



Univerzitet u Novom Sadu
Medicinski fakultet
Centar za medicinsko-farmaceutska istraživanja i kontrolu
kvaliteta (CEMFIK)
Hajduk Veljkova 3, 21 000 Novi Sad
021/422-760
cemphic@mf.uns.ac.rs



IZVEŠTAJ O ISTRAŽIVANJU

Bp: 3-2-18/1

MEDICINSKI FAKULTET U NOVOM SADU
Broj 01-2400
13.07.2018. 20 god
Novi Sad

Datum: 12. 07. 2018.

Predmet istraživanja: *In vitro* određivanje neuromodulatornog potencijala preparata Karnozin EXTRA

Naručilac istraživanja: „CarnoMed“ D.O.O., Novi Sad

Obim ispitivanja: eksperimentalna studija

Podaci o ispitivanom uzorku: uzorak suplementa za ispitivanje dostavio naručilac

Prilozi:

1. Izveštaj o istraživanju
2. Rezultati istraživanja
3. Materijal i metode korišćene u istraživanju

Dostaviti: 1. Naručiocu istraživanja

2. Arhivi

Prof. dr Snežana Brkić

Dekan

Medicinski fakultet Novi Sad



Prof. dr Biljana Božin

Direktor CEMFIK-a

Medicinski fakultet Novi Sad

Rezultati istraživanja se odnose isključivo na prikazano istraživanje.

Ovaj dokument se ne sme reprodukovati bez odobrenja Sektora za naučnoistraživački razvoj CEMFIK-a

Prilog 1:

Izveštaj o istraživanju

Br.: 3-2-18/1

12. 07. 2018.

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja, sprovedenog u *in vitro* uslovima, na kontinuiranoj ćelijskoj liniji MNA C1300 klon NA, subklon N2A, poreklom iz mišjeg neuroblastoma možemo zaključiti da pri aplikaciji rastućih koncentracija (2mM, 5mM, 10mM) rastvora kapsule Karnozin EXTRA (Carnomed) dolazi do **povećanja proliferativne aktivnosti** ispitivane ćelijske linije.

Kvalitativna analiza citoplazmatske imunopozitivnosti neuroblasta na intermedijerni neuron specifični filament – nestin, uočava se povećana ekspresija pomenutog markera pri aplikaciji rastućih koncentracija (2mM, 5mM, 10mM) rastvora kapsule Karnozin EXTRA (Carnomed). Ovakav nalaz ukazuje na **pozitivni trofički potencijal preparata Karnozin EXTRA (Carnomed) na neuroblastne ćelije u *in vitro* uslovima.**

Ispitivanje izvršio:

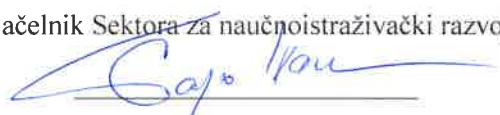
Asist dr Milan Popović



Rezultate odobrio:

Doc. dr Ivan Čapo

Načelnik Sektora za naučnoistraživački razvoj



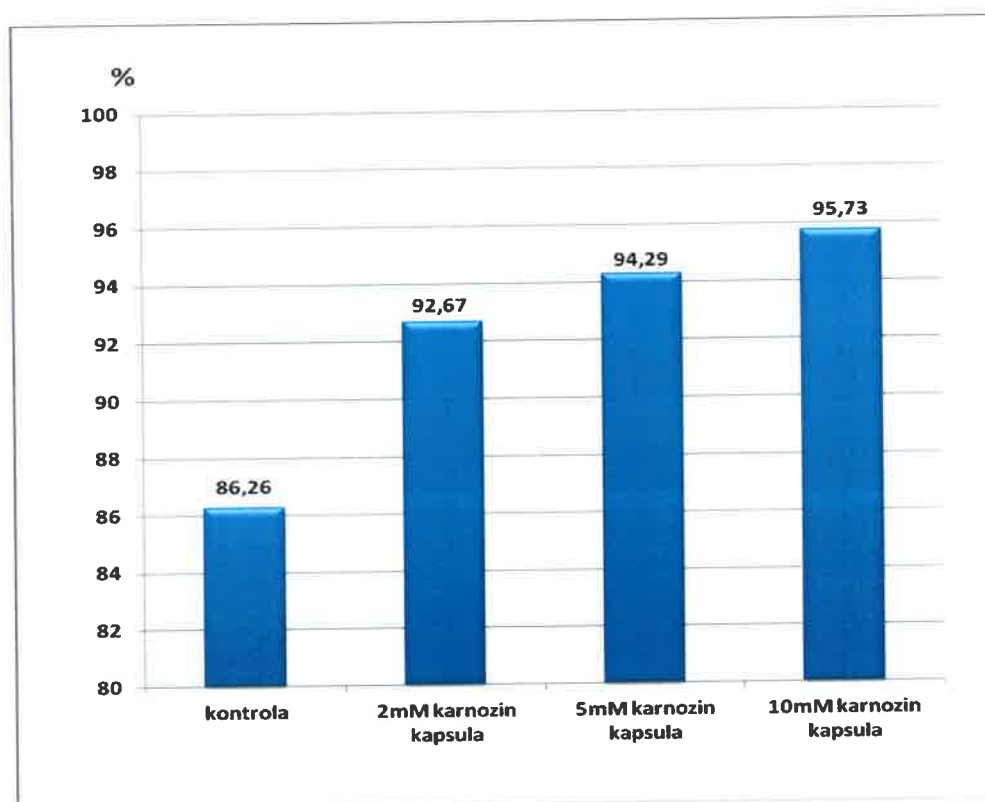
Rezultati istraživanja se odnose isključivo na prikazano istraživanje.

Ovaj dokument se ne sme reprodukovati bez odobrenja Sektora za naučnoistraživački razvoj CEMFIK-a

Prilog 2:

Rezultati istraživanja

Imunofluorescentnim bojenjem pomoću Ki67 antitela na kontinuiranoj ćelijskoj liniji MNA C1300 klon NA, subklon N2A, poreklom iz mišjeg neuroblastoma, u grupama kontrola, E1, E2 i E3 izračunat je proliferativni indeks. Srednje vrednosti Ki67 proliferativnog indeksa za kontrolnu grupu iznose 86,26%, za grupu E1 iznose 92,67%, za grupu E2 iznose 94,29% i za grupu E3 iznose 95,73% (Grafikon 1).

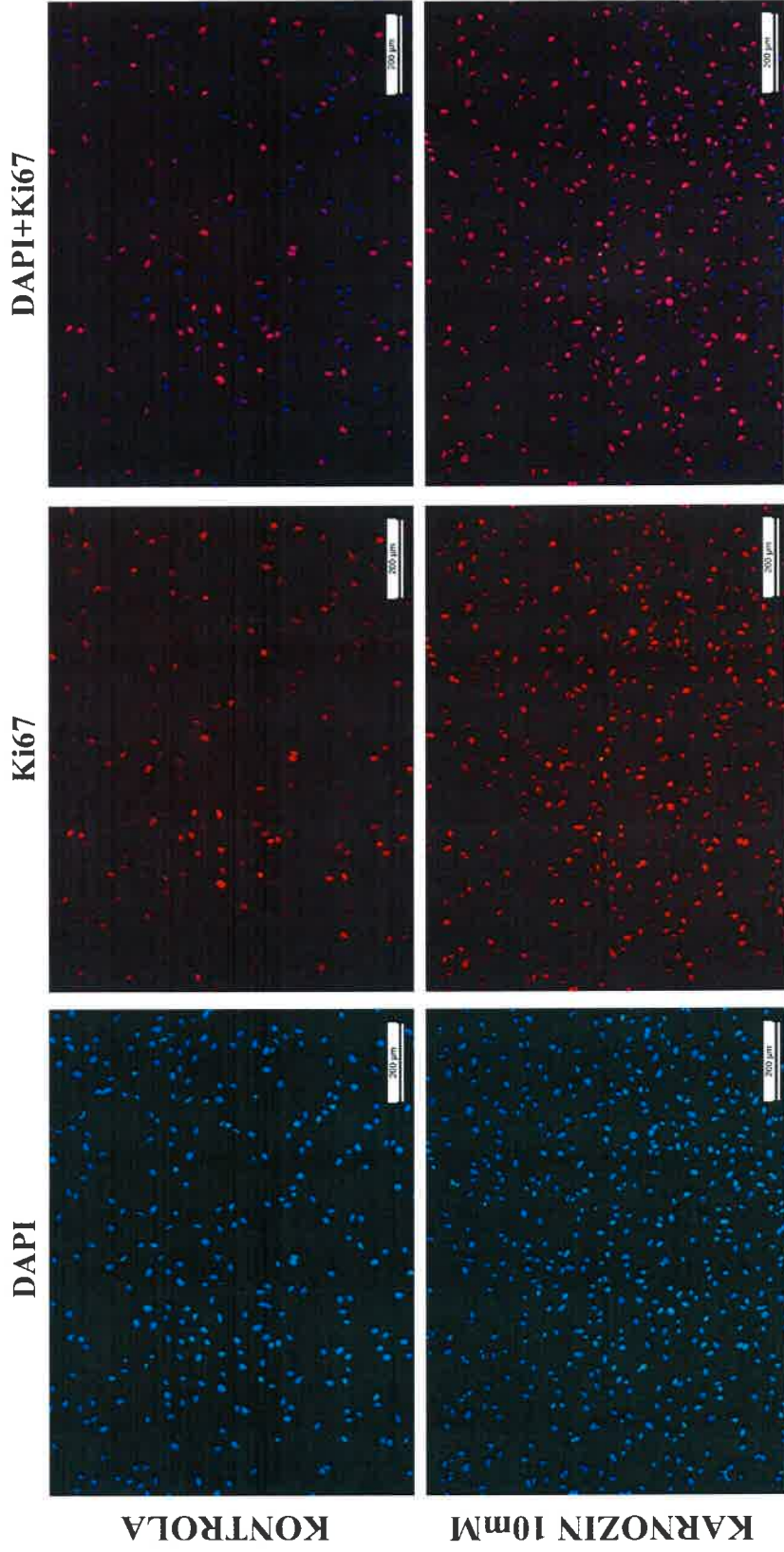


Grafikon 1. Srednje vrednosti Ki67 proliferativnog indeksa po grupama

Kvalitativnom i kvantitativnom analizom imunofluorescentnih slika bojenih na Ki67 antitelo možemo uočiti da se sa rastom koncentracije rastvora kapsule Karnozin EXTRA povećava i Ki67 proliferativni indeks tj. da je kod najveće koncentracije od 10mM prisutan veći broj ćelija koje su u proliferativnoj fazi (Slika 1).

Rezultati istraživanja se odnose isključivo na prikazano istraživanje.

Ovaj dokument se ne sme reprodukovati bez odobrenja Sektora za naučnoistraživački razvoj CEMFIK-a



Slika 1. Kontinuirana ćelijska linija MNA C1300 klon NA, subklon N2A, poreklom iz mišjeg neuroblastoma-kontrolna i E3 grupa; Ki67 ICC/IF; 100x

Rezultati istraživanja se odnose isključivo na prikazano istraživanje.

Ovaj dokument se ne sme reprodukovati bez odobrenja Sektora za naučnoistraživački razvoj CEMFIK-a



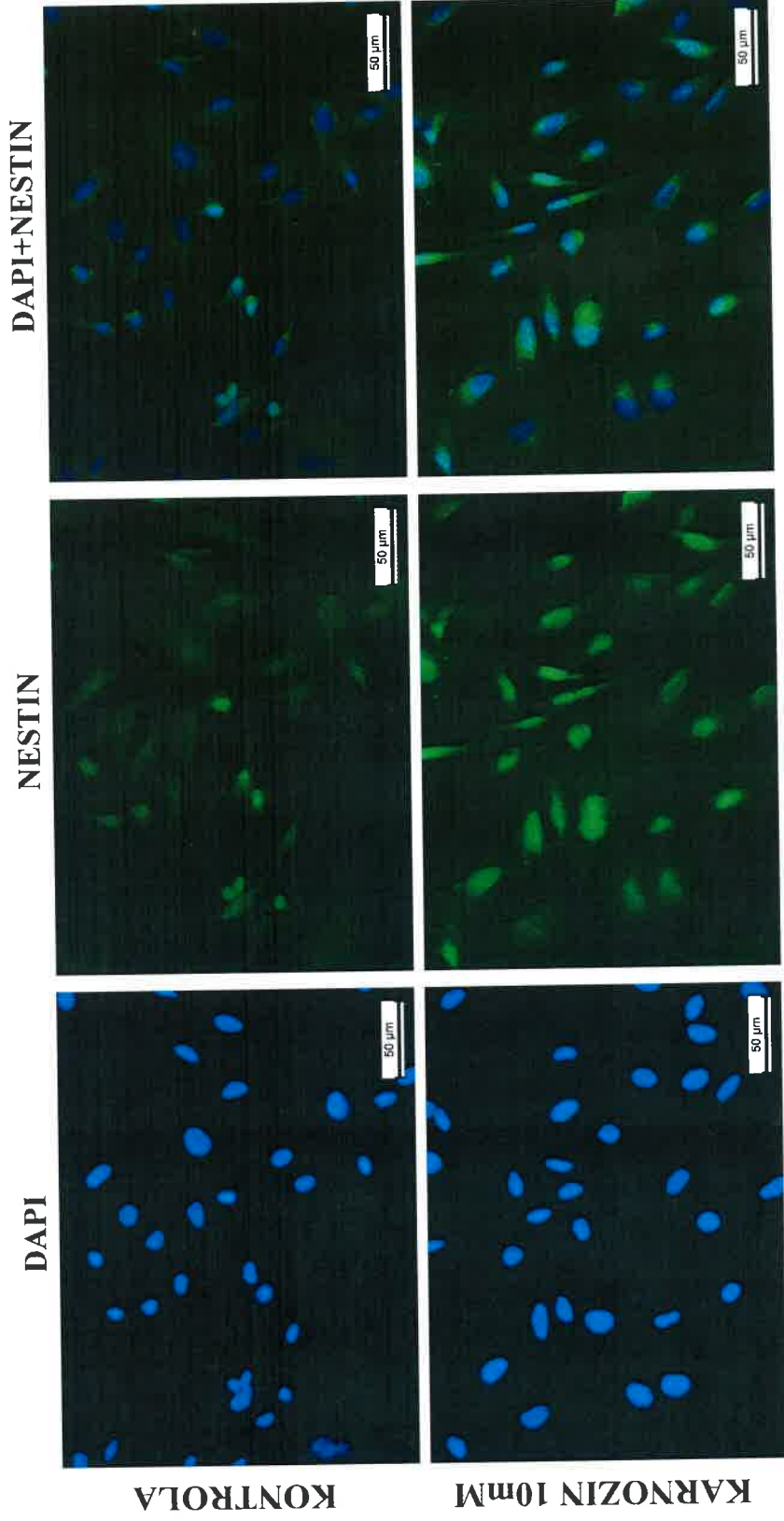
Univerzitet u Novom Sadu
Medicinski fakultet
Centar za medicinsko-farmaceutska istraživanja i kontrolu
kvaliteta (CEMFIK)
Hajduk Veljkova 3, 21 000 Novi Sad
021/422-760
cemphic@mf.uns.ac.rs



Kvalitativnom analizom preparata kontinuirane ćelijske linije MNA C1300 bojenih na nestin, može se uočiti jača citoplazmatska imunopozitivnost interemedijarnog filameta nestina kod grupe E3 u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 2).

Rezultati istraživanja se odnose isključivo na prikazano istraživanje.

Ovaj dokument se ne sme reprodukovati bez odobrenja Sektora za naučnoistraživački razvoj CEMFIK-a



Slika 2. Kontinuirana ćelijska linija MNA C1300 klon NA, subklon N2A, poreklom iz mišjeg neuroblastoma -kontrolna i E3 grupa; nestin ICC/IF; 400x

Rezultati istraživanja se odnose isključivo na prikazano istraživanje.

Ovaj dokument se ne sme reprodukovati bez odobrenja Sektora za naučnoistraživački razvoj CEMFIK-a

Prilog 3:

Materijal i metode korišćene u istraživanju

Istraživanje je sprovedeno na kontinuiranoj ćelijskoj liniji MNA C1300 klon NA, subklon N2A, poreklom iz mišjeg neuroblastoma. Eksperiment se sastojao iz 4 grupe i to: jedne kontrolne i tri eksperimentalne. Svaka grupa je rađena u triplikatu. U svim grupama ćelije su rasle zalepljene za podlogu u medijumu DMEM sa 4,5 g/l glukoze (DMEM HA, Capricorn Scientific), uz dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, Capricorn Scientific) i 2 mM glutamina.

Sadržaj iz kapsule Karnozin EXTRA (Carnomed) je pripremljen prema sledećem protokolu: sadržaj je rastvoren u 1500 μ l PBS-a, vorteksovan i centrifugiran na 3 000 rpm, na 22 °C, u trajanju od 5 minuta. Alikvotirano je 11,94 μ l supernatanta (2 mM), odnosno 29,85 μ l (5 mM), odnosno 59,74 μ l (10 mM) i dopunjeno do 200 μ l PBS-om.

Uzorci ćelijske linije su zasejani u 12 Petrijevih šolja, prečnika 35 mm, sa pokrovnicom za potrebe naknadnog imunofluorescentnog bojenja, u koncentraciji od 200 000 ćelija u 2 ml DMEM medijuma (sa 10% FBS i 2 mM glutaminom). Kontrolnoj grupi ćelija, u medijum, je dodato 200 μ l fosfatnog pufera (PBS). Ćelijama iz prve eksperimentalne grupe (grupa E1) dodato je po 200 μ l rasvora kapsule u koncentraciji od 2mM, ćelijama u drugoj eksperimentalnoj grupi (grupa E2) 200 μ l rasvora kapsule u koncentraciji od 5mM, dok je trećoj eksperimentalnoj grupi (grupa E3) dodato 200 μ l rasvora kapsule u koncentraciji od 10mM. Ćelijska linija je održavana tokom 24h u inkubatoru na 37 °C, u atmosferi sa 100% vlažnosti i 5% CO₂, nakon čega je pokrovnica bojena imunofluorescentnim bojenjem antitelima Ki67 (Thermo Scientific, RB-9043-P0) i nestin (Abcam, ab176571).

Imunoflorescentna tehnika bojenja ćelijske kulture (ICC/IF)

Nakon 24h, Petrijeve šolje sa zasejanim ćelijama su izvađene iz inkubatora. Medijum za rast ćelija je odliven i ćelije su isprane tri puta u PBS-u. Potom su fiksirane u 4% paraformaldehidu rastvorenom u PBS-u u trajanju od 10 minuta. Nakon fiksacije i ispiranja sa PBS-om,

Rezultati istraživanja se odnose isključivo na prikazano istraživanje.

Ovaj dokument se ne sme reprodukovati bez odobrenja Sektora za naučnoistraživački razvoj CEMFIK-a

permeabilizacija ćelija je izvršena uz pomoć 0,3% Triton X-100 (Alfa Aesar, A16046) u trajanju od 5 minuta.

Pokrovnice su zatim prebačene u vlažnu komoru i tretirane 10% normalnim kozijim serumom rastvorenim u 1% BSA radi blokiranja nespecifičnog bojenja, u trajanju od 30 minuta na 25 °C. Potom su na pokrovnice aplikovana primarna antitela Ki67 (Thermo Scientific, RB-9043-P0) u razblaženju 1:300 i nestin (Abcam, ab176571) u razblaženju 1:100. Primarna antitela su inkubirana na temperaturi od 25 °C u periodu od 60 minuta. Sekundarna antitela Alexa Fluor 555 (Abcam, ab150078) i Alexa Fluor 488 (Abcam, ab150077), aplikovana su u mračnoj komori, u period od 30 minuta, na temperaturi 25 °C. Pokrovnice su montirane na predmetno staklo uz pomoć DAPI medijuma (Abcam, ab104139).

Obrada mikrofotografija i statistika

Mikrofotografije sve četiri grupe su detaljno analizirane na imunofluorescentnom mikroskopu marke Leica DMLB 100T i fotografisani kamerom marke Leica MC 190 HD. Na svakoj pokrovnici je uslikano nasumično odabranih 10 vidnih polja na uveličanjima 100x i 400x. Mikrofotografije pokrovnica tretirane Ki67 antitelom su obrađene kvalitativno i kvantitativno dok su mikrofotografije pokrovnica tretirane nestin antitelom obrađene samo kvalitativno. Rezultati dobijeni imunofluorescentnim bojenjem su prikazani grafički uz odogovarajuću deskriptivnu statistiku.

Ki67 proliferativni indeks

Obrada imunofluorescentnih mikrofotografija izvršena je u kompjuterskom program *Fiji* u kome su uz pomoć *Plugin-a Cell Counter* izbrojana DAPI i Ki67 pozitivna jedra ćelija. Ki67 proliferativni indeks je izračunat uz pomoć formule:

$$\text{Ki67 proliferativni indeks} = \frac{\text{Ki67 pozitivna jedra}}{\text{DAPI pozitivna jedra}} \times 100 (\%)$$

Rezultati istraživanja se odnose isključivo na prikazano istraživanje.

Ovaj dokument se ne sme reprodukovati bez odobrenja Sektora za naučnoistraživački razvoj CEMFIK-a