenja antiproliferacijskih učinaka bioaktivnih tvari na tumorskim stanicama, bitno je da one djeluju samo tumorske stanice, a bez štetnih učinaka na normalne stanice. Stoga je u ovom radu ispitan i proliferacijski učinak proteinskih hidrolizata lana na normalnoj staničnoj liniji HaCaT. Stanice su nacijepnjene u *multiwell* ploču pri čemu je koncentracija stanica u svakoj jažici iznosila 3×10^4 stanica mL^{-1} . Nakon 24 sata, stanice su tretirane proteinskim hidrolizatima lana u koncentracijama od 0,5, 1, 2, 5 i 10 mg mL^{-1} . Vijabilnost stanica određena je MTS metodom nakon 72 sata od tretmana (Slika 10).



Slika 10. Učinak različitih koncentracija proteinskih hidrolizata lana pripremljenih Alkalazom, Neutrazom i Protamex-om na proliferaciju HaCaT stanične linije

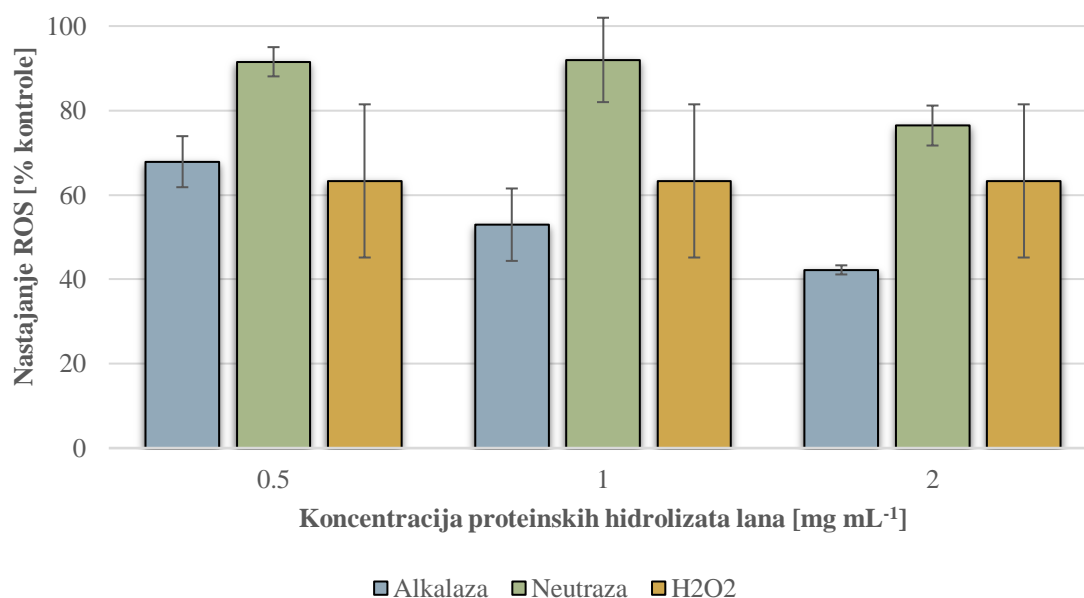
Rezultati dobiveni nakon tretmana HaCaT stanične linije različitim koncentracijama proteinskih hidrolizata lana prikazani su na Slici 10. Neovisno o enzimu korištenom za pripremu hidrolizata, vidljivo je da hidrolizati lana ne pokazuju antiproliferacijski učinak na HaCaT stanice. Štoviše, pri tretmanu stanica višim koncentracijama hidrolizata (5 i 10 mg mL⁻¹) dolazi do značajnog stimulacijskog učinka na proliferaciju stanica u rasponu 26-49%. Usporedbom proteinskih hidrolizata pripremljenih različitim enzimima, vidljivo je da pri svim ispitanim koncentracijama hidrolizata, najveći proliferacijski učinak na HaCaT stanice ima hidrolizat lana dobiven djelovanjem enzima Alkalaze. Proteinski hidrolizat lana pripremljen enzimom Neutrazom pokazuje veći proliferacijski učinak na HaCaT stanice nego proteinski hidrolizat lana pripremljen enzimom Protamexom (iako hidrolizat pripremljen enzimom Protamex-om ima veći stupanj hidrolize nego djelovanjem enzimom Neutraza). S druge strane, proliferacijski učinak hidrolizata lana na HaCaT stanice povezan je antioksidacijskom aktivnošću tj. njihovim ORAC vrijednostima, a što je opet u korelaciji s rezultatima koje su objavili González-Montoya i sur. (2016).

Proteinski hidrolizati biljnog porijekla kompleksne su mješavine aminokiselina, oligopeptida, fenolnih i drugih spojeva koji utječu na rast i metabolizam stanica *in vitro*. U literaturi su opisani stimulacijski učinci proteinskih hidrolizata biljnog podrijetla na rast/produktivnost staničnih linija kao što su CHO stanice (Kim i Lee, 2009) i THP-1 stanice

(Girón-Cale i sur., 2008). Međutim, zabilježeni su i inhibitorni učinci biljnih hidrolizata na rast i produktivnost stanica koji se mogu se objasniti razlikom u sastavu i koncentraciji peptida prisutnih u hidrolizatima (Girón-Cale i sur., 2010). Različiti proteinski i peptidni profili u hidrolizatima lana pripremljeni enzimima Alkalazom, Neutrazom i Protamex-om povezani su s njihovim različitim stimulacijskim učincima na HaCaT stanice. Također, dobiveni rezultati ukazuju na potrebu optimizacije protokola hidrolize različitim enzimima kako bi se oni mogli koristiti kao sastojak medija za uzgoj stanica u cilju poboljšanja brzine rasta i produktivnosti stanica.

4.4. Učinci hidrolizata proteina lana na inducirani oksidacijski stres u HaCaT staničnoj liniji

Da bi se ispitalo imaju li pripremljeni proteinski hidrolizati lana protektivan učinak na stanice izložene oksidacijskom stresu, nakon predtretmana HaCaT stanica hidrolizatima lana ($0,5-2 \text{ mg mL}^{-1}$) inducirani je oksidacijski stres dodatkom H_2O_2 . Nastajanje reaktivnih kisikovih vrsta određeno je spektrofluorimetrijski DCFH-DA metodom opisanom u poglavlju 3.2.4 i prikazano je na Slici 11. Protektivni učinak određen je za hidrolizate lana pripremljene enzimima Alkalazom i Neutrazom s obzirom da su im određene najviše ORAC vrijednosti.



Slika 11. Utjecaj proteinskih hidrolizata lana pripremljenih Alkalazom i Neutrazom na inducirani oksidacijski stres u HaCaT staničnoj liniji

DCFH-DA je permeabilni spoj (boja) koji može proći membranu HaCaT stanice te se djelovanjem staničnih esteraza oksidirati u prisustvu ROS-a u oblik koji fluorescira (DCF) i koji se spektrofluorimetrijski može kvantificirati. Kada se u kulturu stanica doda antioksidacijski spoj, on može hvatati peroksilne radikale te tako smanjiti nastanak DCF. Uspoređujući nastajanje ROS-a u HaCaT stanicama predtretiranima proteinskim hidrolizatima i bez tretmana, vidljivo je da protektivan učinak pokazuje proteinski hidrolizat pripremljen enzimom Alkalazom. Protektivni učinak hidrolizata pripremljenog Alkalazom kreće se u rasponu od 4,5 do 21,1% i proporcionalan je koncentraciji hidrolizata. Hidrolizat pripremljen enzimom Neutrazom nije pokazao protektivan učinak, štoviše njegov dodatak je povećao udio ROS-a u stanicama u rasponu 13,2-18,4%. Prethodna istraživanja pokazala su protektivne učinke hidrolizata konoplje (Lu i sur., 2010) i soje (Zhang i sur., 2018) na PC-12 i CaCo-2 staničnim linijama. Ovom činjenicom se mogu objasniti razlike u protektivnom i inducirajućem djelovanju hidrolizata pripremljenog Alkalazom, odnosno Neutrazom tijekom oksidacijskog stresa u HaCaT stanicama. Također, Silva i sur. (2013) objavili su da vodeni i metanolni ekstrakti hidrolizata lana pripremljeni enzimom Alkalazom nisu imali protektivni učinak na nastajanje H₂O₂-induciranih jednolančanih DNA lomova određenih metodom kometa iako su hidrolizati pokazali visoku antioksidacijsku aktivnost. Razlike u strukturi peptida, pobočnim grupama aminokiselina te stanična biodostupnost mogu utjecati na interakciju hidrolizata lana sa slobodnim radikalima te tako imati konačan utjecaj na zaštitu od oksidacijskog stresa u stanicama.

Slično kao i za proliferacijsko/antiproliferacijsko djelovanje pripremljenih hidrolizata lana, za zaštitu stanica od oksidacijskog stresa potrebno je voditi računa o vrsti enzima za hidrolizu i koncentraciji hidrolizata kako bi se postigao optimalan biološki učinak.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju navedenog mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Djelovanjem hidrolitičkih enzima Alkalaze, Neutrase i Protamex-a pripremljeni su proteinski hidrolizati lana, pri čemu je najveći stupanj hidrolize od 42,62% postignut korištenjem enzima Alkalaze.
2. Proteinski hidrolizati lana pripremljeni enzimima Alkalazom, Neutrazom i Protamex-om posjeduju visok antioksidacijski potencijal, a najveću ORAC vrijednost od 1928,35 μmol Trolox ekvivalent g^{-1} uzorka ima hidrolizat pripremljen enzimom Alkalazom.
3. Antioksidacijski potencijal proteinskih hidrolizata lana proporcionalan je vremenu trajanja hidrolize. Povećanjem vremena hidrolize dobivaju se hidrolizati s većim antioksidacijskim potencijalom, neovisno o korištenom enzimu.
4. Proteinski hidrolizati lana u koncentraciji od 5 i 10 mg mL^{-1} pokazuju antiproliferacijski učinak na tumorsku staničnu liniju HeLa. Najveći antiproliferacijski učinak od 60% pokazuje hidrolizata lana pripremljen enzimom Alkalazom. Niže koncentracije svih hidrolizata lana ne pokazuju antiproliferacijski učinak na HeLa stanice.
5. Svi proteinski hidrolizati lana pokazali su proliferacijski učinak na HaCaT staničnu liniju. Najveći proliferacijski učinak pri svim ispitanim koncentracijama pokazao je hidrolizat pripremljen enzimom Alkalazom, što je u korelaciji s njegovom ORAC vrijednosti.
6. Proteinski hidrolizat lana pripremljen enzimom Alkalazom u koncentracijama 0,5-2 mg mL^{-1} pokazao je protektivan učinak ovisan o koncentraciji na inducirani oksidacijski stres u HaCaT stanicama.

6. LITERATURA

Adler-Nissen, J. (1986) Enzymic hydrolysis of food proteins, Elsevier Applied Science, New York

Alam, M. N., Bristi, N. J., Rafiquzzaman, M. (2013) Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm, J.* **21**, 143-152.

Alashi, A. M., Blanchard, C. L., Mailer, R. J., Agboola, S. O., Mawson, A. J., He, R., Girgih, A., Aluko, R. E. (2014) Antioxidant properties of Australian canoma meal protein hydrolysates. *Food Chem.* **146**, 500-506.

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

Bekhit, A. E. A., Shavandi, A., Jodjaja, T., Birch., J., Teh, S., Ahmed, I. A. M., Al-Juhaimi, F. Y., Saeedi, P., Bekhit, A. A. (2018) Flaxseed: Composition, detoxification, utilization and opportunities. *Biocat. Agric. Biotechnol.* **13**, 129-152.

Bierenbaum, M. L., Reichstein, R., Watkins, T. R. (1993) Reducing atherogenic risk in hyperlipemic human with flax seed supplementation: a preliminary report. *J. Am. Coll. Nutr.* **12**, 501-504.

Bommraeddy, A., Zhang, X., Schrader, D., Kaushik, R. S., Zeman, D., Matthees, D. P. (2009) Effects of dietary flaxseedon intestinal tumorigenesis in Apc Min mouse. *Nutr. Cancer* **61**, 276-283.

Boukamp, P., Petrussevka, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N. E. (1988) Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *J. Cell Biol.* **106**, 761-771.

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

Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F. (1995) Structual analysis of antioxidant peptides from soybean *b*-conglycinin. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 574-578.

- Cunnane, S. C., Hamadeh, M. J., Liede, A. C., Thompson, L. U., Wolever, T. M., Jenkins, D. J. (1995) Nutritional attributes of traditional flaxseed in healthy young adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**, 62-68.
- Franek, F., Hohenwarter, Katinger, H. (2000) Plant protein hydrolysates: Preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotechnol. Prog.* **16**, 688-692.
- Garcia, M. C., Puchalska, P., Esteve, C., Marina, M. L. (2013) Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant and other less occurrence bioactivities. *Talanta* **106**, 328-349.
- Girón-Cale, J., Vioque, J., Pedroche, J., Alaiz, M., Yust, M. M., Megías, C., Millán, F. (2008) Chickpea protein hydrolysate as a substitute for serum in cell culture. *Cytotechnology* **57**, 263-272.
- Girón-Cale, J., Alaiz, M., Vioque, J. (2010) Effect of chickpea protein hydrolysates on cell proliferation and *in vitro* bioavailability. *Food Res. Int.* **43**, 1365-1370.
- González-Montoya, M., Ramón-Gallegos, E., Robles-Ramírez, M. C., Mora-Escobedo, R. (2016) Evaluation of the antioxidant and antiproliferative effects of three peptide fractions of germinated soybeans on breast and cervical cancer cell lines. *Plant Foods Hum. Nutr.* **71**, 368-374.
- Goyal, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Gill, S., Sihag, M. (2013) Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *J. Sci. Food Technol.* **51**, 1633-1653.
- Halliwell, B. (2003) Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Lett.* **540**, 3-6.
- Halliwell, B. (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. T.* **35**, 1147-1150.
- Kannan, A., Hettiarachchya, N., Lay, N. O., Liyanage, R. (2010) Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran. *Peptides* **31**, 1629-1634.
- Kamau, S. M., Lu, R. R. (2011) The effect of enzymes and hydrolysis conditions on degree of hydrolysis and DPPH radical scavenging activity of whey protein hydrolysates. *Curr. Res. Dairy Sci.* **3**, 25-35.

- Karamać, M., Kulczyk, A., Sulewska, K. (2014) Antioxidant activity of hydrolysates prepared from flaxseed cake proteins using pancreatin. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **64**, 227–233.
- Karamać, M., Kosinska-Cagnazzo, A., Kulczyk, A. (2016) Use of different proteases to obtain flaxseed protein hydrolysates with antioxidant activity. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1027, 1-13.
- Kim, S .E., Kim, H. H., Kim, J. Y., Kang, Y. I., Woo, H. J., Lee, H. J. (2000) Anticancer activity of hydrophobic peptides from soy proteins. *Bio Factors* **12**, 151-155.
- Kim S., Lee, G. (2009) Development of serum-free medium supplemented with hydrolysates for the production of therapeutic antibodies in CHO cell cultures using design of experiments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**, 639-648.
- Lee, J., Cho, K. (2012) Flaxseed sprouts induce apoptosis and inhibit growth in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *In Vitro Cell. Dev. An.* **48**, 244-250.
- Leo, P., Galesi, A. L. L., Suazo, C. A., T., Moraes, A. M. (2008) Animal cells: Basic concepts. U: Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy (Castilho., L. R., Moraes, A. M., Augusto, E. F. P., Butler, M., ured.), Taylor & Francis Group, New York/Abigdon, str. 13-38.
- Lucy, B. P., Nelson-Rees, W. A., Hutchins, G. M. (2009) Henrietta Lacks, HeLa Cells And Cell Culture Contamination. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **133**, 1463-1467.
- Lu, R. R., Qian, P., Sun, Z., Zhou, X. H., Chen, T. P., He, J. F., Zhang, H., Wu, J. (2010) Hempseed protein derived antioxidative peptides: Purification, identification and protection from hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Food Chem.* **123**,1210-1218.
- Marambe, P. W. M. L. H. K., Shand, P. J., Wanasundara, J. P. D. (2008) An *in vitro* investigation of selected biological activities of hydrolysed flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **85**, 1155-1164.
- Martindale, J. L., Holbrook, N. J. (2002) Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* **192**, 1-15.
- Moraes, A. M., Mendonca, R., Z., Suazo, C. A. T. (2008) Culture media for animal cells. U: Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy (Castilho., L. R., Moranes, A. M., Augusto, E. F. P., Butler, M., ured.), Taylor & Francis Group, New York/Abigdon, str. 111-128.

- Nwachukwu, I. D., Aluko, R. E. (2018) Antioxidant Properties og Flaxseed Protein Hydrolyzates: Influence of Hydrolytic Enzyme Concentration and Peptide Size. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **95**, 1105-1118.
- Oomah, B. D. (2001) Flaxseed as s functional food source. *J. Sci. Food Agr.* **81**, 889-894.
- Oyeleye, O. O., Ogundeji, S. T., Ola, S. I., Omitogun, O. G. (2016) Basics of animal cell culture: Foundation for modern science. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* **12**, 6-16.
- Palmieri, B., Sblendorio, V., (2007) Oxidative stress tests: oveview od reliability and use. *Eur.Rev. Med. Pharmaco.* **11**, 309-342.
- Rani, V., Asthana, S., Vadhera, M., Yadav, U. C. S., Atale, N. (2015) Tools and techniques to measure oxidative stress. U: Free radicals in human health and disease (Rani, V., Yadav, U. C. S., ured.), Springer, New Delhi/Heidelberg/New York/Dordrecht/London, str. 43-56.
- Ratnayake, W. M. N., Behrens, W. A., Fischer, P. W. F., L'Abbe, M. R., Mongeau, R., Beare-Rogers, J. L. (1992) Chemical and nutritional studies of flaxseed (variety Linott) in rats. *J. Nutr. Biochem.* **3**, 232-240.
- Sarmadi, B. H., Ismail, A. (2010) Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides* **31**, 1949-1956.
- Serraino, M., Thompson, L. U. (1991) The effect of flaxseed supplementation on early risk markers for mammary carcionogenesis. *Cancer Lett.* **60**, 135-142.
- Silva, F. G. D., O' Callaghan, Y., O'Brien, M., Netto, F. M. (2013) Antioxidant capacity of flaxseed products: the effect of in vitro digestion. *Plant Foods Hum Nutr.* **68**, 24-30.
- Silva, F. G. D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Netto, F. M., Miralles, B. (2016) Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by Alcalase[®] hydrolysis: Antioxidant activity. *LWT – Food Sci. Technol.* **76**, 140-146.
- The Copia Institute (2015) *HeLa Cells: Grown Without Permission For The Benefit of Medicine*. The Copia Institute, <<https://copia.is/wp-content/uploads/2015/05/HeLa-Cells-Copia-Case-Study.pdf>>. Pristupljeno 5. srpnja 2019.
- Tang, C-H., Wang, X-S., Yang, X-Q. (2009) Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chem.* **114**, 1484–1490

-
- Thompson, L. U., Seidl, M. M. Rickard, S. E., Orcheson, L. J., Fong, H. H. (1996) Antitumorigenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed. *Nutr. Canc.* **26**, 159-165.
- Udenigwe, C. C., Lu, Y. L., Han, C. H., Hou, W. C., Aluko, R. E. (2009) Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages. *Food Chem.* **116**, 277-284.
- Udenigwe, C. C., Adebisi, A. P. Doyen, A., Li, H., Bazinet, L., Aluko, R. E. (2012) Low molecular weight flaxseed protein-derived arginine-containing peptides reduced blood pressure of spontaneously hypertensive rats faster than amino acid form of arginine and native flaxseed protein. *Food Chem.* **132**, 468-475.
- Udenigwe, C. C., Aluko, R. E. (2012) Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *J. Food Sci.* **71**, 11-24.
- Van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svehningsen, A., Honegger, P., Knudsen, L. E., Lindl, T., Norberg, J., Price, A., Scarino, M. L., Gstraunthaler, G. (2010) Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicol. In Vitro* **24**, 1053-1063.
- You, L., Zhao, M., Liu, P. H., Regenstein, J. M. (2011) Antioxidant and antiproliferative activities of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion. *J. Agr. Food Chem.* **59**, 7948-7953.
- Zhang, Q., Tong, X., Qi, B., Wang, Z., Li, Y., Sui, J., Jiang, L. (2018) Changes in antioxidant activity of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate under simulated gastrointestinal digestion and transepithelial transport. *J. Funct. Foods* **42**, 298-305.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ime i prezime studenta