

Učinak hidrolizata proteina soje na diferencijaciju mišjih mišićnih stanica C2C12

Mijačević, Dajana

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:159:946034>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-02**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Dajana Mijačević
0058220432

**UČINAK HIDROLIZATA PROTEINA SOJE NA DIFERENCIJACIJU MIŠJIH
MIŠIĆNIH STANICA C2C12**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Tehnologija vitamina i hormona

Mentor: prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Učinak hidrolizata proteina soje na diferencijaciju mišjih mišićnih stanica C2C12

Dajana Mijačević, 0058220432

Sažetak:

Sojini proteini posjeduju dobro izbalansiran sastav aminokiselina, a brojna istraživanja ukazuju na pozitivan učinak u nastanku mišićne mase i poticanju rasta mišića. Cilj ovog rada bio je ispitati učinak hidrolizata proteina soje na proliferaciju, diferencijaciju i morfološke promjene mišjih C2C12 mioblasta. Stanice su tretirane hidrolizatom soje u rasponu koncentracija 0,5-5 mg mL⁻¹, a vijabilnost stanica određena je nakon 48 sati MTS metodom. Učinak 1 mg mL⁻¹ hidrolizata soje na diferencijaciju C2C12 stanica praćen je tijekom sedam dana, a učinak 1 mg mL⁻¹ hidrolizata na atrofiju C2C12 stanica induciranu sa 100 μM deksametazona praćen je tijekom dva dana. Dobiveni rezultati su pokazali inhibicijski učinak dodatka hidrolizata soje na vijabilnost C2C12 stanica pri svim ispitanim koncentracijama. Međutim, dodatak hidrolizata proteina soje u koncentraciji od 1 mg mL⁻¹ povećao je promjere miotuba tijekom diferencijacije C2C12 stanica za 12 %. Dodatak 1 mg mL⁻¹ hidrolizata proteina soje u prisustvu 100 μM deksametazona povećava promjer miotuba gotovo na kontrolne vrijednosti te time ukazuje na svoj potencijal protektivnog učinka u atrofiji miotuba. Usporedbom morfologije kontrolnih i tretiranih stanica s 1 mg mL⁻¹ hidrolizata soje, nisu uočene bitnije razlike u izgledu monosloja C2C12 stanica.

Ključne riječi: C2C12 stanice, diferencijacija, hidrolizat soje, proliferacija

Rad sadrži: 24 stranice, 11 slika, 26 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Datum obrane: 8. srpnja 2024.

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 Culture Technology and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

The effect of soy protein hydrolysate on the differentiation of C2C12 mouse muscle cells

Dajana Mijačević, 0058220432

Abstract:

Soy proteins possess a well-balanced amino acid composition, and numerous studies indicate a positive effect on muscle mass formation and stimulation of muscle growth. The aim of this study was to examine the effect of soy protein hydrolysate on the proliferation, differentiation, and morphological changes of mouse C2C12 myoblasts. The cells were treated with soy hydrolysate in a concentration range of 0,5-5 mg mL⁻¹, and cell viability was determined after 48 hours using the MTS method. The effect of 1 mg mL⁻¹ soy hydrolysate on the differentiation of C2C12 cells was monitored over seven days, and the effect of 1 mg mL⁻¹ hydrolysate on the atrophy of C2C12 cells induced by 100 μM dexamethasone was monitored over two days. The obtained results showed an inhibitory effect of the addition of soy hydrolysate on the viability of C2C12 cells at all tested concentrations. However, the addition of soy protein hydrolysate at a concentration of 1 mg mL⁻¹ increased the diameter of myotubes during the differentiation of C2C12 cells by 12 %. The addition of 1 mg mL⁻¹ soy protein hydrolysate in the presence of 100 μM dexamethasone increases the diameter of myotubes almost to control values, indicating its potential protective effect in myotube atrophy. Comparing the morphology of control and treated cells with 1 mg mL⁻¹ soy hydrolysate, no significant differences were observed in the appearance of the C2C12 cell monolayer.

Keywords: C2C12 cells, differentiation, soy hydrolysate, proliferation

Thesis contains: 24 pages, 11 figures, 26 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Višnja Gaurina Srček, PhD, Full Professor

Thesis defended: July 8, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KULTURA STANICA.....	2
2.2. BILJNI HIDROLIZATI KAO DODATAK MEDIJU ZA UZGOJ ŽIVOTINJSKIH STANICA	3
2.2.1. HIDROLIZAT SOJE.....	4
2.3. DIFERENCIJACIJA MIŠIĆNIH STANICA	5
3. EKSPERIMENTALNI DIO	8
3.1. MATERIJALI	8
3.1.1. KEMIKALIJE	8
3.1.2. OTOPINE I PUFERI.....	8
3.1.3. UREĐAJI I OPREMA	9
3.2. METODE.....	9
3.2.1. UZGOJ C2C12 STANICA I TRETMAN HIDROLIZATIMA.....	9
3.2.2. ODREĐIVANJE BROJA C2C12 STANICA METODOM TRIPAN PLAVO.....	11
3.2.3. ODREĐIVANJE VIJABILNOSTI STANICA MTS METODOM.....	12
3.2.4. BOJANJE STANICA BOJOM KRISTAL-LJUBIČASTO.....	13
3.2.5. OBRADA PODATAKA	13
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
4.1. UČINAK HIDROLIZATA SOJE NA VIJABILNOST C2C12 STANICA	14
4.2. UČINAK DEKSAMETAZONA NA VIJABILNOST C2C12 MIŠIĆNIH STANICA.....	15
4.3. UČINAK HIDROLIZATA SOJE NA DIFERENCIJACIJU C2C12 STANICA	16
4.4. UČINAK HIDROLIZATA SOJE I DEKSAMETAZONA NA DIFERENCIJACIJU C2C12 STANICA	18
5. ZAKLJUČCI	21
6. POPIS LITERATURE	22

1. UVOD

Kultura stanica je proces u kojem se stanice uzgojene *in vitro* održavaju u simuliranim fiziološkim uvjetima. Razvoj metoda kulture životinjskih stanica doveo je do razvoja brojnih procesa u području medicinske biotehnologije koji uključuju proizvodnju cjepiva, rekombinantnih proteina, monoklonskih antitijela i stanica za transplantaciju. Najvažniji čimbenik u tehnologiji životinjskih stanica je medij za uzgoj budući da značajno utječe na rast i proizvodnost stanica.

Posljednjih godina interes znanstvene javnosti usmjeren je na pripravu i korištenje biljnih proteinskih hidrolizata kako u području tehnologije životinjskih stanica tako i za primjenu kao funkcionalnih dodataka prehrani. Dokazano je da proteinski hidrolizati iz različitih biljnih izvora posjeduju širok raspon različitih bioloških aktivnosti, uključujući antitumorsko, antihipertenzijsko, antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje.

Soja je biljka koja sadrži visok udio proteina (37-50 %), a više kliničkih i epidemioloških istraživanja je pokazalo da konzumiranje sojinih proteina može stimulirati nastajanje mišićne mase i potaknuti rast mišića (Paul i Mendelson, 2015). Isto tako poznato je da hidrolizat sojinog proteina povećava koncentracije aminokiselina u plazmi što ukazuje da mali peptidi iz hidrolizata bolje opskrbljuju tijelo aminokiselinama te time mogu djelovati i na sintezu proteina u mišićima (Chang i sur., 2022).

S obzirom na prethodno navedeno, cilj ovog rada bio je ispitati djelovanje hidrolizata soje na vijabilnost i diferencijaciju C2C12 stanica. Isto tako, htjelo se utvrditi posjeduje li hidrolizat proteina soje protektivno djelovanje u C2C12 stanicama pri tretmanu stanica deksametazonom, glukokortikoidnim spojem koji izaziva atrofiju mišića.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kultura stanica

Kultura stanica važna je laboratorijska tehnika koja ima značajnu ulogu u biološkim istraživanjima, procjenama učinka i toksičnosti novih lijekova, proizvodnji cjepiva i biofarmaciji. Kultura stanica obuhvaća izolaciju stanica iz njihovog prirodnog okruženja (*in vivo*) i njihov uzgoj nastavljen *in vitro* tj. njihovo stavljanje u umjetno okruženje u kontroliranim uvjetima koje pogoduje njihovoj proliferaciji (Arora, 2013). Stanične se kulture dijele na primarne, sekundarne i stanične linije.

Primarna kultura stanica sastavljena je od različitih tipova stanica izoliranih izravno iz tkiva. Kada stanice potroše sve potrebne hranjive tvari za rast, one se prenose u svježi hranjivi medij, što rezultira stvaranjem sekundarne stanične kulture koja ima ograničeni životni vijek. Posljedica daljnjeg precjpljivanja su stanične linije koje imaju neograničen životni vijek *in vitro*. Stanične linije se mogu uzgajati kao stanice u suspenziji ili mogu biti stanice adherentnoga tipa koje zahtijevaju čvrstu površinu za rast. Adherentne stanice se izoliraju iz tkiva ili organa gdje su nepokretne i za rast zahtijevaju vezanje za podlogu. S druge strane, stanice u suspenziji ne vežu se za podlogu i mogu se uzgajati slobodno plutajući u mediju za kulturu (Skaramuca, 2018). Rad sa suspenzijskim stanicama je praktičan jer omogućuje lakšu kontrolu i vođenje uzgoja, zbog čega se većina komercijalnih terapijskih rekombinantnih proteina proizvodi u suspenzijskoj kulturi. Kod adherentnih staničnih kultura, broj stanica ovisi o dostupnoj površini za rast. Važno je paziti da se kultura održava do potpune prekrivenosti površine stanicama, što se naziva konfluentnost. Jedna od poznatijih humanih staničnih linija je HeLa dok se u biotehnološkim procesima najčešće upotrebljava stanična linija ovarija kineskog hrčka CHO (engl. *Chinese Hamster Ovary*) (Radošević, 2020).

Kod *in vitro* uzgoja životinjskih stanica bitno je uzeti u obzir da različite stanične linije zahtijevaju različite uvjete uzgoja za optimalan rast i održavanje stanica. Stoga, postoje različite vrste medija za uzgoj, od kojih su najčešće korišteni: BME (*Basal Medium Eagle's*), EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*), DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*) i IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*). Medij za uzgoj stanica mora osigurati uvjete što sličnije uvjetima koji su vladali u *in vivo* sustavu iz kojeg su i izolirane što uključuje temperaturu, koncentracija CO₂ i kisika, pH-vrijednost, osmotski tlak te koncentracije ostalih potrebnih nutrijenata (glukoza, aminokiseline, vitamini, lipidi i anorganske soli). Mediju za uzgoj može se dodati i serum koji je važan izvor faktora rasta koji potiču staničnu proliferaciju te izvor adhezijskih faktora koji potiču prihvaćanje stanica za uzgojnu površinu. Također djeluje kao inhibitor tripsina i izvor minerala, lipida i hormona. Najčešće se koristi fetalni goveđi serum (*Fetal Bovine*

Serum - FBS) koji ima visok sadržaj embrionalnih faktora rasta (Thermo Fisher Scientific, 2020). Od presudne je važnosti prilikom uzgoja kultura životinjskih stanica održavati aseptične uvjete rada kako bi zaštitili stanice od kontaminacije. Iz tog razloga u medij se dodaju antibiotici, a bitno je da se svako rukovanje stanicama provodi u komori za sterilni rad tj. u laminaru. Osoba koja rukuje laboratorijskim sterilnim priborom, posudama i stanicama mora dezinficirati svoje ruke.

Danas se mnoga istraživačka područja temelje na primjeni kultura životinjskih stanica poput istraživanja biologije stanica raka, proizvodnje i ispitivanja cjepiva, dobivanje rekombinantnih proteina i monoklonskih protutijela, genske terapije i mnogih drugih područja. Korištenje kultura stanica potiče se kao alternativa *in vivo* testiranju za procjenu toksičnosti i biološke aktivnosti prirodnih i sintetskih spojeva čime se smanjuje i potreba za pokusnim životinjama.

2.2. Biljni hidrolizati kao dodatak mediju za uzgoj životinjskih stanica

Hidrolizati su proizvodi biljnih ili životinjskih proteina dobiveni hidrolizom pomoću kiselina, baza, enzima ili procesa fermentacije (Ho i sur., 2021). Proteinski hidrolizati mogu podržati rast stanica i smanjiti potrebu za upotrebom seruma (Hou i sur., 2017). Fetalni goveđi serum (FBS) je široko korišten dodatak za *in vitro* rast životinjskih i ljudskih stanica, tkiva i organa, prvenstveno zbog obilja mikro- i makronutrijenata i faktora rasta. Međutim, tijekom godina, sve veća potražnja, visoka cijena, varijabilnost kvalitete i sastava između različitih serija te rastuće etičke zabrinutosti doveli su do potrebe za alternativom FBS-u (Chelladurai i sur., 2021). Budući da rizici upotrebe hidrolizata životinjskog porijekla nadmašuju koristi, popularnost su stekli hidrolizati biljnog porijekla poput hidrolizata dobivenih iz proteina soje, riže i sjemenki pamuka. Prednosti upotrebe biljnih hidrolizata kao dodatak mediju za uzgoj obuhvaćaju smanjenje rizika od mogućih kontaminacija prilikom korištenja hidrolizata životinjskog podrijetla, a ujedno pružaju i faktore prisutne u serumu uz eliminaciju i većine rizika vezanih uz njegovu upotrebu. Njihova niža cijena u odnosu na životinjske hidrolizate dodatno je potaknula i njihovo korištenje kao zamjene za serum u biotehnološkoj proizvodnji proteina (Ho i sur., 2021).

Sastav hidrolizata jako ovisi o korištenom početnom materijalu, metodama hidrolize te stupnju hidrolize (Zhang i sur., 2019). Hidrolizati predstavljaju vrlo složene smjese aminokiselina, peptida, slobodnih kiselina, lipida, minerala i ugljikohidrata koji nastaju djelomičnom ili potpunom hidrolizom proteina. Veličina molekula peptida u hidrolizatima ponekad se navodi kao potencijalni parametar koji utječe na ponašanje stanica. Peptidi niže molekulske težine (1-3 kDa) pokazuju bolje biološke aktivnosti poput antioksidativnih svojstava od peptida veće molekulske

težine. Upotreba biljnih peptida može zahtijevati i procese frakcioniranja s obzirom da nemaju svi oligopeptidi unutar peptona iste biološke aktivnosti. Hidrolizati biljnih proteina mogu biti izvor kratkih lanaca peptida s biološkim svojstvima koja uključuju imunomodulatorne, antimikrobne, antitrombotske, antihipertenzivne i inhibitore proteaza, kao i aktivnosti koje potiču rast stanica sisavaca (Farges-Haddani i sur., 2006). Osim navedenog, biljni peptoni mogu djelovati ne samo kao nutritivni faktori, već i kao faktori koji povećavaju produktivnost stanica ili inhibiraju apoptozu stanica. Hidrolizati biljnih proteina proizvode se od različitih sirovina, kao što su soja, pamuk, riža, pšenica, uljana repica, grašak i kukuruz.

2.2.1. Hidrolizat soje

Soja je biljka mahunarka koja osim visokog udjela proteina (37-50 %) sadrži i minerale (npr. soli kalcija, kalija, fosfora, željeza), vitamine (npr. tiamin, riboflavin, folnu kiselinu, pantotensku kiselinu, niacin, vitamin B₆, C, E, D i K) vlakna, esencijalne masne kiseline (npr. omega-3 masne kiseline), fitoestrogene poput izoflavona (npr. genistein, daidzein, glicitein) itd. Sojini proteini su visoko kvalitetna hrana jer su odlično izbalansirani po sastavu aminokiselina i kao takvi se lako metaboliziraju. Brojna klinička i epidemiološka istraživanja su pokazala da konzumiranje sojinih proteina može stimulirati nastajanje mišićne mase i potaknuti rast mišića (Paul i Mendelson, 2015).

Hidrolizat soje dobiva se enzimskom ili kemijskom (pomoću kiselina ili lužina) hidrolizom zrna soje. Budući da je kemijska hidroliza agresivna tehnika prilikom koje dolazi do smanjenja nutritivnih vrijednosti hidrolizata i kvalitete proteina (npr. oksidacija cisteina i metionina, razgradnja serina i treonina, pretvorba glutamina i asparagina u glutamat i aspartat), prednost se daje enzimskoj hidrolizi. Za razliku od kemijske hidrolize, enzimska hidroliza je blaža tehnika u kojoj proteolitički enzimi kataliziraju hidrolizu peptidnih veza (amidnih veza) i na taj način razgrađuju i modificiraju proteine i peptide. Enzimskom hidrolizom može se postići željeni stupanj hidrolize i dobiti hidrolizati s različitim funkcionalnim svojstvima.

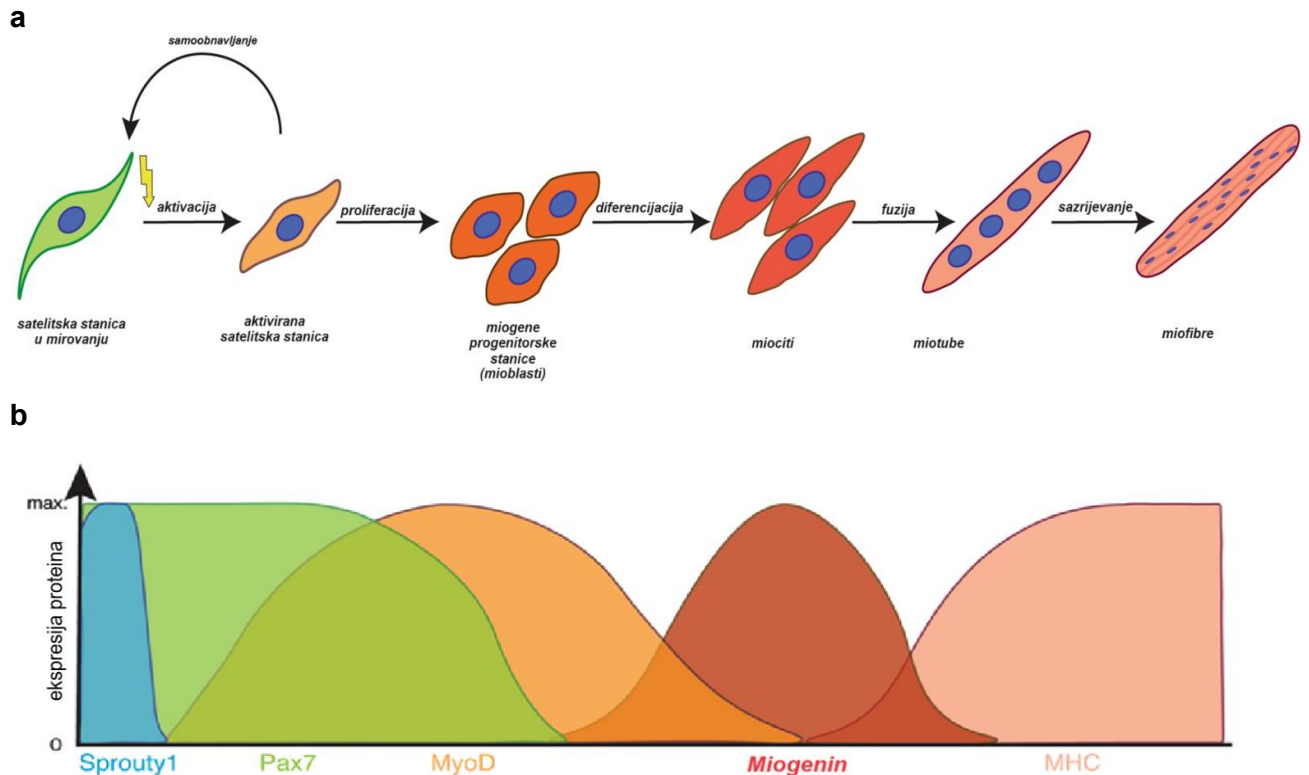
Budući da hidrolizat soje potječe iz prirodne sirovine, njegov sastav nije u potpunosti kemijski definiran. Hidrolizat soje upotrebljava se u uzgoju životinjskih stanica kao zamjena za serum s ciljem povećanja gustoće i trajnosti stanica, sinteze rekombinantnih proteina, sprječavanje apoptoze stanica, a sve je veća njegova primjena u biofarmaceutskoj proizvodnji terapijskih pripravaka (Hartshorn i sur., 2010). Hidrolizati sojinog proteina su najčešće dodavani kulturama stanica pa je utvrđeno da njegov dodatak značajno poboljšava rast stanica i proizvodnju rekombinantnih proteina u staničnim kulturama (Gupta i sur., 2013).

2.3. Diferencijacija mišićnih stanica

Mišićne stanice, poznate i kao miociti, su posebne stanice u tijelu koje omogućuju kontrakciju i opuštanje mišića. One čine skeletne mišiće koji su potrebni za voljne pokrete poput hodanja i podizanja, glatke mišiće koji kontroliraju funkcije unutarnjih organa poput crijeva i krvnih žila te srčani mišić ključan za konstantnu pumpu krvi kroz tijelo. Budući da se u ovom istraživanju koristi stanična linija C2C12 ovdje će biti objašnjena diferencijacija skeletnih mišićnih stanica. Skeletni mišići posjeduju izvanrednu sposobnost regeneracije i prilagodbe fiziološkim zahtjevima poput rasta ili treninga. Matične stanice mišića, također poznate kao satelitske stanice (SCs), neophodne su za regeneraciju skeletnih mišića. U mirovanju, satelitske stanice smještene su između sarkoleme i bazalne membrane mišićnog vlakna, a zbog takvog perifernog položaja nazvane su satelitskim stanicama. Osim što stvaraju nove mišićne stanice (mioblaste) imaju i sposobnost samoobnavljanja i održavanja svoje populacije (Bajek i sur., 2015). Satelitska stanica obično je u stanju mitotskog mirovanja, ali može biti aktivirana zbog traume, bolesti ili drugih promijenjenih stanja. Nakon aktivacije, satelitske stanice prolaze kroz fazu proliferacije, tijekom koje se razmnožavaju i nastaju mononuklearne mišićne prekursorne stanice ili mioblasti. Kada se završi faza proliferacije, mioblasti počinju proces diferencijacije. Tijekom diferencijacije, mioblasti se spajaju međusobno kako bi formirali multinuklearna mišićna vlakna. Ova nova mišićna vlakna postupno sazrijevaju, a karakteriziraju ih periferno smještene postmitotske jezgre. Ovaj kompleksan proces omogućava obnovu i rast mišićnog tkiva nakon ozljeda ili drugih stanja koja uzrokuju oštećenje mišića (Slika 1).

Transkripcijski faktor Pax7 izražen je u svim satelitskim stanicama i potreban je za njihovo postnatalno održavanje i regeneraciju skeletnih mišića. Nakon aktivacije, pokreće se proces miogeneze i satelitske stanice koeksprimiraju Pax7 i MyoD i izlaze iz stanja mirovanja i dalje se diferenciraju u miocite, prije nego što sazriju u miofibrile. Satelitske stanice imaju veliki miogeni potencijal koji uglavnom ovisi o ekspresiji Pax7 transkripcijskog faktora i ekspresiji miogenetskih regulacijskih faktora. Miogenetski regulacijski faktori su proteini koji se heterodimeriziraju s nekim od članova široke obitelji E proteina i vežu kao kompleks na specifičnu sekvencu DNA koja se zove E box i nalazi se na pojačivačima i promotorima (Bajek i sur., 2015). Na taj način ovi čimbenici potiču transkripciju gena koji su specifični za mišićno tkivo. U miogenetske regulacijske faktore ubrajamo myoD, myf5, MRF4 i miogenin (Slika 1). Satelitske stanice u mirovanju u normalnim uvjetima uz Pax7 izražavaju i myf5. Aktivirana satelitska stanica, ozljedom mišića ili traumom, odlikuje se ekspresijom myoD i dijeli se stvarajući mišićne prekursorne stanice tj. mioblaste. Mioblasti se uz povećanje ekspresije miogenina i regulacijskog faktora MRF4 fuzioniraju. Pojavom miogenina tj. čimbenika

diferencijacije smanjuje se ekspresija myf5 i Pax7. Uloga myf5 tijekom regeneracije mišića je poticanje proliferacije zajedno sa myoD koji u koordinaciji s miogeninom potiče diferencijaciju mioblasta. Morfološki, mioblasti postaju izduženi miociti, koji se potom spajaju kako bi formirali multinukleirane miotube. Novoformirane miotube karakteriziraju centralno smještene jezgre. Miotube sazrijevaju u kontraktilne jedinice skeletnih mišića, miofibrile.



Slika 1. a) Shematski prikaz tijeka miogeneze; b) Profil ekspresije ključnih miogenih regulacijskih faktora (prema Schmidt i sur., 2019)

Za identifikaciju satelitskih stanica koriste se razni molekularni markeri. Markeri su mjerljivi pokazatelji bioloških procesa, fizioloških stanja ili patoloških promjena u organizmu. Oni se koriste za identifikaciju, praćenje ili dijagnosticiranje određenih stanja ili bolesti. Markeri mogu biti različite vrste tvari ili struktura, uključujući proteine, enzime, genetske materijale (npr. DNA ili RNA), stanice, metaboličke produkte ili druge biološke komponente koje se mogu kvantitativno ili kvalitativno analizirati. Jedan od prvih primijenjenih markera je adhezijska molekula M-cadherin koja mirne satelitske stanice održava u svom položaju. Transkripcijski faktor Pax7 kojeg eksprimiraju satelitske stanice također se koristi kao njihov marker. Međuostalom, kao markeri koriste se i α 7-Integrin i β 1-Integrin, Syndecan-4, Kalcitonin-Receptor (CALCR), C-X-C kemokinski receptor tipa 4 (CXCR4) i CD34 (engl. Cluster of

differentiation 34). Različite signalne molekule unutar niše satelitskih stanica reguliraju njihovo stanje. Regulatori procesa tijekom razvojne miogeneze, poput Notch i Wnt proteina, također sudjeluju i u regenerativnoj miogenezi. Notch signalizacija pospješuje samoobnavljanje inhibirajući ekspresiju myoD i inducirajući ekspresiju Pax7. Dok kanonska Wnt- β -katenin signalizacija potiče diferencijaciju mioblasta.

Pretpostavlja se da postoji analogija između mišjih i ljudskih satelitskih stanica, koje su mnogo teže proučavati i izolirati. Nažalost, postoji vrlo malo markera kojima se ljudske satelitske stanice mogu identificirati.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), Sigma, St. Louis, SAD
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), Gibco BRL, SAD
- HS (*Horse Serum*), Capricorn Scientific, Njemačka
- MTS reagens (*The CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent*), Promega, Madison, SAD
- Hidrolizat soje UF Solution 50x, Sigma, St. Louis, SAD
- Deksametazon, Sigma, St. Louis, SAD
- Tripan-plavo, Sigma, St. Louis, SAD
- Kristal-ljubičasto, Kemika, Zagreb, RH
- Etanol, Kemika, Zagreb, RH
- Tripsin-EDTA, Sigma, St. Louis, SAD
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalij dihidrogenfosfat, Kemika, 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

Otopina deksametazona(10mM)

Deksametazon	11,78 g
Destilirana voda	3 mL

Otopina kristal-ljubičasto

Boja kristal-ljubičasto	0,2 g
2% etanol	10 mL

3.1.3. Uređaji i oprema

- Hladnjak (4°C i -20°C), Gorenje, Slovenija
- Hladnjak DirectFREEZE -86°C, ULTRA LOW, Nuve, Turska
- Komora za sterilan rad (stolni laminar), LFV 12, Iskra PIO, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, tip I CO₂-185, Kambič laboratorijska oprema, Slovenija
- Čitač mikrotitarskih ploča, TECAN, Mannedorf, Švicarska
- Svjetlosni mikroskop, Axiostar, Zeiss, Njemačka
- Laboratorijski pribor (menzura, pipete, nastavci za pipete, epruvete, odmjerne tikvice, ploče za uzgoj stanica)
- Neubauer - ova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright - Line, Njemačka

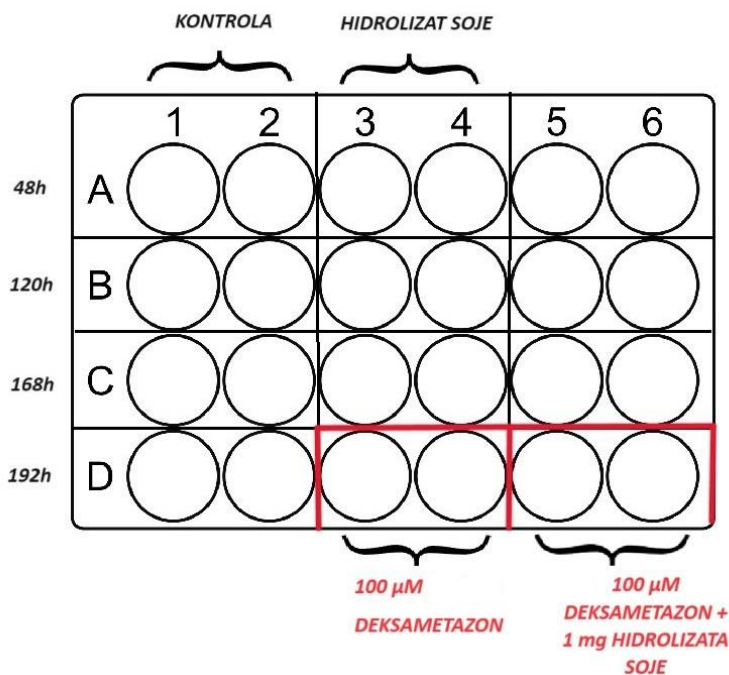
3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj C2C12 stanica i tretman hidrolizatima

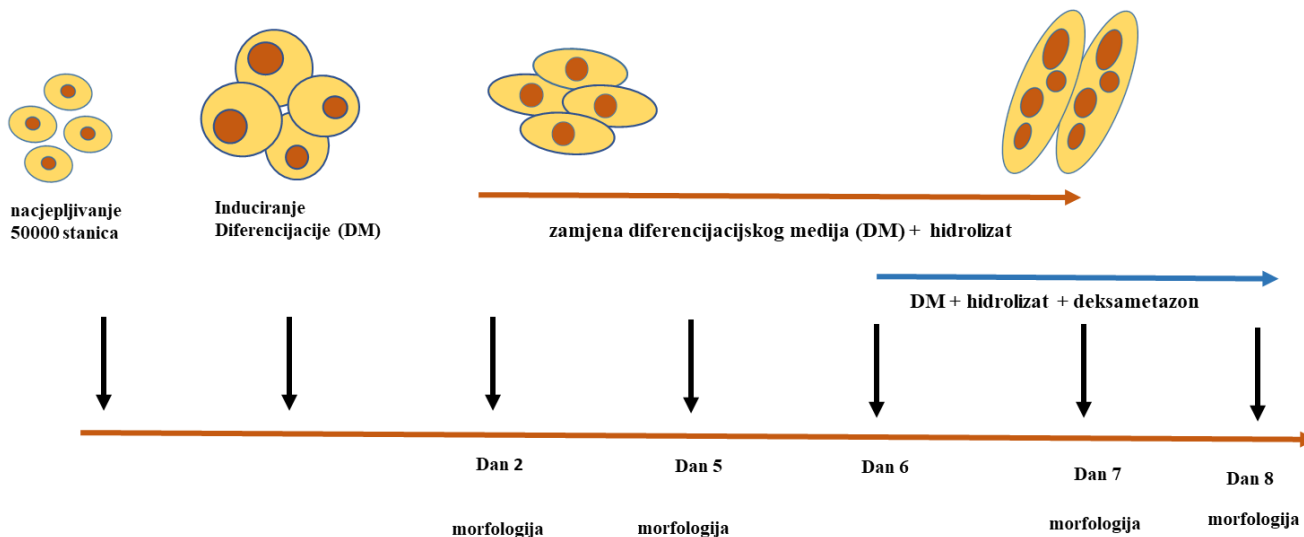
Stanična linija C2C12 korištena u ovom radu nabavljena je iz *American Type Culture Collection* (ATTC) banke stanica. C2C12 stanice su matične stanice mišjeg mišića izolirane nakon ozljede kako bi potaknule regeneraciju mišića (Wiji i sur., 2021). Stanice se uzgajaju u inkubatoru s 5 % CO₂ na 37 °C u mediju za proliferaciju Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) koji je obogaćen s 10 % (v/v) goveđeg fetalnog seruma. Matične stanice mišića proliferiraju kao mioblasti i diferenciraju se u miotube spajanjem stanica, tvoreći više mišićnih vlakana. C2C12 mioblasti proliferiraju eksponencijalno u odgovarajućim uvjetima rasta pri nižoj gustoći stanica (Tanaka i sur., 2011). Međutim, kada stanice dosegnu konfluenciju od oko 80 %, mogu smanjiti sposobnost proliferacije i postupno poticati diferencijaciju u miocite. Diferencijacija stanica se potiče mijenjanjem medija koji sadrži goveđi serum sa DMEM medijem koji sadrži 2 % konjskog seruma.

Stanice se najprije broje u Neubauerovoj komorici te se zatim pripremi suspenzija stanica koncentracije 5x10⁴ st mL⁻¹ i naciepljuje se u ploču s 24 jažice nakon čega se stanice stavljaju

u inkubator na 37 °C. Nakon 48 sati uzgoja kada se dosegla odgovarajuća gustoća stanica, DMEM medij koji sadrži goveđi serum zamijenjen je DMEM medijem koji umjesto goveđeg seruma sadrži 2 % konjskog seruma kako bi se potaknula diferencijacija stanica te se dodavao hidrolizat proteina soje u koncentraciji 1 mg mL⁻¹ u određene uzorke u jažicama (Slika 2). Svakih 48 sati mijenjan je medij s i bez dodatka hidrolizata kako bi stanice bile opskrbljene hranjivim tvarima koje troše tijekom uzgoja te se pratio utjecaj hidrolizata soje na diferencijaciju stanica nakon 48 ,120 i 168 sati pomoću mikroskopa mjerenjem dijametara stanica. Nakon diferencijacije stanica u trajanju od 192 sata praćen je i učinak dodatka deksametazona na morfološke promjene na način da je u uzorak stanica dodano 100 µM deksametazona, a u drugi uzorak 100 µM deksametazona i 1 mg mL⁻¹ hidrolizata soje. Cijeli slijed tijeka eksperimenta shematski je prikazan na slici 3. Svako nacjepljivanje i rukovanje sa stanicama provedeno je u komori za sterilni rad tj. u laminaru kako bi se izbjegle kontaminacije.



Slika 2. Prikaz ploče s 24 jažice tijekom provođenja eksperimenta utjecaja hidrolizata proteina soje i deksametazona na rast i diferencijaciju C2C12 stanica (vlastita fotografija)



Slika 3. Prikaz tijeka eksperimenta praćenja utjecaja hidrolizata proteina soje i deksametazona na diferencijaciju C2C12 stanica.

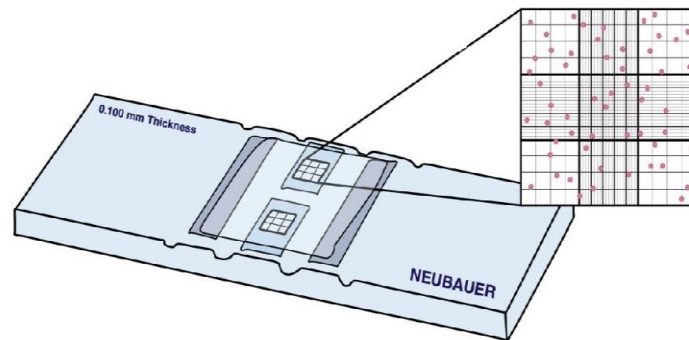
3.2.2. Određivanje broja C2C12 stanica metodom tripan plavo

Metoda bojanja otopinom tripan plavo koristi se za kvantitativno određivanje stanica tj. za brojanje stanica. Tripan plavo je vrsta kiselog azo bojila i organosulfonatna sol koja se koristi za selektivno bojenje mrtvih tkiva ili stanica u plavo. Tripan plavo može obojiti samo mrtve stanice čija je membrana propusna što se rezultira pojavom plave boje dok je u živim stanicama strogo kontroliran prolaz tvari kroz membranu.

C2C12 stanična linija je adherentna tj. prilikom rasta prihvaća se na podlogu na kojoj raste te ju prilikom izoliranja radi daljnje obrade moramo odvojiti od podloge. Najprije je potrebno ukloniti medij, a pomoću PBS pufera ispiremo stanice da se ukloni zaostali medij koji sadrži tripsin inhibitor. Nakon ispiranja dodajemo tripsin koji svojom proteolitičkom aktivnošću odvaja stanice s dna Petrijeve zdjelice koja se zatim stavlja u inkubator na 2-3 minute na 37 °C kako bi proces tripsinizacije bio brži i uspješniji. Tripsin se ne smije ostaviti da djeluje predugo jer bi mogao oštetiti stanice te je bitno periodički pratiti sam proces, a uspješnost procesa može se provjeriti pomoću inverznog mikroskopa. Stanice vezane za podlogu su izdužene, a ponovno zaokružene stanice nakon dodavanja tripsina ukazuje na uspješno odvajanje stanica od podloge te je onda potrebno dodati medij sa serumom kako bi spriječilo daljnje djelovanje tripsina i mogućnost oštećenja stanica. Stanice se resuspendiraju te se alikvotu suspenzije stanica od 20 µL dodaje 20 µL boje tripan plavo koje se miješaju pipetiranjem odnosno

višestrukim povlačenjem i ispuštanjem iz pipete. 20 μL uzorka nanosimo na Neubauerovu komoricu koja se sastoji od 9 kvadrata te je svaki kvadrat površine 1 mm^2 . Na komoricu se stavlja pokrovnica i u uz rub pokrovnice ispuštamo uzorak iz pipete dok se ne popuni prostor ispod pokrovnice. Brojanje se vrši unutar četiri velika kvadrata u kutovima komorice (Slika 4) pomoću svjetlosnog mikroskopa, a rezultat je aritmetička sredina broja stanica, prema formuli:

$$\text{broj stanica/mL suspenzije} = (\text{zbroj stanica izbrojenih u 4 kvadrata}) \times 5 \times 10^3$$



Slika 4. Neubauerova komorica za brojanje stanica (Anonymus, 2022.)

3.2.3. Određivanje vijabilnosti stanica MTS metodom

Vijabilnost C2C12 stanica određivali smo MTS kolorimetrijskom metodom koja se temelji na redukciji MTS reagensa do formazana pomoću mitohondrijskih dehidrogenaza prisutnih u živim stanicama. Koncentracija formazana kvantificira se spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije na specifičnoj valnoj duljini od 490 nm. Količina apsorbiranog MTS reagensa tj. koncentracija nastalog formazana proporcionalna je broju stanica.

Stanicama koje su uzgajane u DMEM mediju s fetalnim goveđim serumom u inkubatoru na 37 °C najprije se ukloni medij te se provodi proces tripsinizacije kako bi se adherentne stanice odvojile od podloge. Brojanje stanica provedeno je metodom tripan plavo i prema dobivenim kvantitativnim rezultatima pripremljena je određena koncentracija stanica koja se koristi u daljnjim postupcima. Pripremljeno je 8 mL suspenzije stanica i medija koncentracije 2×10^5 st mL^{-1} iz koje smo uzimali alikvote od 100 μL kako bi u svaku jažicu nacijepili 2×10^4 st. Nakon što su se stanice ponovno prihvatile za podlogu u jažicama, tretirane su hidrolizatima proteina soje različitih koncentracija u rasponu 0,5-5 mg mL^{-1} . Osim testiranja utjecaja hidrolizata soje na vijabilnost stanica, testirali smo i utjecaj deksametazona na njihovu vijabilnost kao i

kombinaciju djelovanja hidrolizata soje i deksametazona. Nakon inkubacije stanica 48 sati, dodano je po 10 μ L MTS reagensa u svaku jažicu. Ploče se inkubiraju na 37 °C u inkubatoru s 5 % CO₂ dva sata. Nakon inkubacije apsorbancija se mjeri pomoću čitača mikrotitarskih pločica na specifičnoj valnoj duljini od 490 nm. Količina nastalog formazana, koji je proporcionalan broju živih stanica, određuje se na temelju apsorbancije.

3.2.4. Bojanje stanica bojom kristal-ljubičasto

Jednostavna metoda za određivanje adherentnih stanica je bojenje stanica kristal ljubičastim bojom koje se veže za proteine i DNA. Osim za određivanje adherentnih stanica, poznata je upotreba ove tehnike prilikom bojanja po Gramu. Adherentne stanice koje prolaze kroz staničnu smrt odvajaju se od podloge odnosno gube sposobnost adherencije i posljedično nestaju iz populacije stanica, smanjujući količinu kristal ljubičastog bojenja u kulturi. Bojanje bojom kristal-ljubičasto korišteno je i u ovom eksperimentu kako bi se pratila diferencija C2C12 adherentnih stanica.

Prethodno uzgojenim C2C12 stanicama necijepljenim u ploču s 24 jažice najprije se ukloni medij za rast sa goveđim fetalnim serumom i stanice se ispiru PBS puferom. Zatim se doda boja kristal-ljubičasto te se kulture stanica s dodanom bojom inkubiraju 10 minuta na 37 °C. Prije mikroskopiranja obojanih uzoraka, boja se ispiru sa PBS puferom kako bi se uklonila nevezana boja i osigurala bolja vidljivost pri samom mikroskopiranju.

3.2.5. Obrada podataka

Svi eksperimentalni rezultati izraženi su kao srednje vrijednosti za koje je izračunata standardna devijacija, a značajnost između grupa određena je jednosmjernom ANOVA metodom, pri čemu su P-vrijednosti manje od 0,05 smatrane statistički značajnima. Statistička obrada rezultata provedena je koristeći program Microsoft Excel.

4. REZULTATI I RASPRAVA

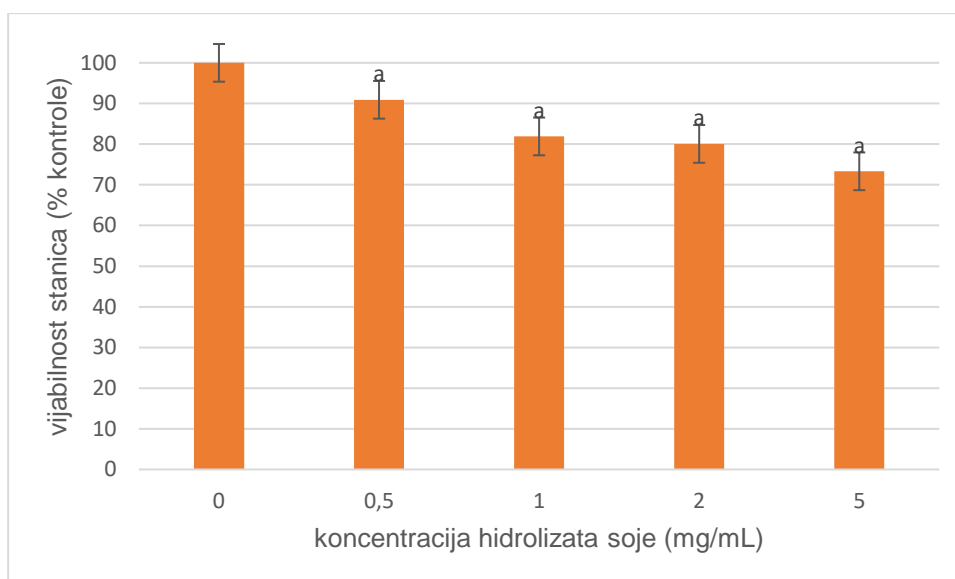
Posljednjih godina interes znanstvene javnosti usmjeren je na pripravu i korištenje biljnih proteinskih hidrolizata kako u području tehnologije životinjskih stanica tako i za primjenu kao funkcionalnih dodataka prehrani. Dokazano je da proteinski hidrolizati iz različitih biljnih izvora posjeduju širok raspon različitih bioloških aktivnosti, uključujući antitumorsko, antihipertenzivsko, antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje.

Soja je biljka koja sadrži visok udio proteina (37-50 %), a više kliničkih i epidemioloških istraživanja je pokazalo da konzumiranje sojinih proteina može stimulirati nastajanje mišićne mase i potaknuti rast mišića (Paul i Mendelson, 2015).

S obzirom na gore navedeno, cilj ovog rada bio je ispitati djelovanje hidrolizata soje na vijabilnost i diferencijaciju C2C12 stanica te utvrditi pokazuje li i zaštitno djelovanje na veličinu miotuba C2C12 stanica pri djelovanju deksametazona, spoja koji izaziva atrofiju mišića.

4.1. Učinak hidrolizata soje na vijabilnost C2C12 stanica

C2C12 stanice naciepljene su u ploče s 96 jažica u koncentraciji 2×10^4 st mL^{-1} , tretirane su hidrolizatom proteina soje u rasponu koncentracija od $0,5$ - 5 mg mL^{-1} te je vijabilnost stanica određena MTS metodom. Dobiveni rezultati vijabilnosti prikazani su kao % u odnosu na kontrolu tj. stanice koje nisu tretirane hidrolizatima (Slika 5).

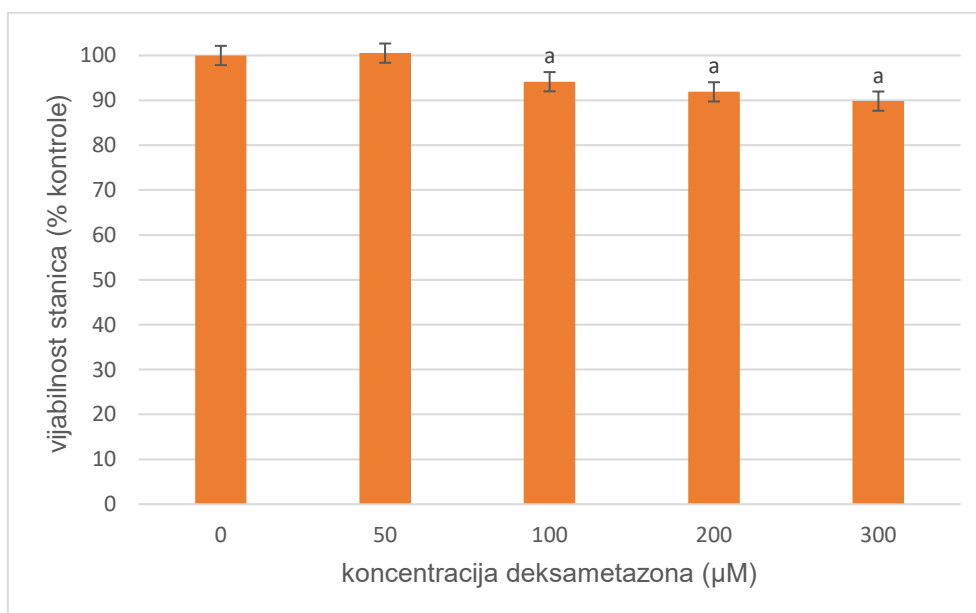


Slika 5. Učinak hidrolizata soje u koncentracija $0,5$ - 5 mg mL^{-1} na vijabilnost C2C12 stanica. ^astatistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$).

Dobiveni rezultati ukazuju da se vijabilnost stanica smanjuje povećanjem koncentracije hidrolizata proteina soje. Najmanja ispitana koncentracija hidrolizata od $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ smanjila je vijabilnost stanica za 9 %, dok je najveća ispitana koncentracija hidrolizata od 5 mg mL^{-1} smanjila vijabilnost stanica za čak 26,67 % u odnosu na stanice koje nisu tretirane hidrolizatom. Inhibitorno djelovanje hidrolizata soje na vijabilnost C2C12 stanica koje smo dobili nije u suglasnosti s rezultatima koje su objavili Gupta i sur. (2013) koji su pokazali da hidrolizat soje poboljšava rast različitih staničnih linija i proizvodnju rekombinantnih proteina. Chun i sur. (2007) također su prilikom testiranja učinka hidrolizata soje na CHO stanice pokazali stimulirajuće djelovanje hidrolizata proteina soje na rast stanica. U radu koji su objavili Chang i sur. (2021) ispitano je djelovanje proteinskih hidrolizata iz soje, pšenice i graška na C2C12 stanice i pokazano je kako hidrolizat soje ima najbolje protektivno djelovanje pri induciranom oksidacijskom stresu.

4.2. Učinak deksametazona na vijabilnost C2C12 mišićnih stanica

C2C12 stanice, koje smo nacijepili u ploče s 96 jažica u koncentraciji $2 \times 10^4 \text{ st mL}^{-1}$ tretirane su deksametazonom u rasponu koncentracija $50\text{-}300 \text{ }\mu\text{M}$, te im je nakon 48 sati određena vijabilnost korištenjem MTS metode. Rezultati vijabilnosti su prikazani kao % živih stanica u odnosu na kontrolne, netretirane stanice (Slika 6).

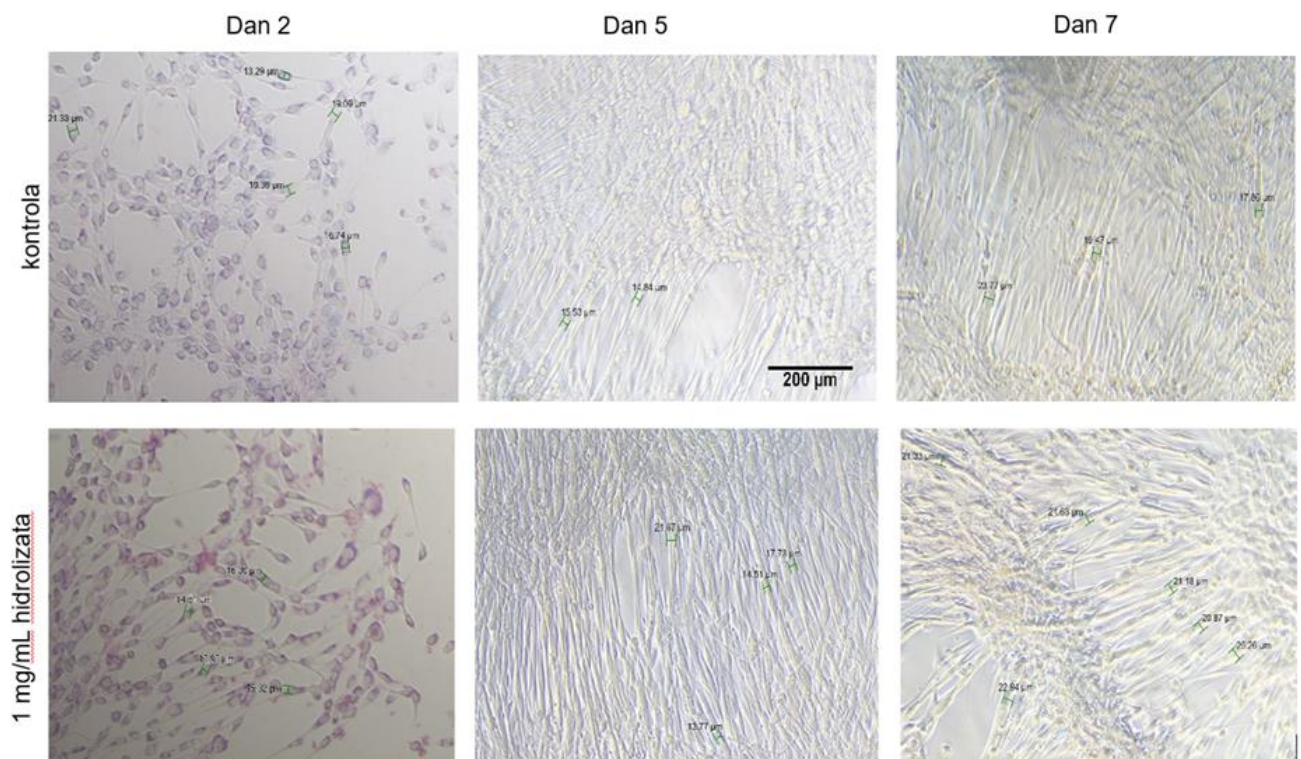


Slika 6. Učinak različitih koncentracija deksametazona na vijabilnost C2C12 stanica. ^astatistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$).

Na temelju dobivenih rezultata možemo uočiti kako koncentracija od 50 μM deksametazona ne pokazuje inhibicijski učinak na vijabilnost stanica dok ostale ispitane koncentracije pokazuju inhibicijski učinak na vijabilnost C2C12 stanica u rasponu 6-10 %. Dobiveni rezultati su djelomično u korelaciji s rezultatima koje su objavili Han i sur. (2017) i koji su utvrdili da koncentracije od 50 i 100 μM deksametazona inhibiraju rast C2C12 stanica. Na temelju dobivenih rezultata odlučeno je da će se u daljnjim eksperimentima koristiti koncentracija deskametazona od 100 μM .

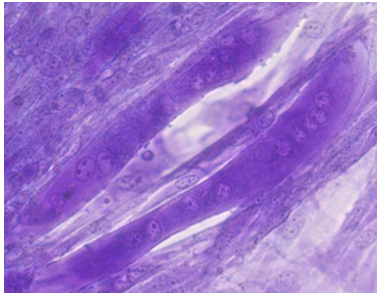
4.3. Učinak hidrolizata soje na diferencijaciju C2C12 stanica

Kako bi se pratio utjecaja dodatka hidrolizata proteina soje na diferencijaciju C2C12 stanica na stvaranje miotuba i morfološke promjene, stanice su tretirane hidrolizatom u koncentraciji od 1 mg mL^{-1} . Tijek provođenja eksperimenta prikazan je na slici 2, a morfološke promjene tijekom diferencijacije praćene su nakon 48, 120 i 168 sati (Slika 7) kao i mjerenje dijametara miotuba uzoraka pomoću programa Digicyte (Slika 8).



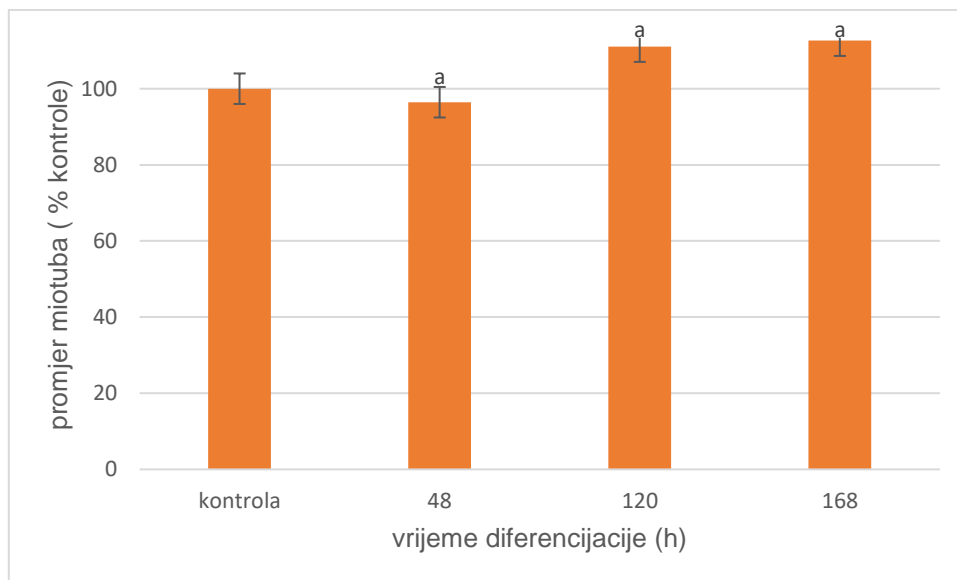
Slika 7. Morfologija kontrolnih C2C12 stanica i stanica tretiranih s 1 mg mL^{-1} hidrolizata proteina soje tijekom 7 dana diferencijacije

Na temelju dobivenih rezultata prikazanih na slici 7. vidljiva je promjena morfologije, odnosno kako se stanice izdužuju i tvore miotube tj. diferencirane višezgrine stanice u kontrolnom (7a) i tretiranom uzorku stanica.



Slika 7a. Prikaz diferenciranog višezgrenog miotuba C2C12 stanica

U istim uzorcima određeni su dijametri formiranih miotuba te su izračunate srednje vrijednosti prikazane kao % u odnosu na kontrolne, netretirane stanice (Slika 8) .



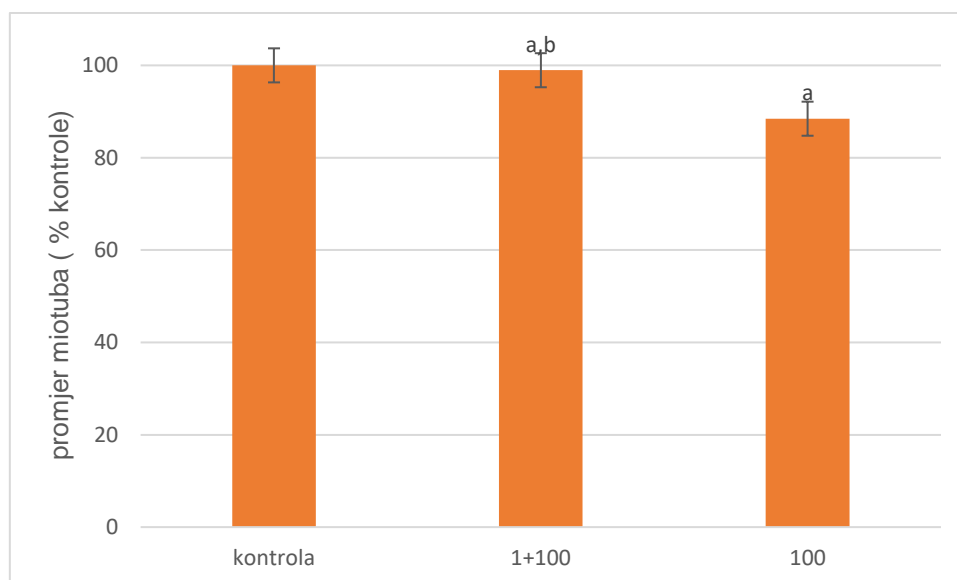
Slika 8. Učinak hidrolizata soje na diferencijaciju C2C12 stanica tijekom vremena. ^astatistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$).

Dobiveni rezultati pokazuju da se dijametar miotuba povećava s vremenom što ukazuje na pozitivno djelovanje hidrolizata proteina soje na samu diferencijaciju C2C12 stanica. Hidrolizat soje u koncentraciji od 1 mg mL^{-1} nakon 168 sati pokazuje da su dijametri miotuba veći za 12 % u odnosu na netretirane stanice u istom proteklom vremenu. Morifuji i sur. (2010) su objavili

da hidrolizati sojinog proteina i proteina sirutke povećavaju koncentracije aminokiselina u plazmi što sugerira da mali peptidi iz hidrolizata bolje opskrbljuju tijelo aminokiselinama te time djeluju i na sintezu proteina u mišićima. Prisustvo razgranatih aminokiseline (leucin, izoleucin i valin), čiji se sadržaj povećava hidrolizom proteina, ključno je za sintezu mišićnih proteina (Chang i sur., 2022; Lee i sur., 2022). Primjena razgranatih aminokiselina povećava ekspresiju MyoD-a u mišićima i potiče diferencijaciju C2C12 stanica u modelu glodavaca (Dong i sur., 2022). Istraživanje koje su proveli Zheng i sur. (2018) o anaboličkoj aktivnosti sojinog ekstrakta i njena tri glavna izoflavona pokazali su da ekstrakt soje pokazuje anaboličku aktivnost u C2C12 miotubama vezanjem na estrogenski receptor i modulacijom ekspresije faktora rasta inzulina (IGF-1) i proteina teškog lanca miozina (MHC). Diferencirane miotube C2C12 stanica pokazuju hipertrofični odgovor na faktore rasta kao što su IGF-1 i estrogen (E2), što se očituje promjenama u promjeru miotuba i aktivacijom sinteze proteina. Zanimljivo je da je u tom istraživanju dokazano da osim ekstrakta soje koji uzrokuje povećanje promjera miotuba i mješavina glavna tri izoflavona sojinog ekstrakta genisteina, daidzeina i gliciteina uzrokovala je značajno povećanje promjera miotuba.

4.4. Učinak hidrolizata soje i deksametazona na diferencijaciju C2C12 stanica

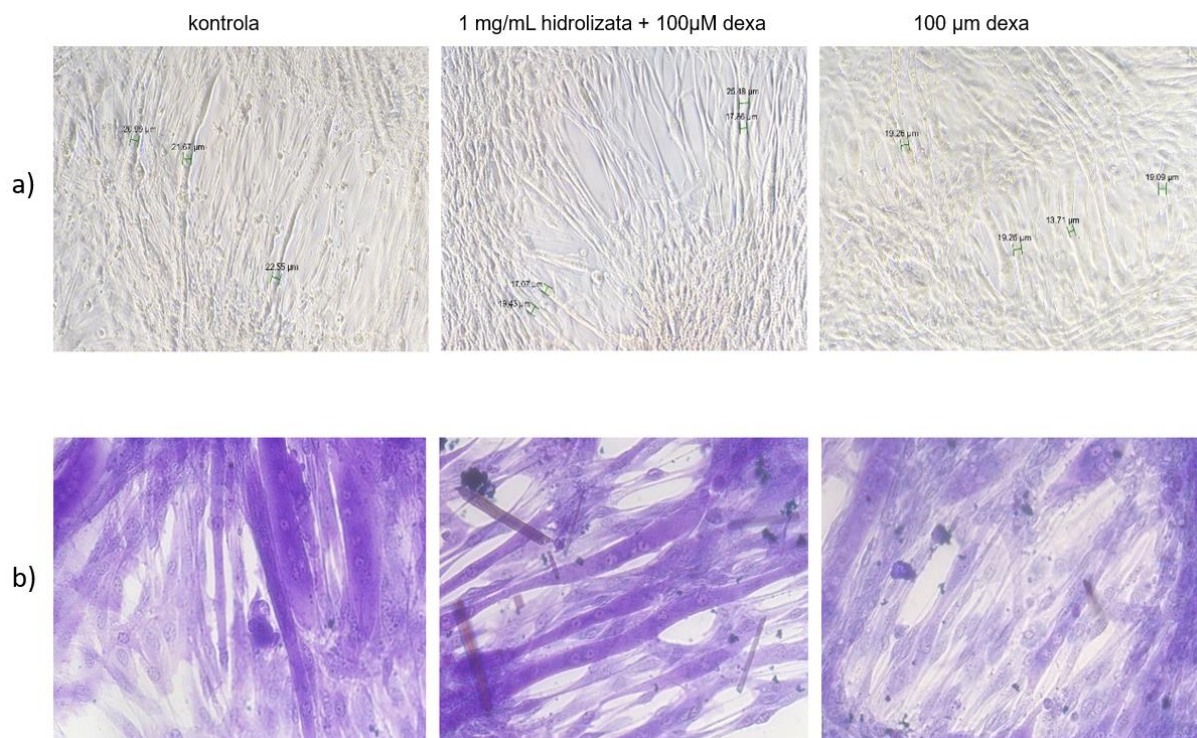
Kako bi se utvrdilo pokazuje li hidrolizat soje protektivni učinak na smanjenje dijametra diferenciranih miotuba, osmog dana diferencijacije, C2C12 stanice su tretirane deksametazonom u koncentraciji 100 μM te kombinacijom 1 mg mL⁻¹ hidrolizata soje i 100 μM deksametazona. Učinci su praćeni mjerenjem promjera miotuba pomoću programa Digicyte, a rezultati su izraženi kao postotci u odnosu na kontrolne stanice (Slika 9).



Slika 9. Utjecaj hidrolizata proteina soje koncentracije 1 mg mL^{-1} i $100 \text{ }\mu\text{M}$ deksametazona te utjecaj $100 \text{ }\mu\text{M}$ deksametazona na diferencijaciju C2C12. ^astatistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). ^bstatistički značajna razlika u odnosu na $100 \text{ }\mu\text{M}$ deksametazona ($p < 0,05$).

Na temelju dobivenih rezultata utvrđeno je kako je stanicama koje su tretirane deksametazonom promjer miotuba smanjen $11,6 \%$ u odnosu na kontrolne stanice. Rezultati ovog eksperimenta u skladu su s dosad objavljenim literaturnim podacima. Deksametazon je sintetski glukokortikoidni spoj koji se koristi kao protuupalni i imunosupresivni lijek. Glukokortikoidi imaju različite i tkivno specifične učinke na stanični metabolizam, i općenito se smatra da induciraju atrofiju skeletnih mišića (Han i sur., 2017). Glukokortikoidi smanjuju sintezu proteina i povećavaju stupanj katabolizma proteina, što dovodi do same atrofije mišića, odnosno miotubi su u tome slučaju tanji i imaju manje promjere. Na grafičkom prikazu također se može uočiti da je dodatak 1 mg mL^{-1} hidrolizata soje u kombinaciji s deksametazonom ublažio učinak smanjenja promjera miotuba koji se gotovo vratio na kontrolne vrijednosti. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima koje su objavili Hwangbo i sur. (2023) kod ispitivanja učinaka hidrolizata proteina dobivenog iz sjemenki konoplje na diferencijaciju C2C12 stanica kao i rezultatima učinka hidrolizata soje na sintezu proteina mišića u C2C12 stanicama (Hou i sur., 2022).

Morfološke promjene tijekom praćenja učinaka hidrolizata soje u kombinaciji s dodatkom $100 \text{ }\mu\text{M}$ deksametazona prikazane su na slici 10 (a i b).



Slika 10. Morfologija netretiranih C2C12 stanica, stanica tretiranih s 1 mg/mL hidrolizata proteina soje i 100 µM deksametazona i stanica tretiranih s 100 µM deksametazona. a) native stanice b) stanice obojane bojom kristal-ljubičasto. (8 dan, 192 sata diferencijacije; vlastite fotografije)

Usporedbom morfologija nativnih i stanica obojanih bojom kristal-ljubičasto jasno se uočavaju jezgre stanica (Slika 10 b). Metoda bojanja kristal-ljubičasto omogućila nam je da vidimo posljedice fuzije mioblasta i nastanak multinuklearnih stanica. Također možemo uočiti i njihov centralni položaj, a što je u skladu s činjenicom da novoformirane miotube karakteriziraju centralno smještene jezgre.

5. ZAKLJUČCI

1. Dodatak hidrolizata proteina soje u rasponu koncentracija $0,5-5 \text{ mg mL}^{-1}$ ima negativno, odnosno inhibirajuće djelovanje na vijabilnost C2C12 stanica.
2. Dodatak deksametazona u koncentracijama $50-100 \text{ }\mu\text{M}$ pokazuje inhibirajuće djelovanje na vijabilnost C2C12 stanica u rasponu $6-10 \%$.
3. Dodatak hidrolizata proteina soje u koncentraciji od 1 mg mL^{-1} povećava promjere miotuba tijekom diferencijacije C2C12 stanica.
4. Dodatak deksametazona u koncentraciji od $100 \text{ }\mu\text{M}$ smanjuje promjere miotuba tijekom diferencijacije C2C12 stanica. Dodatak 1 mg mL^{-1} hidrolizata proteina soje povećava promjer miotuba gotovo do kontrolne vrijednosti te time ukazuje na svoj potencijal protektivnog učinka u atrofiji miotuba C2C12 stanica.

6. POPIS LITERATURE

Arora M. (2013) Cell Culture Media: A Review. *Materials and Methods* **3**,175. <https://dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.175>

Bajek S., Nikolić M., Šoić Vranić T., Bajek M., Marić I. (2015) Mišićne progenitorne stanice u skeletnom mišiću. *Medicina Fluminensis* **51**, 503-510. <https://hrcak.srce.hr/file/218211>

Chang C.Y., Jin J.D., Chang H.L., Huang K.C., Chiang Y.F., Ali M., Hsia S.M. (2021) Antioxidative Activity of Soy, Wheat and Pea Protein Isolates Characterized by Multi-Enzyme Hydrolysis. *Nanomaterials* **11**, 1509. <https://doi.org/10.3390/nano11061509>

Chang YB., Ahn Y., Suh HJ., i sur. (2022) Yeast hydrolysate ameliorates dexamethasone-induced muscle atrophy by suppressing MuRF-1 expression in C2C12 cells and C57BL/6 mice. *Journal of Functional Foods* **90**, 104985. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104985>

Chun BH, Jong-Hwang Kim, Ho-Joung Lee, Namhyun Chung (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**, 1000-1005. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.04.012>

Dong Y, Zhang X, Miao R, Cao W, Wei H, Jiang W, Gao R, Yang Y, Sun H and Qiu J (2022) Branched-chain amino acids promotes the repair of exercise-induced muscle damage via enhancing macrophage polarization. *Frontiers in Physiology* **13**,1037090. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1037090>

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

Gupta AJ, Gruppen H, Maes D, Boots JW, Wierenga PA. (2013) Factors causing compositional changes in soy protein hydrolysates and effects on cell culture functionality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **13**, 10613-10625. Preuzeto s <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24117369/>

Han D.S., Yang W.S., Kao T.W. (2017) Dexamethasone Treatment at the Myoblast Stage Enhanced C2C12 Myocyte Differentiation. *International Journal of Medical Sciences* **14**, 434-443. Preuzeto s <https://www.medsci.org/v14p0434.htm>

Hartshorn, J.N., McNorton, S., Hernandez, C., van der Ent, E., Caple, M.V. (2010) Soy Hydrolysate Optimization for Cell Culture Applications. U: Noll, T. (ured) *Cells and Culture*. ESACT Proceedings, vol **4**. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3419-9_135

Hou Y, Yoon Y, Oh E, Sung B, Kim Y (2022) Effects of soy protein hydrolysates on antioxidant activity and inhibition of muscle loss. *International Food Research Journal* **29**, 1458-1467. <https://doi.org/10.47836/ifrj.29.6.22>

Hou Y,Wu Z, Dai Z I sur. (2017) Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **8**, 24. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0153-9>

Ho, Y.Y., Lu, H.K., Lim, Z.F.S. i sur. (2021) Applications and analysis of hydrolysates in animal cell culture. *Bioresources and Bioprocessing*. **8**, 93. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00443-w>

Hwangbo Y, Kim J, Kim T i sur. (2023) Effects of Hemp Seed Protein Hydrolysates on the Differentiation of C2C12 Cells and Muscle Atrophy. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* **52**, 1225-1232 <https://doi.org/10.3746/jkfn.2023.52.12.1225>

Lee D.Y., Lee S.Y., Yun S.H., Jeong J.W., Kim J.H., Kim H.W. i sur. (2022) Review of the Current Research on Fetal Bovine Serum and the Development of Cultured Meat. *Food Science of Animal Resources* **42**, 775-799. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2022.e46>

Morifuji M, Ishizaka M, Baba S, Fukuda K, Matsumoto H, Koga J, Kanegae M, Higuchi M (2010) Comparison of different sources and degrees of hydrolysis of dietary protein: effect on plasma amino acids, dipeptides, and insulin responses in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **11**, 8788-8797. <https://doi.org/10.1021/jf101912n>

Paul G, Mendelson G J (2015) Evidence supports the use of soy protein to promote cardiometabolic health and muscle development. *Journal of American College of Nutrition* **34**: 56-59. <https://doi.org/10.1080/07315724.2015.1080531>

Radošević K. (2020) Kulture životinjskih stanica. *Kemija u industriji* **69** (9-10), 561-562. <https://hrcak.srce.hr/244366>

Schmidt M, Schüler SC, Hüttner SS, von Eyss B, von Maltzahn J (2019) Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. *Cellular and Molecular Life Sciences* **76**:2559–2570. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03093-6>

Skaramuca, I. (2018) Primarna kultura perifernih mononuklearnih stanica miša soja C57BL/6N (Završni rad), Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

Chelladurai KS, Selvan Christyraj J, Rajagopalan K i sur. (2021) Alternative to FBS in animal cell culture - An overview and future perspective. *Heliyon* **7**. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07686>

Tanaka EM i Reddien, PW (2011) The cellular basis for animal regeneration. *Developmental cell* **21**, 172-185.

Thermo Fisher Scientific (2020) Cell culture basics handbook

Wiji Prasetyaningrum P, Puji Septisetyani E, Suyoko A I sur. (2021) Recloning and Characterization of C2C12 Myoblast and Its Clonal Derivatives. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention* **12**. <http://dx.doi.org/10.14499/indonesianjancanchemoprev12iss2pp99-105>

Zhang Y.; Tu, D.; Shen, Q.; Dai, Z. (2019) Fish Scale Valorization by Hydrothermal Pretreatment Followed by Enzymatic Hydrolysis for Gelatin Hydrolysate Production. *Molecules*, **24**, 2998. <https://doi.org/10.3390/molecules24162998>

Zheng W, Hemker ML, Xie M, Soukup ST, Diel P (2018) Anabolic Activity of Soy Extract and Three Major Isoflavones in C2C12 Myotubes. *Planta Med* **84**, 1022-1029. <https://doi.org/10.1055/a-0598-4812>

Izjava o izvornosti

Ja Dajana Mijačević 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.

Dajana Mijačević

Vlastoručni potpis