

Učinak proteinskih hidrolizata uljne pogače lana na rast HEK 293 stanične linije

Režek, Laura

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:207994>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-28**



Repository / Repozitorij:

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



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

Laura Režek
0058217199

**UČINAK PROTEINSKIH HIDROLIZATA ULJNE
POGAČE LANA NA RAST HEK 293 STANIČNE
LINIJE**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Tehnologija vitamina i hormona

Mentor: prof. dr. sc. Igor Slivac

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

UČINAK PROTEINSKIH HIDROLIZATA ULJNE POGAČE LANA NA RAST HEK 293 STANIČNE LINIJE

Laura Režek, 0058217199

Sažetak: U posljednje se vrijeme sve veća pažnja pridaje razvoju medija za uzgoj kultura životinjskih stanica koji ne sadrži serum, uslijed uočavanja njegovih brojnih nedostataka. Svoju primjenu u ovim tehnologijama pronašli su proteinski hidrolizati biljnog podrijetla koji su se pokazali kao učinkovit nutritivni dodatak. Kao izvor proteina dokazale su se tzv. uljne pogače sjemenki uljarica zaostale nakon postupaka ekstrakcije ulja. Radi se o industrijskom nusproizvodu relativno ograničene iskoristivosti. Cilj je ovog rada bio ispitati učinak proteinskih hidrolizata uljne pogače lana dobivenih pomoću enzima *Alcalase*, *Neutrased* i *Protamex* na rast i metabolizam HEK 293 stanične linije te mogućnost djelomične zamjene seruma u mediju za uzgoj stanica. Rezultati su pokazali da proteinski hidrolizati u koncentraciji od $0,5 \text{ g L}^{-1}$ i $2,5 \text{ g L}^{-1}$ mogu poslužiti kao zamjena dijela seruma kada se pripreme cijepanjem enzimom *Neutrased*. Hidrolizati pripremljeni enzimima *Protamex* i *Alcalase* pokazali su manju učinkovitost na rast stanica, pa čak i inhibitorno djelovanje. Manja koncentracija hidrolizata pokazala je bolji učinak na rast stanica nego hidrolizati u većoj koncentraciji.

Ključne riječi: proteinski hidrolizati, uljna pogača lana, HEK 293, kultura životinjskih stanica

Rad sadrži: 33 stranica, 6 slika, 3 tablice, 27 literaturnih navoda, 0 priloga

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. Igor Slivac

Pomoć pri izradi: mag. ing., Marijan Logarušić

Datum obrane: 11. srpnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Technology and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

EFFECT OF FLAXSEED CAKE PROTEIN HYDROLYSATES ON GROWTH AND METABOLISM OF HEK 293 CELL LINE

Laura Režek, 0058217199

Abstract: Recently, more and more attention is paid to the development of media for the cultivation of animal cell cultures that do not contain the addition of serum, due to its many disadvantages. Protein hydrolysates of plant origin have found their application in these technologies and have proven to be an effective nutritional supplement. Oil cakes are side-products of oil extraction, an industrial residue rich in protein, have proven to be potential source of proteins to be digested into hydrolysates. The aim of this study was to examine the effect of flaxseed oil cake hydrolysates prepared by enzymes *Alcalase*, *Neutrase* and *Protamex* on the growth and metabolism of HEK 293 cell line, as well as the possibility of partial replacement of serum. The results showed that protein hydrolysates at a concentration of 0,5 g L⁻¹ and 2,5 g L⁻¹ can serve as a replacement for part of the serum when prepared by cleavage with the enzyme *Neutrase*. Hydrolysates prepared by the enzymes *Protamex* and *Alcalase* have shown lower efficacy on cell growth and even inhibitory activity. A lower concentration of hydrolysates showed a better effect on cell growth than hydrolysates of higher concentration.

Keywords: protein hydrolysates, flaxseed oil cake, HEK 293, animal cell culture

Thesis contains: 33 pages, 6 figures, 3 tables, 27 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Igor Slivac, PhD, Full Professor

Technical support and assistance: Marijan Logarušić, mag. ing.

Thesis defended: July 11, 2022

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO..... | 2 |
| 2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA..... | 2 |
| 2.2. HRANJIVI MEDIJ ZA UZGOJ STANICA | 6 |
| 2.3. PROTEINI I PROTEINSKI HIDROLIZATI ULJNE POGAČE LANA | 9 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 12 |
| 3.1. MATERIJALI | 12 |
| 3.1.1. Hidrolizati uljne pogače lana | 12 |
| 3.1.2. Kemikalije..... | 13 |
| 3.1.3. Otopine..... | 13 |
| 3.1.4. Uređaji i oprema | 14 |
| 3.1.5. Stanična linija HEK 293 | 14 |
| 3.2. METODE..... | 15 |
| 3.2.1. Uzgoj HEK 293 stanica u Petrijevoj zdjelici | 15 |
| 3.2.2. Uzgoj HEK 293 stanica u mediju s dodatkom proteinskog hidroliza lana | 15 |
| 3.2.3. Određivanje broja stanica metodom Trypan Blue | 17 |
| 3.2.4. Određivanje koncentracije glukoze u hranjivom mediju | 18 |
| 3.2.5. Određivanje koncentracije laktata u hranjivom mediju | 19 |
| 3.2.6. Izračunavanje parametara rasta HEK 293 stanica | 20 |
| 3.2.7. Statistička obrada podataka..... | 21 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 22 |
| 4.1. UČINAK DODATKA PROTEINSKIH HIDROLIZATA LANA NA RAST I METABOLIZAM HEK 293 STANICA | 23 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 29 |
| 6. POPIS LITERATURE | 30 |

1. UVOD

Zbog brojnih biofarmaceutika koji se u posljednje vrijeme sve više proizvode kulturom životinjskih stanica, dolazi do konstantnog razvoja i unaprjeđenja ove tehnologije. Kako bi se stanična kultura mogla uzgojiti, potrebno je u *in vitro* uvjetima stvoriti okruženje koje će stimulirati njihov prirodni okoliš u stanici. Jedna od komponenta koja je opskrbljivala stanice faktorima rasta, hormonima i ostalim dodatnim sastojcima, koje hranjivi medij za uzgoj nije sadržavao, te osiguravala optimalan stanični rast od najranijih je početaka ove tehnologije bio serum životinjskog podrijetla. Međutim, tek su s vremenom do izražaja došli brojni nedostaci uporabe životinjskog seruma, najčešće u pitanju FBS-a. Od visoke cijene seruma i njegove dostupnosti, preko problema u pročišćavanju rekombinantnih proteina koje uzrokuje visoka koncentracija proteina iz seruma, varijabilnosti u njegovom sastavu, pa sve do brojnih etičkih razloga oko načina njegovog pribavljanja, kao i potencijalnih prijenosnika bolesti koji u njemu mogu biti prisutni (Babcock, 2007). Sve je od navedenog potaknulo znanstvenike na potragu za novim suplementima hranjivom mediju koji neće biti životinjskog podrijetla.

Kao dobrom zamjenom pokazali su se proteinski hidrolizati biljnog podrijetla. Dokazali su se uspješnim kao djelomična ili čak potpuna zamjena za serum, a isto tako njihova je antiapoptička aktivnost došla do izražaja. Također, pogodni su i zbog svoje niske cijene (Franek i sur., 2000). Kao bogatim izvorom proteina pokazale su se uljne pogače, ostaci zaostali nakon ekstrakcije ulja iz sjemenki biljaka. Ovaj je nusproizvod inače smatran otpadom prehrambene industrije, međutim u posljednje vrijeme sve više dolazi do njegovog korištenja u biotehničkoj svrhe u kulturi životinjskih stanica. Biljka lan karakterizirana je brojnim nutritivnim i bioaktivnim spojevima, a isto se tako uljna pogača lana pokazala kao dobrim izvorom lipida, proteina, topljivih vlakna, lignana i antioksidansa (Gutiérrez i sur., 2010).

Uzimajući u obzir dosad provedena istraživanja koja su rezultirala pozitivnim učinkom biljnih proteinskih hidrolizata na proliferaciju stanica te brojne bioaktivne sastojke prisutne u lanu, osmišljen je sljedeći eksperiment koji je proveden kao dio ovog završnog rada. Cilj je stoga bio ispitati kakav će učinak dodatak proteinskih hidrolizata uljne pogače lana različitih koncentracija u hranjivi medij sa serumom imati na rast i metabolizam HEK 293 stanica, te postoji li mogućnost djelomične zamjene seruma navedenim hidrolizatima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kultura životinjskih stanica

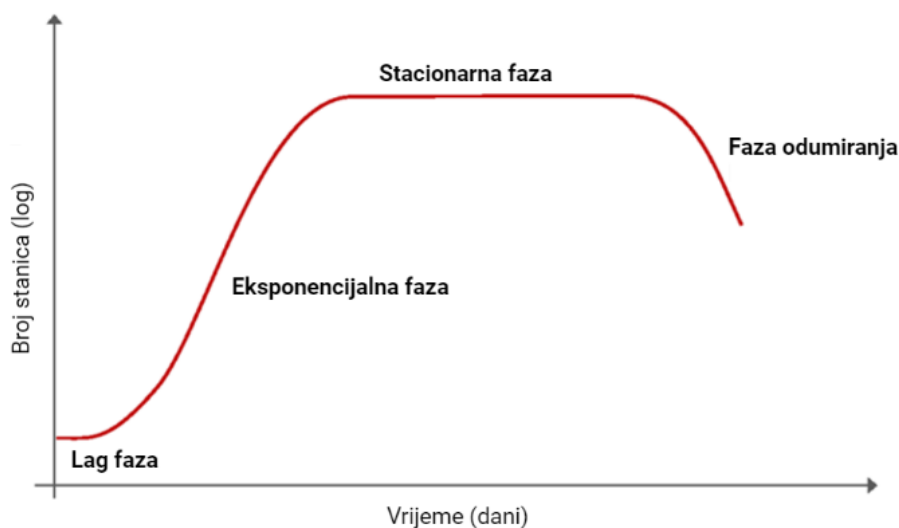
Kultura životinjskih stanica nastaje na način da se stanice izolirane iz životinjskog tkiva ili organa nastave dijeliti i izvan svog prirodnog okruženja, u kontroliranim uvjetima te opskrbljene hranjivim tvarima i faktorima rasta. Rast stanica izvan živog organizma iz kojeg potječu odvija se u *in vitro* uvjetima („na staklu“). Stanice se pritom dijele mitozom čime nastaju identične stanice kao i ona iz koje su nastale. Tada govorimo o homogenoj populaciji stanica u kojoj su sve stanice u toj staničnoj kulturi genetički jednake. Ukoliko unutar populacije stanica postoje genetičke varijacije među njima, radi se o heterogenoj populaciji stanica (Butler, 2004).

Kako bi se uspostavila stanična kultura, najprije je potrebno izolirati stanice iz odgovarajućih tkiva ili organa iz nekog organizma. Time se formira primarna stanična kultura. Takve su kulture uobičajeno heterogene te ih karakterizira niska specifična brzina rasta. Reprezentativnije su za tipove stanica u tkivu iz kojeg potječu jer zadržavaju svojstva specifična za to tkivo, odnosno svojstva kakva su posjedovala *in vivo* te tako najbolje daju sliku o svojstvima diferenciranih stanica. Primarna kultura može se precijepiti, odnosno subkultivirati u svježi medij i tamo zasebno uzgajati čime se postiže sekundarna stanična kultura. Subkultiviranje je pogodno jer se time postiže stvaranje stanične linije koja je prikladna za dugotrajnu uporabu i mogućnost njezinog stvaranja u velikim količinama bez promjena u sastavu (Oyeleye, 2016). Međutim, nakon nekoliko subkultivacija može doći do odumiranja stanica. Kako bi se ovakva smrtna ili konačna stanična linija prevela u kontinuiranu, potrebno je izvršiti postupak imortalizacije čime dobivamo staničnu liniju koja je besmrtna i može se umnožavati unedogled (Nema i Khare, 2012).

Ovisno o tome na koji način stanice u mediju za uzgoj rastu, razlikujemo adherentne i suspenzijske stanice. Adherentna kultura raste pričvršćena za površinu podloge. Zbog tog razloga stanice se prije subkultivacije moraju odvojiti od površine pomoću enzima koji će pocijepati veze kojima se stanice za nju drže. Zbog ograničenosti površine rasta zahtijevaju redovito pasažiranje, odnosno jednom kad popune površinu potrebno ih je precijepiti. Njihov je rast moguće lako provjeriti vizualnim pregledom pod svjetlosnim mikroskopom. Suspenzijske stanice s druge strane rastu po cijelom volumenu medija za uzgoj neovisno o

površini. Također, postupak precjepljivanja s njima je lakši pošto ne zahtijevaju korak enzimskog odvajanja sa površine podloge (Oyeleye i sur., 2016). Uzgoj suspenzijskih stanica jednostavno se može prebaciti u veće mjerilo za proizvodnju u bioreaktorima u većim volumenima. Većina je staničnih linija prvotno bila adherentnog rasta, no kasnije su adaptirane za rast u suspenziji upravo radi „scale up“-a procesa.

Kinetika rasta u kulturi životinjskih stanica može se pratiti pomoću krivulje rasta čiji je primjer prikazan na [slici 1](#). Stanice prolaze kroz nekoliko faza rasta koje se mogu podijeliti na lag fazu kojom ciklus započinje, zatim nastavljaju kroz logaritamsku fazu do stacionarne faze te u konačnici dolaze do faze odumiranja. Lag faza predstavlja vrijeme koje je stanicama potrebno da se priviknu na hranjivu podlogu na koju su nacijepljene odnosno na novu okolinu. U ovoj fazi stanice sintetiziraju sve potrebne enzime i intermedijere te povećavaju svoju masu i volumen. Time su u stanju prividnog mirovanja jer ne dolazi do promjene u broju stanica već se one samo pripremaju za razmnožavanje. Jednom kad se stanice priviknu na novi okoliš, ulaze u eksponencijalnu ili logaritamsku fazu rasta u kojoj dolazi do udvostručivanja stanica. Sve stanice rastu jednakom i stalnom brzinom i dolazi do naglog, eksponencijalnog porasta u broju stanica. Brzina kojom stanice rastu ne ovisi o koncentraciji hranjivih tvari pošto su one u suvišku. Ulaskom u stacionarnu fazu, ukupan broj stanica se ne mijenja jer se brzina rasta izjednačila sa brzinom odumiranja stanica. Dolazi do sinteze sekundarnih metaboliti koji nisu povezani s rastom. Kao posljednja faza nastupa faza odumiranja, u kojoj dolazi do vidljivog pada u broju stanica s vremenom. Uzrokovana je padom koncentracije hranjivih tvari i povećanom količinom nastalih toksičnih proizvoda metabolizma (Oyeleye i sur., 2016).



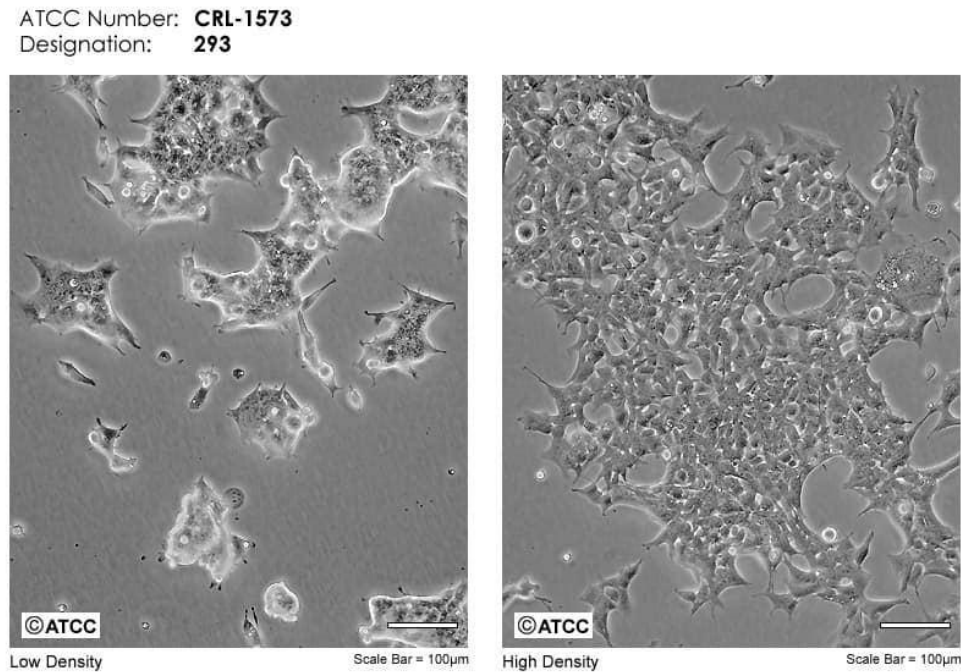
Slika 1. Primjer krivulje rasta s naznačenim fazama rasta (prema Anonymous 1, 2022.)

Kulture životinjskih stanica danas se koriste u razne svrhe. Jedna od najpoznatijih je njihova upotreba u proizvodnji virusnih cjepiva, što je zapravo bio i prvi komercijalno dostupni proizvod tehnologije životinjskih stanica. Bilo je to cjepivo protiv dječje paralize proizvedeno pomoću primarnih stanica bubrega majmuna. Biotehnoški značajni proizvodi ove tehnologije još su monoklonska protutijela, rekombinantni proteini (hormoni, interferoni, eritropoetin) i brojne druge (Macdonald, 1990).

Prednosti koje životinjske stanice imaju u proizvodnji rekombinantnih proteina jesu njihova mogućnost post-translacijskih modifikacija koje u npr. *Escherichia coli*, kao dobro istraženom i industrijski prilagođenom mikroorganizmu za bioprocese velikih razmjera, nisu moguće. Glikolizacija, metilacija, fosforilacija i druge reakcije ključne su u smotavanju kompleksnih proteina koji se tehnologijom rekombinantne DNA nastoje i mogu proizvesti samo u eukariotskim stanicama (Butler, 2005). Nadalje, životinjske stanice pokazale su se uspješnima za proizvodnju virusnih cjepiva gdje su svoju prednost, u odnosu na *in ovo* tehnologiju uzgoja virusnih čestica u kokošjim jajima, stekle pokazavši veću učinkovitost cjepiva popraćenu s manje nuspojava (Slivac i sur., 2020). Kako se broj komercijalno vrijednih bioloških tvari naglo povećao tijekom posljednjeg desetljeća, došlo je i do raširenog interesa za tehnologiju životinjskih stanica. Biofarmaceutici visoke vrijednosti i kompleksne strukture stoga se uobičajeno proizvode u životinjskim staničnim linijama. Neke od najčešće korištenih su stanice ovarija kineskog hrčka (CHO), stanice mijeloma miša (NS0), stanice bubrega humanog embrija (HEK 293), stanice bubrega mladog hrčka (BHK), stanice retinoblastoma humanog embrija (PER.C6) i druge (Butler, 2005).

HEK 293 stanična linija, prikazana na [slici 2](#), sačinjena je od imortaliziranih humanih embrijskih stanica bubrega (engl. *Human embryonic kidney*). Dobivena je iz primarne HEK kulture transformacijom sa fragmentima DNA adenovirusa tipa 5 (Ad5) na način da je Ad5 ugrađen u kromosom 19 genoma domaćina te je HEK 293 tako postala trajno transformirana. Ova je modifikacija kasnije služila za stvaranje rekombinantnih humanih adenovirusnih vektora koje karakterizira nemogućnost transkripcije zbog delecije E1 regije. Uvođenje plazmidnih vektora pod kontrolom jakog CMV promotora omogućilo je vrlo učinkovitu translaciju gena od interesa koji su umjetno ugrađeni u plazmid. To je jedna od karakteristika koja ih čini dobrim izborom u istraživanjima - omogućuju visoku razinu proizvodnje rekombinantnih proteina, uslijed uvedenog Ad5, koji se mogu proizvesti u velikim količinama (Thomas i Smart, 2005). Nadalje, prednosti HEK 293 stanica bile bi i da su brzorastuća stanična

linija, nude visoku reproducibilnost rezultata, kao i visoku podložnost i učinkovitost transfekcije, te mogućnost transfekcije širokim spektrom fizikalnih i kemijskih metoda. Osim u proizvodnji terapijskih rekombinantnih proteina, koriste se u istraživanjima raka i signalizacije receptora, a u tijeku su i istraživanja temeljena na genomskom inženjerstvu koja uključuju CRISPR metodu.



Slika 2. HEK 293 stanična linija pod svjetlosnim mikroskopom (Anonymous 2, 2022.)

Kao glavni supstrat za dobivanje energije životinjske stanice koriste glukozu. U reakcijama metaboličkih puteva glukozu se glikolizom prevodi do dvije molekule piruvata koje se zatim oksidiraju i dekarbosiliraju do acetil-koenzima A. Slijedi citratni ciklus u kojem se acetilne jedinice oksidiraju do 2 molekule CO_2 i vodu te se oslobođena energija pohranjena u obliku reduciranih koenzima koristi za sintezu ATP-a. Kako bi se navedene reakcije odvale u potpunosti i stanice osigurale energijom, važna je prisutnost kisika kao krajnjeg akceptora elektrona. Kada se stanice sisavaca nađu u uvjetima s niskom koncentracijom kisika, dolazi do prijelaza s oksidacije glukoze na anaerobnu glikolizu. Pri tome se troše velike količine glukoze pri čemu nastaje laktat. Kod stanica raka uočena je velika brzina potrošnje glukoze i nastajanja laktata čak i pri normalnim koncentracijama kisika. Ova se pojava naziva Warburgov efekt ili

aerobna glikoliza te nastaje kao rezultat deregulirane središnje metaboličke mreže, a njegovim otkrićem je prvi put opisana razlika u metabolizmu između stanica raka i normalnog tkiva (Mulukutla i sur., 2010). Nakupljanje laktata kao nusprodukta metabolizma u mediju u kojem se stanice uzgajaju moguće je do koncentracije od 50 mM, što za posljedicu ima negativan utjecaj na rast, proliferaciju i produktivnost stanica. Izlučivanje laktata tijekom eksponencijalne faze rasta imalo je štetan učinak na stanice kao što je to inhibicija rasta i ekspresije proteina te promjena obrazaca glikolizacije proteina (Liste-Calleja i sur., 2015).

2.2. Hranjivi medij za uzgoj stanica

Kako bi se kultura životinjskih stanica uspješno uzgojila, važno je da se kultivacija vrši u odgovarajućem mediju koji stimulira prirodne uvjete. Hranjivi medij za uzgoj mora sadržavati sve hranjive tvari u tekućem ili krutom obliku koji su potrebne stanicama za opstanak i proliferaciju, kao i za obavljanje staničnih funkcija. Ovo uključuje kataboličke supstrate za dobivanje energije, prekursore za anaboličke procese, vitamine i elemente u tragovima, te anorganske ione kako bi medij bio odgovarajućeg pH i osmolarnosti. Zbog navedenog je bitno da se pažljivo odabere odgovarajući medij za pojedinačnu vrstu stanica i koji će najbolje odgovarati ciljevima istraživanja jer će kvaliteta medija izravno utjecati na same rezultate (Yao i Asayama, 2007). Vrste medija koje se koriste mogu se podijeliti na prirodne i sintetske medije. Prirodni mediji sastoje se isključivo od prirodno prisutnih bioloških tvari i to mogu biti ugrušci, biološke tekućine i ekstrakti tkiva. Sintetski mediji osmišljeni su tako da služe jednoj od sljedećih namjena: neposredno preživljavanje (uravnotežena otopina soli, odgovarajući pH i osmotski tlak), produljeno preživljavanje (uravnotežena otopina soli s dodatkom seruma ili odgovarajućom formulacijom organskih spojeva), neograničeni rast te specijalizirane funkcije (Nama i Khare, 2012). Sastoje se od bazalnog medija i dodataka kao što su to serum, hormoni i faktori rasta. Ovisno o dodanim komponentama, mogu se podijeliti na medij sa serumom, medij bez seruma, medij bez proteina i kemijski definiran medij (Yao i Asayama, 2007).

Serum kao dodatak bazalnom mediju bitna je komponenta jer služi kao izvor aminokiselina, vitamina, proteina, lipida, ugljikohidrata, faktora rasta, hormona i brojnih

drugih tvari koje nisu prisutne u bazalnom mediju. Njegove glavne funkcije očituju se kroz stimulaciju staničnog rasta, proliferacije i diferencijacije putem hormonalnih faktora. Isto tako, osigurava stanice transportnim proteinima koji su nosioci hormona, elementa u tragovima i minerala. Također snabdijeva stanice faktorima za pričvršćivanje, kao i faktorima za stabilizaciju i detoksifikaciju za održavanje pH ili inhibiranje proteaza (pomoću npr. α -antitripsina). Visok sadržaj albumina u serumu pogoduje stanicama jer ih štiti od neželjenih promjena u pH vrijednosti, kao i od posmičnih sila koje nastaju uslijed pipetiranja ili miješanja. Serum koji se koristi u ove svrhe najčešće je goveđeg podrijetla i dobiva se iz odraslih ili novorođenih životinja, ili iz fetusa (FBS – *Fetal Bovine Serum*), a u uporabi je još teleći i konjski serum. FBS se usvojio kao standardni suplement hranjivom mediju za uzgoj kultura stanica zbog svojeg visokog sadržaja faktora rasta i niske razine γ -globulina (Brunner i sur., 2010). Međutim, postoje mnogi nedostaci korištenja seruma ovog podrijetla u tehnologiji životinjskih stanica. Serum je loše definiran i varijabilnog sastava što može dovesti do nedosljednosti rasta i produktivnosti procesa. Sastav svake šarže seruma ovisi o prehrani i okolišnim faktorima koji su imali utjecaj na životinju iz koje je serum izuzet. Nadalje, korištenjem seruma javlja se potencijalna opasnost od kontaminacija neželjenim virusima, mikoplazmama ili prionima kao nositeljima transmisivne spongiformne encefalopatije, bolesti poznate još pod nazivom „kravlje ludilo“, za koje postoji mogućnost da budu prisutni u serumu. Isto tako, postoji rizik da bi visok sadržaj proteina u mediju za uzgoj mogao ometati pročišćavanje proizvoda. Naime, serum se najčešće dodaje u koncentraciji od 10 % (v/v) pri čemu koncentracija proteina u mediju doseže ukupnu koncentraciju od 10 g L^{-1} . Ova brojka u velikoj mjeri prevladava uobičajenu izlučenu koncentraciju rekombinantnog proteina u stanicama od $0,1 \text{ g L}^{-1}$, što može rezultirati njegovom otežanom purifikacijom. Cijena seruma još je jedna stavka koja predstavlja problem, kao i njegova dostupnost što remeti kontinuitet proizvodnje. Naposljetku, javljaju se i etička pitanja oko dobrobiti životinja iz kojih se serum izuzima i načina kojim se one tretirane tijekom tog postupka (Butler, 2015).

Ovisno o tipu stanica i njihovom podrijetlu te o samoj svrsi uzgoja stanica, bazalni medij dizajniran je sukladno potrebama stanične linije. Sastav bazalnog medija stoga ovisi i o činjenici je li on dizajniran na način da je predviđen dodatak komponenata kao što je to serum koji sadržava dodatne nutrijente koji nisu prisutni u samom bazalnom mediju. Kroz povijest razvijeni su različiti bazalni mediji. Prvi od prihvaćenih medija bio je *Eagle's basal medium* (BME) koji je morao biti zamijenjen novim svaki dan uzgoja. Poboljšana varijanta razvijena je

nekoliko godina kasnije kada je *Eagle's minimum essential medium* (EMEM) s višom koncentracijom aminokiselina nego BME bio predstavljen. *Dulbecco's modification of Eagle's medium* (DMEM), koji je razvijen ubrzo zatim, sadržavao je četiri puta veću koncentraciju aminokiselina nego BME uz dodatak vitamina, ne-esencijalnih aminokiselina i elementa u tragovima te 25 mM koncentraciju glukoze, a nakon toga predstavljen je i RPMI 1640 koji je poznat kao medij za opću namjenu, kao i za kulture limfocita i hibridoma (Butler, 2015). Navedeni bazalni mediji zahtijevaju dodatak seruma kao suplementa kako bi se postignuo maksimalan rast stanica. Međutim, zbog brojnih nedostataka koje dodatak seruma ima, znanstvenici su radili na stvaranju *serum-free* medija (SFM). Pritom je glavni cilj bio zamijeniti suplemente u serumu nekim novim izvorima. Optimizacija bazalnog medija bila je jedan od prvih koraka gdje je, na primjer, bila pripravljena smjesa DMEM i RPMI 1640 medija u omjeru 1:1, pri čemu je DMEM bio izvor aminokiselina i vitamina, a RPMI 1640 je osiguravao mikronutrijente potrebne za rast (Butler, 2015). Sljedeće moguće rješenje bila je upotreba kemijski definiranih medija (CDM – *Chemically Defined Media*) koji ne bi zahtijevali dodatak suplemenata za zamjenu seruma. Ovakvi mediji imali su uspješnu primjenu, međutim vrijeme razvoja i optimizacije bilo je dugo i skupo, te je u nekim slučajevima dolazilo do smanjenja prinosa što je dovodilo do upitnosti održivosti kulture. Unatoč prednostima koje su CDM i SFM nudili, neke industrijski važne stanične linije još su uvijek zahtijevale komponente seruma koje ovakvi mediji i dalje nisu mogli nadomjestiti kao što su to na primjer bili čimbenici pričvršćivanja (Babcock, 2007).

Kao zamjena za serum počeli su se koristiti ekstrakti tkiva, razni hidrolizati, faktori rasta, hormoni, transportni proteini kao albumin i transferin, lipidi, poliamini, vitamini, metali i drugi. Najprije su u uporabi bili proteinski hidrolizati životinjskog podrijetla izolirani iz animalnih tkiva ili mlijeka koji su proizvedeni pomoću enzima životinja ili pročišćenih proteina iz životinjskih ili ljudskih izvora. Međutim, i dalje je postojao rizik od kontaminacije virusima jer se radilo o hidrolizatima koji potječu iz životinja. Kako bi se pronašla alternativa animalnim proteinima, počela su istraživanja s proteinskim hidrolizama biljnog podrijetla, kao što su to soja, pšenica i sjemenke pamuka, koja su se pokazala uspješnim kao zamjena serumu i u optimizaciji medija. Biljni proteinski hidrolizati osiguravaju stanice vitaminima, lipidima, anorganskim soli, peptidima niske molekulske mase i aminokiselina te su se time pokazali pogodnim za uzgoj većine staničnih linija kao što su to BHK, CHO, Vero, MDCK i hibridoma. Pošto navedeni hidrolizati sadrže tvari niske molekule mase, purifikacija antitijela i

rekombinantnih proteina je pojednostavljena, a prednost je naravno i njihova cijena u usporedbi sa serumom (Babcock, 2007; Yao i Asayama, 2007). U istraživanju koje su proveli Farges-Haddani i sur. (2006) korištena je smjesa peptida dobivena frakcioniranjem enzimskog hidrolizata proteina sjemena uljane repice koja se pokazala dobrom alternativom. Dobivene frakcije peptida imale su različite učinke na rast kada se dodaju u medij bez seruma. Pokazalo se da nefrakcionirani hidrolizati i pojedine frakcije nisu imale utjecaj na brzinu rasta stanica, dok su s druge strane određene frakcije djeluju ili citotoksično ili stimulirajuće na rast stanica. Za razliku od većine komercijalno dostupnih biljnih peptona koji su sastavljeni isključivo od malih peptida, jedna od frakcija u ovom eksperimentu sadržavala je smjesu i malih (<500 Da) i velikih peptida (500-5000 Da) te je pokazala značajnu stimulaciju rasta stanica i produljenje vremena trajanja kulture u dodanoj koncentraciji od 4 g L⁻¹.

Nije poznato potječe li sva korisna aktivnost hidrolizata iz malih peptidnih frakcija ili i veći proteini također imaju pozitivan učinak. Mali peptidi, a ujedno i slobodne aminokiseline, doprinose nutritivnoj vrijednosti medija, dok veliki peptidi mogu oponašati čimbenike rasta ili faktore preživljavanja (Franek i sur., 2000). U svojim su eksperimentima Lee i sur. (2008) dokazali kako je dodatak proteinskog hidrolizata soje imao pozitivan učinak na proliferaciju ljudskih keratinocita u mediju bez seruma. Medij koji je pokazao najveći broj živih stanica sadržavao je BPE (ekstrakt govede hipofize) i proteinske hidrolizate soje, nakon njega po broju stanica slijedio je medij samo s dodatkom BPE, zatim samo s dodatkom hidrolizata soje te je posljednji po broju stanica bio medij bez ikakvih dodataka. Iako su sojini proteini bili dobar izvor nutrijentata i potpomognuli su rast stanica, nisu u potpunosti uspjeli zamijeniti BPE.

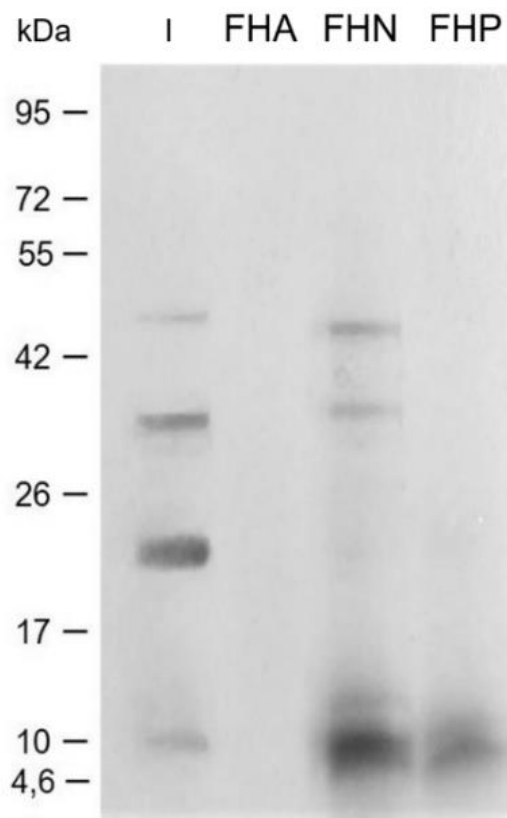
2.3. Proteini i proteinski hidrolizati uljne pogače lana

Lan, ili poznata po svojim latinskim imenom *Linum usitatissimum*, je biljka koja je bila uzgajana od početka civilizacije. U početku se lan prvenstveno koristio za proizvodnju vlakna za odjeću i u proizvodnji papira, dok su se ulje sjemenki lana i ostali nusprodukti koristili kao sastavni dio hrane za životinje. Tek su pred više od dva desetljeća nutritivna svojstva sjemenki lana došla do izražaja te je započela njihova primjena u prehrani ljudi. Lan sadrži mnoge bioaktivne spojeve koje ga stavljaju kao predmet brojnih istraživanja zbog njegovih

potencijalnih zdravstvenih dobrobiti. Sjemenke lana dobar su izvor omega-3-masnih kiselina kao što su to α -linolenska kiselina, zatim polinezasićenih masnih kiselina kratkog lanca, topljivih i netopljivih vlakna, fitoetrogenih lignana, proteina i antioksidansa. Pozitivan su učinak pokazale u smanjenju kardiovaskularnih bolesti, protuupalnom efektu, smanjenom riziku od raka te ublažavanju simptoma menopauze i osteoporoze (Goyal, 2014).

Glavna komponenta sjemenke lana upravo je laneno ulje koje je bogato α -linolenskom, linolnom i oleinskom kiselinom. Tijekom proizvodnje ulja iz sjemenki lana prešanjem nastaje velika količina nusprodukta te ovaj ostatak koji zaostaje nazivamo pogača lana. Navedeni nusprodukt u većini je slučajeva otpad prehrambene industrije, unatoč činjenici da je bogat proteinima i nutritivnim tvarima. Pogača lana zbog prisutnih lipida, proteina, topljivih vlakna i lignana te ostalih iskoristivih sastojaka svoju potencijalnu primjenu ima u ljudskoj prehrani, kao aditiv u pekarstvu, stočna hrana, a u posljednje vrijeme u biotehnološkim procesima. U istraživanju Gutierrez i sur. (2010) frakcioniranjem odmašćene uljne pogače lana dobiven je ekstrakt polifenola od 0,73 mg GAE g⁻¹, kao i proteinski izolat značajne čistoće s 53,15 % prinosa i 0,78 ekvivalenta albumina g⁻¹ proteinskog izolata te polisaharidni izolat s prinosom 10,71 % i 1,37 mg ekvivalenta glukoze po gramu polisaharida i s niskom udjelom proteina kao nečistoća, što dokazuje prisutnost nutritivno vrijednih tvari koje su zaostale nakon ekstrakcije ulja. Također, sadrži i različite tipove antioksidansa, vitamine A, C, D i E te minerale kao što su to Mg, K, Na, Fe, Cu, Mn i Zn (Gutiérrez i sur., 2010; Mannucci i sur., 2019).

Proteinski hidrolizati lana su mješavina peptida raznih veličina nastalih razgradnjom proteina izoliranih iz uljne pogače. Mogu se dobiti postupkom kiselinske hidrolize ili primjenom enzima proteaza. Postupak s enzimima je složeniji, ali i osjetljiviji te ovisno o primjenjenoj proteazi, mogu nastati hidrolizati različitog peptidnog sastava. U radovima Logarušić i sur (2021.) te Logarušić i sur (2020.) opisane su digestije proteinskih izolata lana primjenom mikrobnih proteaza *Alcalase*, *Neutralse* i *Protamex*. Na [slici 3](#), koja prikazuje gel nastao proteinskom elektroforezom hidrolizata, vidi se da je razgradnja proteina lana najtemeljitija primjenom enzima *Alcalase* (*FHA*) jer gotovo da nema vidljivih bendova iznad 5 kDa. Drugačiji uzorak digestije pokazuju enzimi *Neutralse* (*FHN*) i *Protamex* (*FHP*) koji su proizveli hidrolizate znatno većih peptida od *Alcalase*, no većina ih je ispod 10 kDa.



Slika 3. Slika gela SDS-PAGE proteinskog izolata uljne pogače lana (I) i tri hidrolizata proteina lana (FHA, FHN i FHP) dobivenih digestijom trima proteazama (Logarušić i sur., 2021).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Hidrolizati uljne pogače lana

U provedenim eksperimentima tijekom izrade ovog završnog rada korišteni su proteinski hidrolizati uljnih pogača lana pripremljeni u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacija Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu ([tablica 1](#)). Navedeni su hidrolizati dobiveni hidrolitičkim cijepanjem pomoću triju različitih proteolitičkih enzima: *Alcalase*TM, *Neutrase*TM i *Protamex*TM. Čuvani su na temperaturi od -80 °C do trenutka njihove primjene u određenim eksperimentima.

Tablica 1. Prikaz korištenih hidrolizata lana i njihovih koncentracija dobivenih hidrolizom proteolitičkim enzimima *Alcalase*TM (A), *Neutrase*TM (N) i *Protamex*TM (P)

| Uzorak | Opis uzorka | Kratica uzorka |
|----------|---|----------------------------|
| Uzorak 1 | Ukupni hidrolizat lana pripremljen pomoću enzima Alkalaza u koncentraciji od 69,0 g L ⁻¹ | HLA 69,0 g L ⁻¹ |
| Uzorak 2 | Ukupni hidrolizat lana pripremljen pomoću enzima Neutraza u koncentraciji od 65,5 g L ⁻¹ | HLN 65,5 g L ⁻¹ |
| Uzorak 3 | Ukupni hidrolizat lana pripremljen pomoću enzima Protamex u koncentraciji od 67 g L ⁻¹ | HLP 67,0 g L ⁻¹ |

3.1.2. Kemikalije

- *Fetal Bovine Serum Advanced Heat Inactivated* (FBS), Capricorn Scientific, Njemačka
- Tripsin-EDTA, Gibco, SAD
- Antibiotik/antimikotik, Capricorn Scientific, Njemačka
- *DMEM High Glucose with Stable Glutamine with Sodium Pyruvate*, Capricorn Scientific, Njemačka
- Tripan plavo boja 0,4 %, Gibco, SAD
- *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (PBS), Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- Etanol 96 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska

3.1.3. Otopine

Reagensi za određivanje glukoze

| | |
|-------------------|---|
| Reagens 1: | pufer pH 7,4 p-hidroksibenzojeva kiselina i natrijev azid 0,095 % w/v |
| Reagens 2: | glukoza oksidaza peroksidaza 4-aminoantipirin |
| Standard glukoze: | D-glukoza standardna otopina 1,0 mg mL ⁻¹ (5,55 mmol L ⁻¹) benzojeva kiselina 0,2 % w/v |

Reagensi za određivanje laktata

| | |
|------------|---|
| Reagens 1: | pufer pH 10,0 D-glutamat natrijev azid 0,02 % w/v |
|------------|---|

| | |
|------------|---|
| Reagens 2: | NAD ⁺ /PVP |
| Reagens 3: | D-glutamat-piruvat transaminaza |
| Reagens 4: | L-laktat dehidrogenaza |
| Reagens 5: | standard laktične kiseline 0,15 mg mL ⁻¹ natrijev azid 0,02 % w/v |

3.1.4. Uređaji i oprema

- komora za sterilni rad (laminar flow cabinet), Kambič, Slovenija
- inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Memmert, Njemačka
- ploča s 24 jažice za uzgoj stanica, TPP, Švicarska
- laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, Eppendorf epruvete, Falcon epruvete, kivete, stalak za epruvete)
- Neubaerova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright – Line, Njemačka
- svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- spektrofotometar Thermo Scientific Genesys 10 S UV/Vis, Thermo Scientific, SAD
- hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- hladnjak (-80 °C), TT 80 FRYKA, Njemačka

3.1.5. Stanična linija HEK 293

U eksperimentu je korištena neproduktivna adherentna HEK 293 stanična linija izolirana iz bubrega humanog embrija. Ova stanična linija čuvana je u banci stanica na -80 °C u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacija Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj HEK 293 stanica u Petrijevoj zdjelici

Uzgoj stanica započinje odmrzavanjem HEK 293 stanične kulture koje su do početka eksperimenta bile zamrznute na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Stanice su u banci stanica bile pohranjene u ampulama od 1 mL. Njihovo odmrzavanje započinje uranjenjem u vodenu kupelj temperiranu na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon toga se odmrznute stanice inokuliraju u koncentraciji od 5×10^4 st mL^{-1} u DMEM medij s dodatkom FBS-a i antibiotika u Petrijevoj zdjelici te se uzgajaju u inkubatoru s kontroliranom atmosferom s 5% CO_2 i pri temperaturi od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon što su postigle konfluentnost odnosno popunjenost površine između 80 i 90% , stanice su precijepljene. Napravljene su dvije pasaže stanica nakon čega su korištene u daljnjim eksperimentima.

3.2.2. Uzgoj HEK 293 stanica u mediju s dodatkom proteinskog hidroliza lana

Stanice su prethodno uzgajane u Petrijevoj zdjelici do konfluentnosti između 80 i 90% postupkom koji je ranije opisan. Pripremljeno je 6 različitih uvjeta u koje su, uz serum i antibiotik, dodane različite koncentracije proteinskih hidrolizata lana te dvije kontrole koje su sadržavale serum bez dodatka hidrolizata, kako je to i prikazano u [tablici 2](#). Pripremljeni uvjeti su naciepljeni u koncentraciji stanica od $2,5 \times 10^4$ st mL^{-1} u ploče s 24 jažice radnog volumena $500\text{ }\mu\text{L}$. Stanice su uzgajane u inkubatoru, uz uvjete temperature $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, atmosferskog tlaka i atmosferskog zraka (95% zraka i 5% CO_2).

Tablica 2. Prikaz pojedinih uvjeta čiji se učinak na rast stanica ispitivao

| Uvjeti | Opis uvjeta | Kratica |
|------------|---|---------------------------|
| Uvjet 1 | 2,5 g L ⁻¹ FBS-a + 2,5 g L ⁻¹ hidrolizata lana pocijepanog enzimom Alkalaza | S 2,5 + HLA 2,5 |
| Uvjet 2 | 2,5 g L ⁻¹ FBS-a + 0,5 g L ⁻¹ hidrolizata lana pocijepanog enzimom Alkalaza | S 2,5 + HLA 0,5 |
| Uvjet 3 | 2,5 g L ⁻¹ FBS-a + 2,5 g L ⁻¹ hidrolizata lana pocijepanog enzimom Neutraza | S 2,5 + HLN 2,5 |
| Uvjet 4 | 2,5 g L ⁻¹ FBS-a + 0,5 g L ⁻¹ hidrolizata lana pocijepanog enzimom Neutraza | S 2,5 + HLN 0,5 |
| Uvjet 5 | 2,5 g L ⁻¹ FBS-a + 2,5 g L ⁻¹ hidrolizata lana pocijepanog enzimom Protamex | S 2,5 + HLP 2,5 |
| Uvjet 6 | 2,5 g L ⁻¹ FBS-a + 0,5 g L ⁻¹ hidrolizata lana pocijepanog enzimom Protamex | S 2,5 + HLP 0,5 |
| Kontrola 1 | 2,5 g L ⁻¹ FBS-a | FBS 2,5 g L ⁻¹ |
| Kontrola 2 | 5,0 g L ⁻¹ FBS-a | FBS 5,0 g L ⁻¹ |

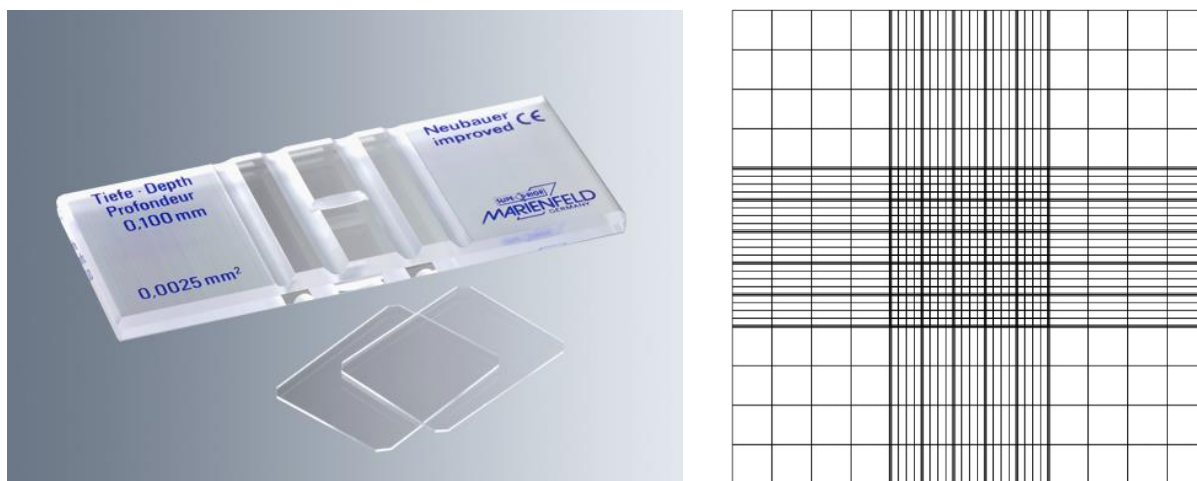
Na određene dane (2., 4., 6., 7., 8., 9., 10. i 11. dan) praćen je rast stanica pomoću metode brojanja stanica tripan-plavo. Stanice su uzgajane do opadanja broja i vijabilnosti stanica. Prije same pripreme za brojanje, stanice su pogledane pod svjetlosnim mikroskopom kako bi se izvršila provjera morfologije i rasta samih stanica. Također je provjereno da li je došlo do pojave kontaminacije kulture što bi rezultiralo naglom promjenom boje medija iz ružičasto-

crvene u žućkastu. Nakon što se ustanovilo da stanična kultura uspješno raste bez kontaminacija, slijedio je postupak u laminaru u aseptičnim uvjetima rada. Najprije se sterilnom pipetom uklonilo 500 μL medija nakon čega je slijedilo dodavanje 100 μL PBS-a. PBS se također uklonio te se zatim dodalo 100 μL tripsina. Stanice su nakon toga stavljene u inkubator na inkubaciju pri 37 °C 10 do 15 minuta kako bi se izvršilo odvajanje stanica od podloge. Provjera uspješnosti tripsinizacije vrši se gledanjem stanica pod svjetlosnim mikroskop gdje se trebaju uočiti vidljivo okrugle stanice, što je znak da je tripsin uspješno pocijepao veze kojima se stanice drže za podlogu. Nakon toga u jažice je dodan medij s 5 % FBS-a te su stanice resuspendirane. Uzorak je nakon toga bio izuzet za brojanje u Eppendorf kivetu. Kada su stanice bile na vrhu eksponencijalne faze rasta (10. ili 11. dan uzgoja), medij koji se uklanjao nije bio bačen, već je bio sačuvan za potrebe daljnje analize – određivanje koncentracije glukoze i proizvedenog laktata.

3.2.3. Određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*

Metoda *Trypan Blue* služi za brojanje stanica tj. određivanja koncentracije i vijabilnosti stanica u uzorku. Princip metode tripan-plavo temelji se na tome da zbog oštećene stanične membrane mrtvih stanica, boja prodire u stanice i oboji ih plavo, dok u žive stanice boja ne može ući te one ostaju neobojene odnosno bijele boje što ih čini lako uočljivima pod svjetlosnim mikroskopom. Iz uzorka koji je pripremljen za brojanje izuzme se 10 μL i pomiješa sa 10 μL tripan-plavo boje te resuspendira. Zatim se alikvot od 10 μL stavlja na Neubauerovu komoricu ([slika 4](#)). Ona se sastoji od 4 velika kvadrata čije krajeve označuje trostruka linija, a unutar svakog velikog kvadrata je 16 malih. Stanice se broje u sva 4 velika kvadrata te se dobiveni broj uvrsti u sljedeću formulu kako bi se dobio broj stanica po mL orginalne suspenzije:

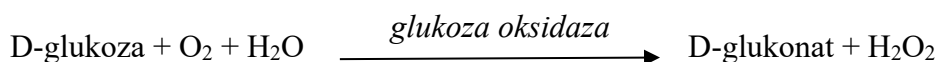
$$\text{broj stanica mL}^{-1} = (\text{broj stanica u 4 kvadrata}) \times \text{faktor razrjeđenja} \times 5000 \quad [1]$$



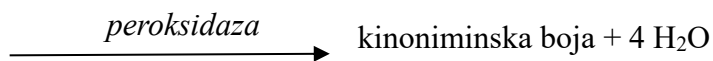
Slika 4. Neubauerova komorica za brojanje stanica (lijevo) (Anonymous 3, 2022) i mreža kvadrata vidljiva pod svjetlosnim mikroskopom (desno) (Anonymous 4, 2022)

3.2.4. Određivanje koncentracije glukoze u hranjivom mediju

Koncentracija glukoze određivana je pomoću The Megazyme D-Glucose (GOPOD) seta koji se bazira na prevođenju glukoze u obojeni produkt pomoću enzima glukoza oksidaze i peroksidaze. Specifične reakcije koje kataliziraju ovi enzimi su sljedeće:



$2 \text{H}_2\text{O}_2 + \text{p-hidroksibenzojeva kiselina} + 4\text{-aminoantipirin}$

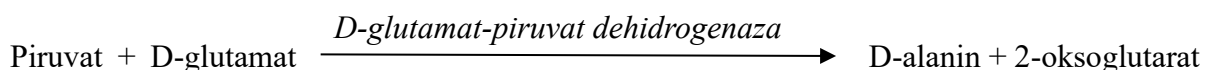
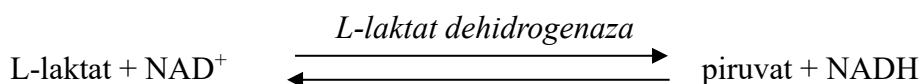


Spektrofotometrijskim mjerenjem pri 510 nm mjeri se apsorbancija koja je proporcionalna intenzitetu obojenja odnosno koncentraciji glukoze u mediju. U kivetu se doda 1000 μL GOPOD reagensa i pomiješa se sa 33 μL uzorka čiju koncentraciju želimo odrediti te se inkubira 20 minuta na temperaturi 37°C. Za slijepu probu umjesto uzorka dodan je odgovarajući volumen destilirane vode, dok je za standard korištena standardna otopina glukoze koncentracije 5,55 mmol L^{-1} . Nakon inkubacije, izmjerena je apsorbancija na spektrofotometru te je koncentracija glukoze u uzorku izračunata prema sljedećoj formuli:

$$\text{koncentracija glukoze (mM)} = \frac{A_{510 \text{ nm}}(\text{uzorak})}{A_{510 \text{ nm}}(\text{standard})} \times 5,55 \text{ mM} \quad [2]$$

3.2.5. Određivanje koncentracije laktata u hranjivom mediju

Koncentracija proizvedenog laktata, koji nastaje kao produkt metabolizma stanica, mjerena je pomoću Megazyme L-Lactic acid seta. Načelo prema kojem funkcionira kvantifikacija laktata jesu dvije enzimске reakcije koje kataliziraju L-laktat dehidrogenaza (L-LDH) i D-glutamat-piruvat dehidrogenaza (D-GPD). Laktat u prvoj reakciji reagira s NAD^+ te se prevodi u piruvat i NADH. Kako se radi o povratnoj reakciji koja se može odvijati u oba smjera, nužno je provesti sljedeću enzimsku reakciju koja će „odvoditi“ piruvat dalje u D-alanin i 2-oksoglutarat. Ova se reakcija može provoditi samo u jednom smjeru čime postizemo stalno odvođenje nastalog piruvata i održavanje količine nastalog NADH konstantnom bez ponovnog nastanka laktata. NADH je u jednakom stehiometrijskom odnosu kao i laktat te je to komponenta čiju apsorbanciju nastojimo izmjeriti pri 340 nm.



Uzorak za mjerenje pripremljen je na način je u kivete za mjerenje otpipetirano 375 μL destilirane vode te 25 μL uzorka odnosno 400 μL vode za slijepu probu. U to je dodano 125 μL pufera, zatim 25 μL otopine NAD^+ /PVP te 5 μL suspenzije D-glutamat-piruvat dehidrogenaze. Nakon 3 minute izmjerena je apsorbancija A_1 na 340 nm. Dodatkom 5 μL suspenzije L-laktat dehidrogenaze započeta je reakcija nastanka piruvata iz laktata te je nakon 10 minuta izmjerena apsorbancija A_2 . Koncentracija proizvedenog laktata izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$\text{koncentracija laktata (mmol/L)} = 0,3204 \times (A_{2_{340 \text{ nm}}} - A_{1_{340 \text{ nm}}}) \times 11,1 \quad [3]$$

3.2.6. Izračunavanje parametara rasta HEK 293 stanica

Specifična brzina rasta stanica

Specifična brzina rasta stanica μ određuje se prema sljedećoj formuli:

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad [4]$$

gdje je:

x – masa stanica

dx - promjena mase stanica

dt – odabrani vremenski interval u kojem se prati promjena mase

Integracijom gore navedene jednadžbe dobiven je izraz za jednadžbu pravca za koju vrijedi:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu(t - t_0) \quad [5]$$

a kako je masa proporcionalna broju stanica, izraz za specifičnu brzinu rasta poprima sljedeći oblik:

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{\Delta t} \quad [6]$$

gdje je:

N – broj stanica u 1 mL na kraju odabranog vremenskog intervala

N_0 – broj stanica u 1 mL na početku odabranog vremenskog intervala

Δt – vremenski interval u kojem je praćena promjena broja stanica (h)

Specifična brzina potrošnje/nastajanja metabolita

Specifična brzina potrošnje glukoze određena je prema sljedećoj formuli:

$$Q = \frac{\frac{c-c_0}{N-N_0}}{\Delta t} \quad [7]$$

gdje je:

c – koncentracija metabolita u mediju na kraju odabranog vremenskog intervala

c_0 - koncentracija metabolita u mediju na početku odabranog vremenskog intervala

N – broj stanica u 1 mL na kraju odabranog vremenskog intervala

N_0 – broj stanica u 1 mL na početku odabranog vremenskog intervala

Δt – vremenski interval u kojem je praćena promjena koncentracije metabolita (h)

3.2.7. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (\bar{x}) određenog broja uzoraka (n):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [8]$$

s pripadajućim standardnim devijacijama (σ):

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad [9]$$

gdje je x_i pojedinačna vrijednost uzorka.

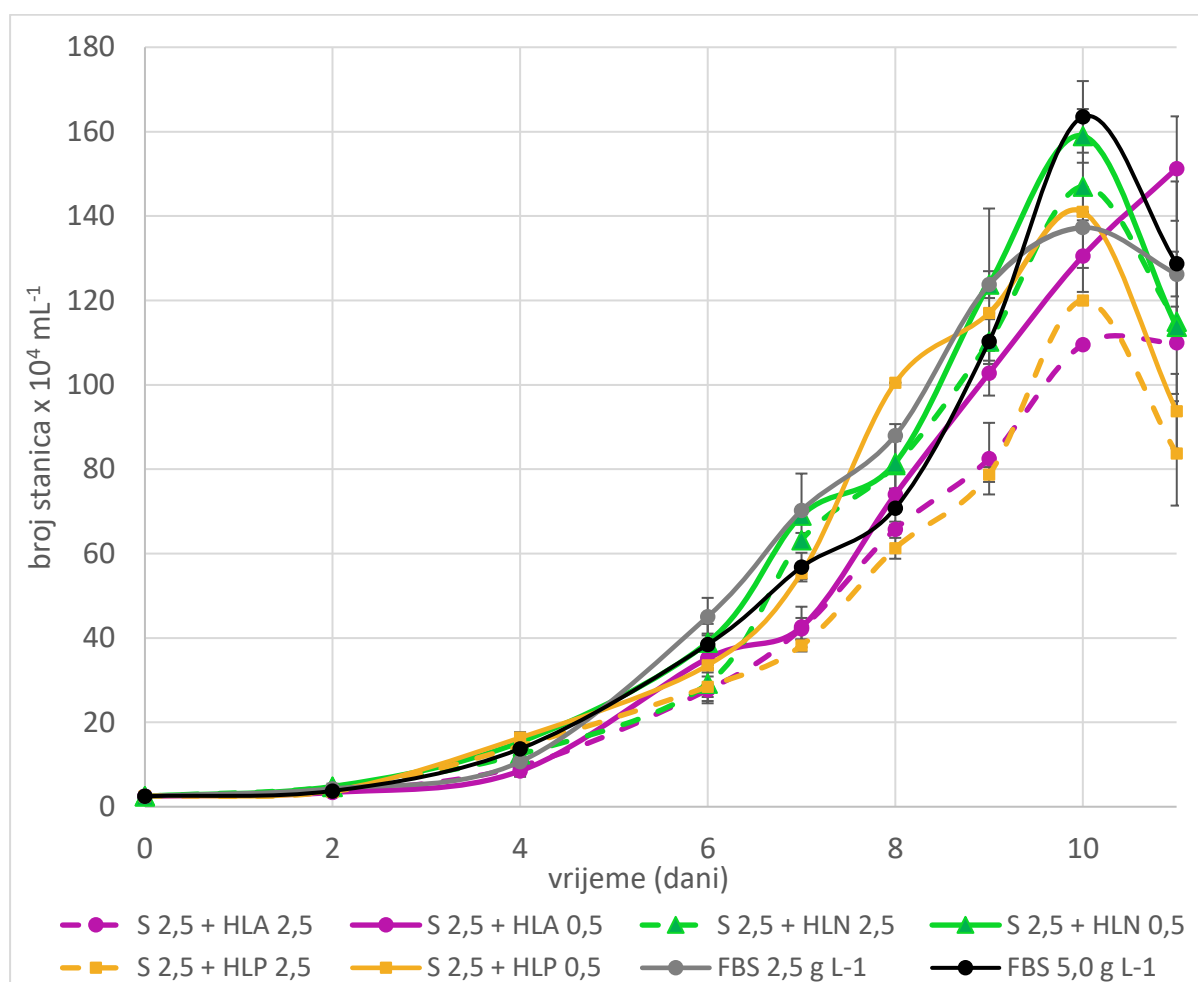
4. REZULTATI I RASPRAVA

U posljednje se vrijeme sve više pažnje pridaje iskorištavanju nusprodukata prehrambene industrije koji u većini slučajeva završavaju kao otpad. Naime, ovi su ostaci dobar izvor proteina i brojnih drugih nutritivnih tvari te još uvijek mogu naći svoju primjenu i način kako se dodatno iskoristiti. Kao jednim od ovih nusproizvoda smatraju se i uljne pogače zaostale nakon ekstrakcije ulja iz sjemenki biljaka. Zbog dokazanih učinaka proteinskih hidrolizata iz biljaka u kulturama životinjskih stanica kao nadomjestak seruma životinjskog podrijetla, uljne pogače postale su predmet brojnih istraživanja.

U ovom završnom radu cilj je bio ispitati utjecaj proteinskih hidrolizata uljne pogače lana na rast HEK 293 stanične linije te mogućnost zamjene dijela seruma hidrolizatima. Dokazano je da utjecaj hidrolizata na rast stanica ovisi i o enzimima koji su korišteni u svrhu njihovog nastanka te da nemaju svi enzimi jednak učinak. Naime, cijepanjem različitim enzimima nastaju peptidi različitih veličina, a već provedena istraživanja pokazala kako ovaj faktor ima značajan utjecaj na ishod eksperimenta (Farges-Haddani i sur., 2006). U ovom su eksperimentu stoga korištene tri proteaze: *Alcalase*, *Neutrase* i *Protamex* čiji se učinak ispitivao. Također, ispitan je i utjecaj ovih hidrolizata na stanični metabolizam, odnosno potrošnju glukoze i proizvodnju laktata.

4.1. Učinak dodatka proteinskih hidrolizata lana na rast i metabolizam HEK 293 stanica

Ispitivan je učinak hidrolizata proteina uljne pogače lana pocijepanog trima različitim mikrobnim proteazama. Hidrolizati su u različitim koncentracijama dodani u hranjivi medij koji je sadržavao serum u koncentraciji od $2,5 \text{ g L}^{-1}$ proteina. Uzgoj je trajao do opadanja broja i vijabilnosti stanica, tj. oko 11 dana. Za usporedbu, praćen je rast stanica u dva kontrolna uvjeta, tj. u mediju koji je sadržavao uobičajene koncentracije proteina seruma od $2,5 \text{ g L}^{-1}$ i $5,0 \text{ g L}^{-1}$, bez dodatka hidrolizata. Na određene dane (2., 4., 6., 7., 8., 9., 10. i 11. dan) obavljano je brojanje stanica te je na taj način praćen njihov rast tijekom uzgoja. Na [slici 5.](#) prikazana je krivulja rasta koja pokazuje promjenu broja stanica po mL u ovisnosti o vremenu za pojedine uvjete.



Slika 5. Rast HEK 293 stanica tijekom uzgoja u mediju sa serumom (S 2,5) jednim od tri proteinskih hidrolizata lana (HLA, HLN, HLP) pri koncentraciji 0,5 i $2,5 \text{ g L}^{-1}$. Kontrolni uzorci uzgajani su u mediju samo s dodanim serumom (FBS $2,5$ i $5,0 \text{ g L}^{-1}$).

Iz krivulje rasta stanica možemo iščitati sljedeće rezultate. Najbolji rast pokazale su stanice koje su rasle samo uz dodatak seruma koji je sadržavao proteine u koncentraciji od 5,0 g L⁻¹. Druga kontrola, koja je sadržavala serum s koncentracijom proteina 2,5 g L⁻¹, pokazivala je manji broj poraslih stanica u tim uvjetima. Iz toga je vidljivo da će veći udio seruma u mediju posljedično rezultirati boljim rastom stanične kulture.

Nakon kontrole, drugi po redu najbolji rast pokazale su stanice koje su uzgajane u hranjivom mediju s dodatkom proteinskog hidrolizata pocijepanog enzimom *Neutrased* u koncentraciji od 0,5 g L⁻¹ i seruma s koncentracijom proteina 2,5 g L⁻¹, a odmah nakon njih stanice s dodatkom 2,5 g L⁻¹ hidrolizata i istom koncentracijom seruma. Bolji je efekt na rast dakle zapažen pri manjoj koncentraciji proteinskog hidrolizata. U usporedbi sa kontrolom koja je sadržavala serum u koncentraciji od 2,5 g L⁻¹, dakle jednakoj kao i uvjeti u koje smo dodavali hidrolizate, možemo zaključiti da dodatak proteinskog hidrolizata pocijepanog enzimom *Neutrased* u medij sa serumom pokazuje bolji učinak na rast stanica nego to pokazuje samo serum pri istoj toj koncentraciji, ali bez hidrolizata. Lee i sur. (2008) su u svojim istraživanjima postigli isti učinak gdje su stanice bolje rasle u mediju koji je sadržavao BPE (*Bovine Pituitary extract*) i sojine hidrolizate, nego medij samo sa BPE.

Proteinski hidrolizati pocijepani enzimom *Protamex* pokazivali su lošiji efekt nego je to imao enzim *Neutrased*. Unatoč tome, zapažen je veći rast stanica kada je hidrolizat dodan u manjoj koncentraciji, dakle 0,5 g L⁻¹ hidrolizata u medij sa 2,5 g L⁻¹ seruma, u odnosu na kontrolu gdje je samo serum. Hidrolizat dodan u većoj koncentraciji gdje je koncentracija iznosila 2,5 g L⁻¹ pokazao je značajno lošiji rast stanica u usporedbi s kontrolom.

Rast stanica u uzorcima u koje su dodani proteinski hidrolizati nastali djelovanjem enzima *Alcalase* bio je najlošiji od svih hidrolizata. U usporedbi s kontrolom, u kojoj je koncentracija proteina iz seruma bila 2,5 g L⁻¹, hidrolizati su u objema koncentracijama pokazali lošiji efekt, s tim da je rast stanica bio manji u uzorku s većom koncentracijom hidrolizata. Iz ovog možemo zaključiti da su proteinski hidrolizati nastali cijepanjem enzimom *Alcalase* imali inhibitorno djelovanje na rast stanica, odnosno da peptidi nastali ovim cijepanjem nisu bili odgovarajućih proporcija kako bi stimulirali rast, već se javio suprotni učinak.

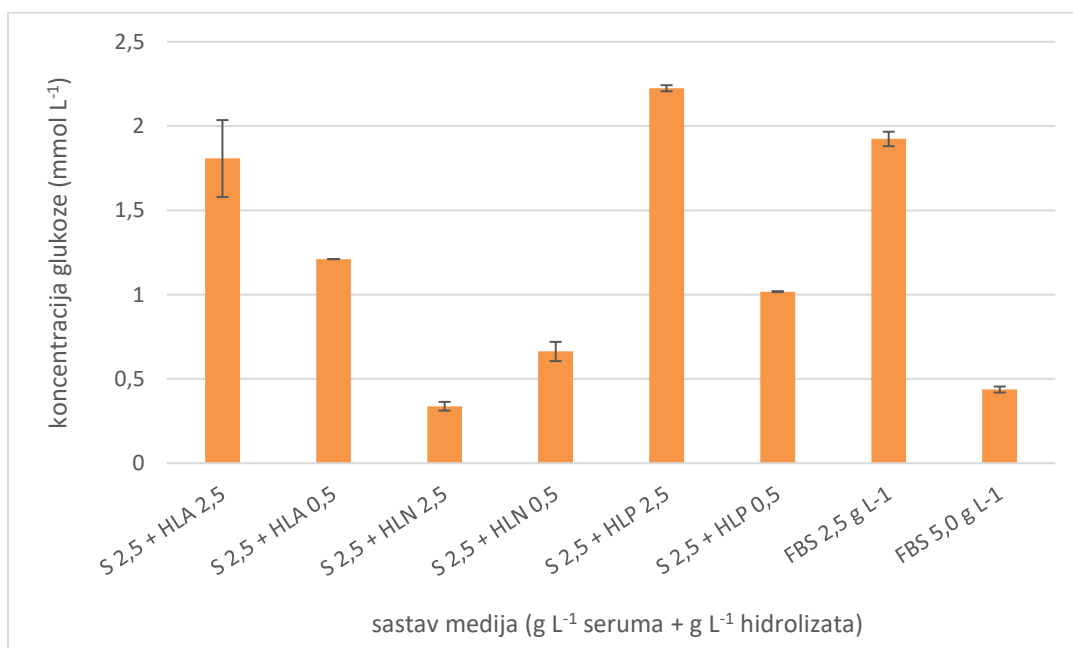
Kada pogledamo sve tri vrste hidrolizata zajedno, vidimo da je najbolji stimulirajući efekt imao hidrolizat nastao enzimom *Neutrased* kod kojeg je u oba slučaja postignut bolji rast stanične kulture u usporedbi s kontrolom, zatim *Protamex*, kod kojeg je zabilježen i pozitivan i negativan učinak, te posljednji *Alcalase* koji nije uopće imao doprinos na rast stanica, već ga

je inhibirao. U sva tri hidrolizata, bolji rast je postignut kada smo hidrolizat dodali u manjoj koncentraciji od $0,5 \text{ g L}^{-1}$. To nas navodi na zaključak da je koncentracija hidrolizata od $2,5 \text{ g L}^{-1}$ bila prevelika te iako je u pojedinim slučajevima kao kod enzima *Neutrase* postignut bolji rast u odnosu na kontrolu, veći je efekt zabilježen na rast stanica kod manje koncentracije hidrolizata.

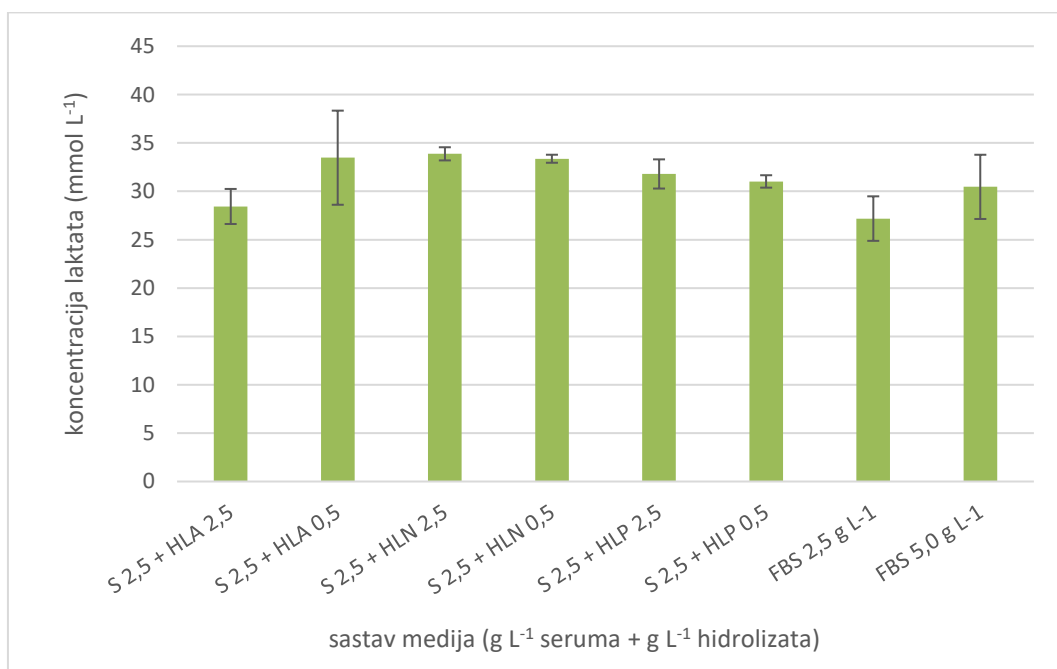
Uzimajući u obzir stupanj hidrolize i sastav hidrolizata (Logarušić i sur., 2021) vidljivo je da hidrolizat nastao enzimom *Alcalase* sadrži relativno najviše niskomolekularnih peptida ([slika 3](#)), a relativno najlošije djeluje na rast stanica ([slika 5](#)). To navodi na zaključak da, pored koncentracije peptida, na inhibiciju rasta stanica djeluje i sastav hidrolizata u kojima dominiraju peptidi $< 5 \text{ kDa}$.

Slično su u svojim eksperimentima dokazali Farges-Haddani i sur. (2006) gdje su koncentracije proteinskih hidrolizata uljane repine u koncentraciji većoj od 4 g L^{-1} imale inhibitorni učinak, dok se stimulacija rasta stanica postigla pri nižim koncentracijama. Iako hidrolizati uljne pogače lana sadrže tvari koje će potaknuti rast stanica, u njima su također prisutne komponentne čiji inhibitorni učinak dolazi do izražaja pri njihovim povećanim koncentracijama. Isto tako, i sami hidrolizati mogu pri povišenim koncentracijama peptida i aminokiselina u njihovom sastavu djelovati kao inhibitori uslijed poremećaja u ravnoteži nutritivnih sastojaka unutar hranjivog medija (Chun i sur., 2007).

a)



b)



Slika 6. Koncentracija glukoze (a) i nastalog laktata (b) u mediju na kraju uzgoja stanica.

Tablica 3. Vrijednosti specifične brzine rasta stanica te specifične brzine potrošnje glukoze i specifične brzine proizvodnje laktata stanica uzgajanih u mediju s različitim koncentracijama proteinskog hidrolizata lana (HLA, HLN, HLP) i u kontrolnim uzorcima (FBS)

| Uvjeti | Specifična brzina rasta μ (h^{-1}) | Specifična brzina potrošnje glukoze ($\text{mmol stanica}^{-1} \text{ dan}^{-1}$) | Specifična brzina nastajanja laktata ($\text{mmol stanica}^{-1} \text{ dan}^{-1}$) |
|---------------------------|---|---|--|
| S 2,5 + HLA 2,5 | 0,0179 | 2,0197E-09 | 2,5596E-09 |
| S 2,5 + HLA 0,5 | 0,0190 | 1,7349E-09 | 2,5335E-09 |
| S 2,5 + HLN 2,5 | 0,0179 | 1,5973E-09 | 2,2719E-09 |
| S 2,5 + HLN 0,5 | 0,0182 | 1,4540E-09 | 2,0653E-09 |
| S 2,5 + HLP 2,5 | 0,0183 | 1,8037E-09 | 2,6169E-09 |
| S 2,5 + HLP 0,5 | 0,0188 | 1,6174E-09 | 2,1643E-09 |
| FBS 2,5 g L^{-1} | 0,0181 | 1,5951E-09 | 1,9394E-09 |
| FBS 5,0 g L^{-1} | 0,0197 | 1,4274E-09 | 1,8270E-09 |

Za očekivati bi bilo da stanice koje su dosegle najveću koncentraciju stanica po mL medija imaju i najveću specifičnu brzinu rasta. Vrijednosti se mogu donekle staviti u korelaciju za kontrolu FBS 5,0 g L^{-1} koja je pokazala najbolji rast stanica i ima najveću specifičnu brzinu rasta, kao i za uzorak s najmanjim brojem poraslih stanica (S 2,5 + HLA 2,5) kojeg karakterizira najmanja specifična brzina rast (tablica 3). Ostali rezultati ne prate taj trend, već između njih postoje blage varijacije, s tim da najveće odstupanje pokazuje uzorak S 2,5 + HLA 0,5 koji ima neobjašnjivo visoku specifičnu brzinu rasta.

Koncentracija glukoze u mediju određivana je 10. dan uzgoja, odnosno kada su stanice bile na vrhu eksponencijalne faze rasta (izuzetak je HLA dodan u koncentraciji 0,5 g L^{-1} gdje su stanice 11. dan uzgoja imale najveći rast). Kao što je i očekivano, s vremenom je došlo do smanjenja koncentracije glukoze u mediju jer stanice koriste glukozu kao glavni supstrat za

brojne metaboličke procese ([slika 6 a](#)). Nije uočena povezanost između specifične brzine rasta i specifične brzine potrošnje glukoze za različite koncentracije dodanih hidrolizata ([tablica 3](#)), te se stoga ne može zaključiti kako njihov dodatak utječe na specifičnu brzinu potrošnje glukoze i u kakvoj je ovisnosti sa specifičnom brzinom rasta.

Laktat nastaje kao nusprodukt metabolizma i njegova koncentracija s vremenom raste kako se on nakuplja u organizmu. Na [slici 6 b](#)) vidljivo je da laktat nastaje u približno jednakim koncentracijama kod svih dodanih koncentracija hidrolizata kao i kontrola. Specifična brzina nastajanja laktata ni u ovom se slučaju ne može staviti u korelaciju sa specifičnom brzinom rasta ([tablica 3](#)).

5. ZAKLJUČCI

S obzirom na rezultate provedenog eksperimenta, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Proteinski hidrolizati uljne pogače lana dobiveni enzimom *Neutrased* pokazali su se najučinkovitijim za poticanje rasta stanica, dok je kod hidrolizata nastalih pomoću enzima *Protamex* i *Alcalase* uočeno i inhibitorno djelovanje u odnosu na kontrolu.
2. Medij s dodatkom proteinskog hidrolizata dobivenog enzimom *Neutrased* u koncentraciji $0,5 \text{ g L}^{-1}$ i seruma $2,5 \text{ g L}^{-1}$ pokazao je približno jednak rast stanica kao i medij sa serumom u koncentraciji od $5,0 \text{ g L}^{-1}$ te je time postignuta djelomična zamjena seruma.
3. Bolji rast stanica postiže se kada se u medij doda proteinski hidrolizat uljne pogače lana u koncentraciji od $0,5 \text{ g L}^{-1}$, nego u koncentraciji od $2,5 \text{ g L}^{-1}$, što znači da veće koncentracije proteinskih hidrolizata mogu djelovati inhibitorno na rast stanica.
4. S obzirom da hidrolizat nastao enzimom *Alcalase* sadrži relativno najviše niskomolekularnih peptida, a relativno najlošije djeluje na rast stanica, može se zaključiti da hidrolizati u kojima dominiraju peptidi $< 5 \text{ kDa}$ djeluju inhibirajuće na rast stanica.

6. POPIS LITERATURE

Anonymous 1 (2022) <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/how-to-do-a-proper-cell-culture-quick-check/>. Pristupljeno 18. lipnja 2022.

Anonymous 2 (2022) <https://www.synthego.com/hek293>. Pristupljeno 20. lipnja 2022.

Anonymous 3 (2022) <https://www.marienfeld-superior.com/counting-chambers-2817.html>. Pristupljeno 11. lipnja 2022.

Anonymous 4 (2022) https://www.researchgate.net/figure/The-Neubauer-chamber-grid_fig1_256436846. Pristupljeno 11. lipnja 2022.

Babcock, J., Smith, S., Huttinga, H., & Merrill, D. (2007). Enhancing performance in cell culture. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, 27(20), 47-+. <https://www.genengnews.com/magazine/81/enhancing-performance-in-cell-culture/>. Pristupljeno 20. lipnja 2022.

Brunner, D., Frank, J., Appl, H., Schöffl, H., Pfaller, W., & Gstraunthaler, G. (2010). The serum-free media interactive online database. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 27(1), 53-62. <https://doi.org/10.14573/altex.2010.1.53>

Butler, M. (2004). *Animal cell culture and technology*. Taylor & Francis, str. 1-77.

Butler, M. (2005). Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied microbiology and biotechnology*, 68(3), 283-291. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1980-8>

Butler, M. (2015). Serum and protein free media. In *Animal cell culture*. Springer, Cham., str. 223-236. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10320-4_8

Chun, B.-H., Kim, J.-H., Lee, H.-J., & Chung, N. (2007). Usability of size-excluded fractions of soy protein hydrolysates for growth and viability of Chinese hamster ovary cells in protein-free suspension culture. *Bioresource Technology*, 98(5), 1000–1005. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.04.01>

Farges-Haddani, B., Tessier, B., Chenu, S., Chevalot, I., Harscoat, C., Marc, I., ... Marc, A. (2006). Peptide fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal proteins in CHO cell culture media. *Process Biochemistry*, 41(11), 2297–2304. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.06.002>

Franěk, F., Hohenwarter, O., & Katinger, H. (2000). Plant protein hydrolysates: preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotechnology progress*, 16(5), 688-692. <https://doi.org/10.1021/bp0001011>

Goyal, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Gill, S., & Sihag, M. (2014). Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *Journal of food science and technology*, 51(9), 1633-1653. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1247-9>

Gutiérrez, C., Rubilar, M., Jara, C., Verdugo, M., Sineiro, J., & Shene, C. (2010). Flaxseed and flaxseed cake as a source of compounds for food industry. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(4), 454-463. <http://doi.org/10.4067/S0718-95162010000200006>

Lee, Y. K., Kim, S. Y., Kim, K. H., Chun, B.-H., Lee, K.-H., Oh, D. J., & Chung, N. (2008). Use of soybean protein hydrolysates for promoting proliferation of human keratinocytes in serum-free medium. *Biotechnology Letters*, 30(11), 1931–1936. <https://doi:10.1007/s10529-008-9796-0>

Liste-Calleja, L., Lecina, M., Lopez-Repullo, J., Albiol, J., Solà, C., & Cairó, J. J. (2015). Lactate and glucose concomitant consumption as a self-regulated pH detoxification mechanism in HEK293 cell cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(23), 9951-9960. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6855-z>

Logarušić, M., Gaurina Srček, V., Berljavac, S., Leboš Pavunc Andreja, Radošević, K. & Sli-
vac, I. (2021) Protein Hydrolysates from Flaxseed Oil Cake as a Media Supplement in CHO
Cell Culture. *Resources (Basel)*, 10 (6), 59-71. <https://doi.org/10.3390/resources10060059>

Logarušić, M., Radošević, K., Bis, A., Panić, M., Slivac, I. & Gaurina Srček, V. (2020) Biological Potential of Flaxseed Protein Hydrolysates Obtained by Different Proteases. *Plant foods for human nutrition*, 75 (4), 518-524. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00841-z>

Macdonald, C. (1990). Development of new cell lines for animal cell biotechnology. *Critical reviews in biotechnology*, 10(2), 155-178. <https://doi.org/10.3109/07388559009068265>

Mannucci, A., Castagna, A., Santin, M., Serra, A., Mele, M., & Ranieri, A. (2019). Quality of flaxseed oil cake under different storage conditions. *LWT*, 104, 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.035>

Mulukutla, B. C., Khan, S., Lange, A., & Hu, W.-S. (2010). Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways. *Trends in Biotechnology*, 28(9), 476–484. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.06.005>

Nema, R., & Khare, S. (2012). An animal cell culture: Advance technology for modern research. 3, 219-226. <http://doi.org/10.4236/abb.2012.33030>

Oyeleye, O. O., Ogundeji, S. T., Ola, S. I., & Omitogun, O. G. (2016). Basics of animal cell culture: Foundation for modern science. *Academic Journals*. 11, 6-16. <https://doi.org/10.5897/BMBR2016.0261>

Slivac, I., Buljubašić, E., Gaurina Srček, V., & Logarušić, M. (2020). Proizvodnja cjepiva protiv gripe-dosezi i izazovi. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 15(3-4), 83-93. <https://doi.org/10.31895/hcptbn.15.3-4.9>

Synthego (2022) HEK293 Cells: Background, Applications, Protocols, and More. Synthego, <https://www.synthego.com/hek293>. Pristupljeno 19. lipnja 2022.

Thomas, P., & Smart, T. G. (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 51(3), 187-200. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>

Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive medicine and biology*, 16(2), 99-117.
<https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>

Izjava o izvornosti

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

Laura Režek

Vlastoručni potpis