



INSTITUT ZA MOLEKULARNU GENETIKU
I GENETIČKO INŽENJERSTVO
Univerzitet u Beogradu

Vojvode Stepe 444a | 11042 Beograd | Republika Srbija
Tel. (011) 397 57 44 | Faks (011) 397 58 08 | t.r. 160-350089-28 | PIB 101736673

IZVEŠTAJ

Projektne usluge realizovane po zahtevu preduzeća **Baltik Junior d.o.o., Vučićev prolaz 20a, 11000 Beograd-Zvezdara**, u okviru programa inovacionih vaučera Fonda za inovacionu delatnost Republike Srbije pod nazivom:

“Testiranje anti-inflamatornog i antioksidativnog efekta Ulja divljeg origana u *in vitro* model sistemu”

Poručalac projektne usluge i podnosilac izveštaja: **Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Vojvode Stepe 444a, 11042 Beograd, Matični broj: 7093977; PIB: 105897760; Tekući račun: 160-350089-28**

Primalac izveštaja: **Baltik Junior d.o.o., Vučićev prolaz 20a, 11000 Beograd-Zvezdara, Matični broj: 20482036; PIB: 105897760;**



INSTITUT ZA MOLEKULARNU GENETIKU
I GENETIČKO INŽENJERSTVO
Univerzitet u Beogradu

Vojvode Stepe 444a | 11042 Beograd | Republika Srbija
Tel. (011) 397 57 44 | Faks (011) 397 58 08 | t.r. 160-350089-28 | PIB 101736673

Ciljevi projektne usluge i primenjena metodologija

Origano je aromatična biljka široko rasprostranjena na Mediteranu i u Aziji. Ulje origana sadrži koncentrisane prirodne biljne produkte kojima se pripisuju brojne biološke aktivnosti kao i povoljno dejstvo na ljudsko zdravlje kod različitih infekcija i oslabljenog imunskog sistema. Novije studije su pokazale da osnovne komponente kojima se pripisuje anti-bakterijska, anti-inflamatorna i antioksidativna aktivnost jesu karvakrol i timol. Na našem tržištu postoje različiti proizvođači esencijalnog ulja origana, a njihov efekat će zavistiti od sadržaja supstanci koje su odgovorne za pomenute biološke aktivnosti i povoljno dejstvo na ljudsko zdravlje. S'toga cilj ovog istraživanja jeste da **ispita anti-inflamatorni i antioksidativni efekat ulja divljeg origana (UDO) *Origanum minutiflorum* brenda Probotanic (preduzeća Baltik Junior doo.)** na nivou ekspresije proinflamatornih gena i merenjem nivoa unutarćelijskog oksidativnog stresa korišćenjem *in vitro* model sistema.

Esencijalno ulje divljeg origana (Probotanic) je najpre potpuno rastvoreno u dimetil sulfoksidu (DMSO) kako bi moglo da bude korišćeno za tretman ćelija i kao takvo je korišćeno u svim eksperimentima. Ispitivanja anti-inflamatornog i antioksidativnog efekta UDO su vršena na normalnim humanim bronhijalnim epitelijalnim ćelijama, BEAS-2B ćelijskoj liniji. Najpre je ispitana citotoksičnost različitih koncentracija UDO na ćelijama i određena je necitotoksična doza koja je primenjivana u svim eksperimentima. Optimizovani su uslovi za ispitivanje anti-inflamatornog dejstva UDO na BEAS-2B ćelijama, u kojima je inflamacija stimulirana lipopolisaharidom (LPS), merenjem ekspresije gena proinflamatornih citokina, interleukina (IL) 1b, IL 6, IL 8, faktora tumorske nekroze (TNF) i monocit hemoatraktant proteina (MCP) 1, RT-PCR (real-time PCR) metodom. Optimizovani su uslovi za analizu antioksidativnog dejstva UDO na ćelijama, nakon stimulacije oksidativnog stresa vodonik peroksidom (H_2O_2), merenjem fluorescencije dihlorodihidrofluorescin diacetatom (DCF-DA). Dobijeni rezultati su prikazani grafički i u tabeli.

1. Gajenje BEAS-2B ćelija

BEAS-2B ćelije (ATCC® CRL-9609™) su gajene u kompletnom medijumu koji se sastoji od RPMI 1640 medijuma (Sigma), 10% seruma (Gibco), 100 U/ml penicilin i 100 µg/ml streptomycin (Gibco) i inkubirane na 37°C u 5% CO₂. Ćelije su pasažirane sa 0,025% tripsinom (Gibco) pri konfluentnosti od <95%. U svim eksperimentima su korišćene ćelije koje su bile 60-80% konfluentne.

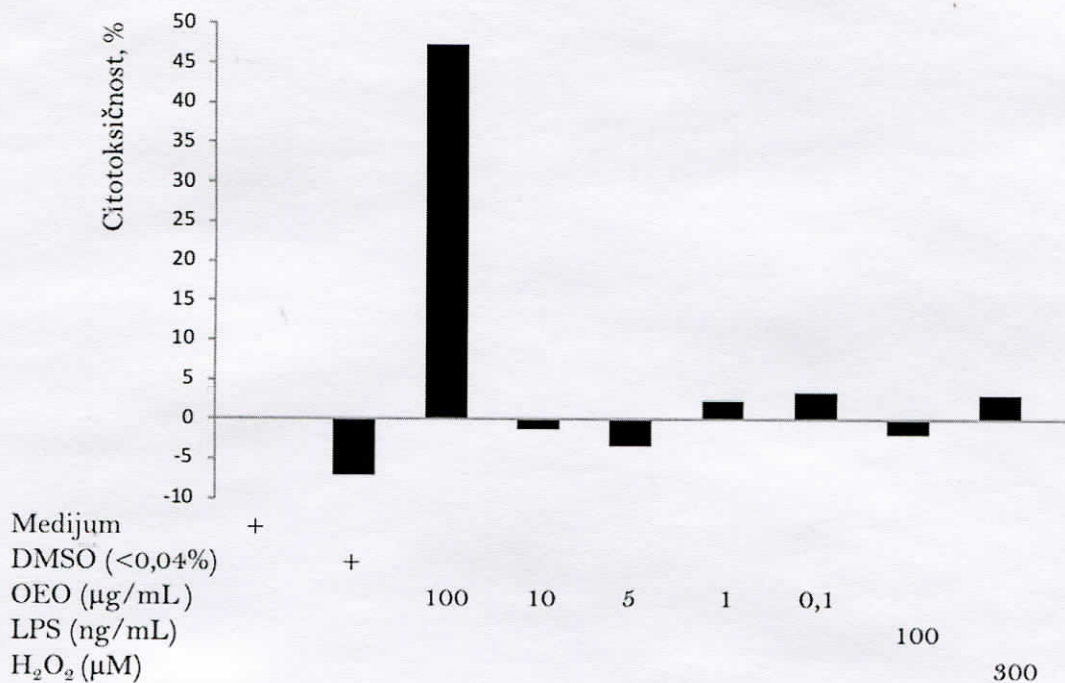


2. Određivanje citotoksičnosti Probotanic ulja divljeg origana (UDO) merenjem oslobađanja laktat dehidrogenaze (LDH)

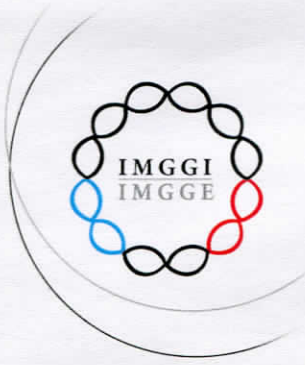
UDO (Probotanic) je najpre potpuno rastvoreno u DMSO i kao takvo je korišćeno u svim eksperimentima. Kao negativna kontrola tretmana sa UDO korišćen je <0,04% DMSO.

2×10^4 BEAS-2B ćelija je zasađeno jedan dan pre eksperimenta. Ćelije su tretirane sa 100-0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ UDO i 100ng/mL LPS-a (Sigma) 24h, i sa 300 μM vodonik peroksidom (H_2O_2) (Merck) 3h u triplicatu. Nakon toga medijum je sakupljen za merenje aktivnosti LDH. Aktivnost LDH je merena CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay Kit-om (Invitrogen) prema uputstvu proizvođača na "plate reader"-u (Infinite Multimode Reader Tecan).

Zaključak: UDO pri koncentraciji od 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ je bilo citotoksično, dok manje koncentracije od 10-0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nisu bile citotoksične (<5%). Rezultati su prikazani na Slici 1. U daljim ispitivanjima korišćena je doza od 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ UDO. Primenjene koncentracije LPS-a i H_2O_2 nisu bile citotoksične (Slika 1).



Slika 1. Citotoksičnost UDO, LPS-a i H_2O_2 na BEAS-2B ćelijama.



INSTITUT ZA MOLEKULARNU GENETIKU
I GENETIČKO INŽENJERSTVO
Univerzitet u Beogradu

Vojvode Stepe 444a | 11042 Beograd | Republika Srbija
Tel. (011) 397 57 44 | Faks (011) 397 58 08 | t.r. 160-350089-28 | PIB 101736673

3. Ispitivanje anti-inflamatornog efekta Probotanic UDO na BEAS-2B ćelijama stimulisanim LPS-om RT-PCR metodom

3.1 Tretiranje ćelija UDO i izolovanje RNK

2×10^5 BEAS-2B ćelija je zasađeno jedan dan pre eksperimenta. Sutradan ćelije su pretretirane sa 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ UDO 40 minuta, a zatim je u medijum dodato 100 ng/mL LPS-a ili ćelije su pretretirane sa DMSO-om i stimulisane sa 100 ng/mL LPS-a (kontrola). Nakon 24h ćelije su lizirane i izolovana je RNK korišćenjem Rneasy Mini Kit-a (Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Prinos i kvalitet izolovane RNK su mereni na NANOVUE aparatu (GEHealthcare). Eksperiment je ponovljen tri puta nezavisno.

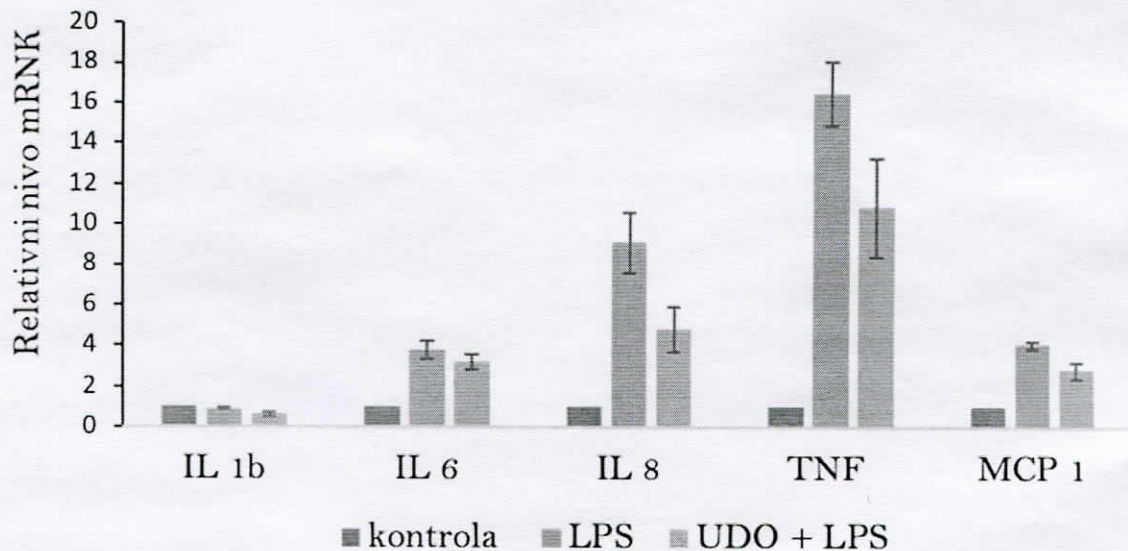
3.2 Sinteza cDNA

Izolovana RNK je korišćena za sintezu cDNK korišćenjem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-a (ThermoFisher) prema uputstvu proizvođača.

3.3 Kvantitativni RT-PCR

Nivo ekspresije proinflamatornih citokina je određen kvantitativnim RT-PCR-om korišćenjem sintetisane cDNK. Ekspresije gena IL 1, IL 6, IL 8, TNF i MCP 1, kao i GAPDH korišćenog kao endogena kontrola, u BEAS-2B ćelijama pretretiranim UDO i indukovanim LPS-om, merena je TaqMan esejima (ThermoFisher) prema uputstvu proizvođača na Real Time PCR System 7500 aparatu (Applied Biosystems). Relativna ekspresija gena je kvantifikovana $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ metodom. Svaki eksperiment je analiziran u triplikatu.

Zaključak: Tretman BEAS-2B ćelija sa LPS-om je doveo do povećanja ekspresije gena svih praćenih proinflamatornih citokina osim IL 1b gde je uočeno blago smanjenje (Slika 2) (Tabela 1). Pretretman ćelija sa UDO doveo je do smanjenja efekta stimulacije inflamacije LPS-om praćenog smanjenjem ekspresije svih analiziranih proinflamatornih citokina u poređenju sa kontrolom, tj. tretmanom sa DMSO-om i LPS-om. **Probotanic UDO dovodi do smanjenja ekspresije proinflamatornih citokina, IL 1b, IL 6, IL 8, TNF i MCP 1 u BEAS-2B ćelijama u kojima je inflamacija indukovana LPS-om.** Rezultati su prikazani na Slici 2 i u Tabeli 1.



Slika 2. Relativna ekspresija gena proinflamatornih citokina u BEAS-2B ćelijama tretiranim UDO i stimulisanim LPS-om.

Tabela 1. Relativni nivo ekspresije mRNA gena proinflamatornih citokina u BEAS-2B ćelijama tretiranim UDO i stimulisanim LPS-om.

	IL 1b	IL 6	IL 8	TNF	MCP 1
kontrola	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
LPS	0,90±0,35	3,81±0,41	9,10±1,48	16,51±1,63	4,08±0,17
UDO + LPS	0,64±0,09	3,22±0,39	4,82±1,08	10,87±2,45	2,82±0,40

4. Ispitivanje antioksidativnog efekta Probotanic UDO na BEAS-2B ćelijama stimulisanim H₂O₂ merenjem fluorescencije DCF-DA

DCF-DA je supstanca koja je podložna oksidaciji što je praćeno emisijom fluorescencije koja se može meriti, tako da porast fluorescencije odražava povećani nivo oksidativnog stresa u ćeliji. 2x10⁴ BEAS-2B ćelija je zasađeno dan pre eksperimenta. Sutradan ćelije su tretirane sa 10 µg/ml UDO ili sa DMSO-om (kontrola)

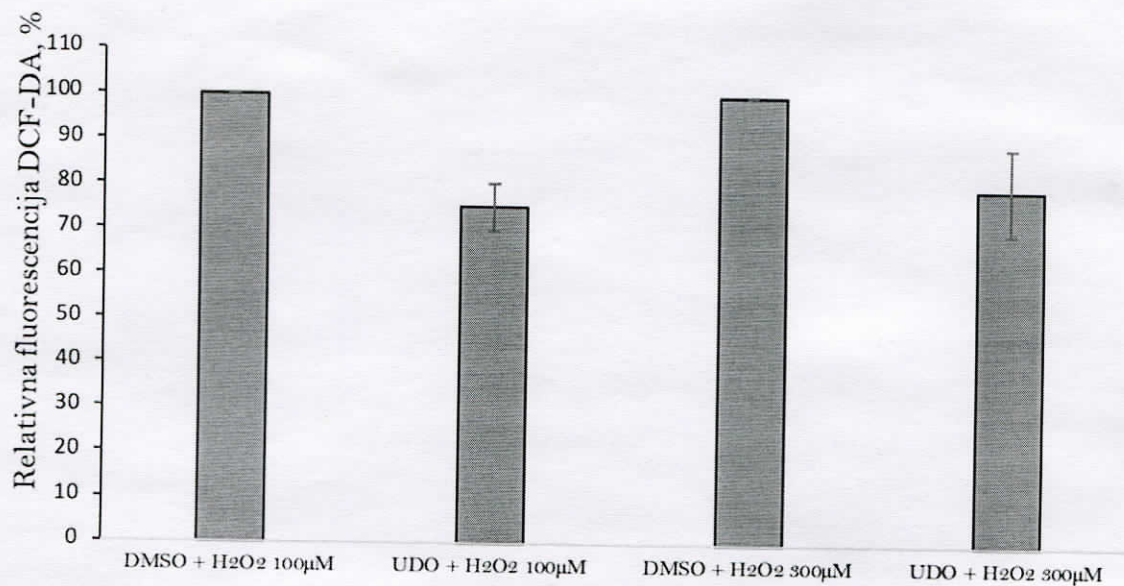


INSTITUT ZA MOLEKULARNU GENETIKU
I GENETIČKO INŽENJERSTVO
Univerzitet u Beogradu

Vojvode Stepe 444a | 11042 Beograd | Republika Srbija
Tel. (011) 397 57 44 | Faks (011) 397 58 08 | t.r. 160-350089-28 | PIB 101736673

24h. Nakon toga medijum je uklonjen i na ćelije je dodat 10 μM DCF-DA (Sigma) i inkubiran 30-40 minuta na 37°C. Ćelije su zatim oprane PBS-om (fosfatni pufer), i tretirane sa 100 ili 300 μM H_2O_2 kako bi došlo do indukcije oksidativnog stresa. Odmah zatim vršeno je merenje fluorescencije DCF-DA emisijom na 530 nm i ekscitacijom na 485 nm u trajanju od 3 sata na svakih 5 minuta na "plate reader"-u (Infinite Multimode Reader Tecan). Rezultati su obrađeni tako što je za svaki ciklus merenja računata srednja vrednost, a zatim su sve srednje vrednosti 36 ciklusa merenja sumirane. Fluorescencija je izračunata oduzimanjem vrednosti blanka, negativne kontrole, od vrednosti dobijenih za tretman UDO i kontrolu. Rezultati relativne fluorescencije DCF-DA u BEAS-2B ćelijama pretretiranim sa UDO i stimulisanim H_2O_2 su prikazani relativno u odnosu na kontrolu (pretretman sa DMSO i stimulacija sa H_2O_2). Eksperiment je ponovljen dva puta nezavisno u kvadriplikatu.

Zaključak: Nivo oksidacije DCF-DA koji je izmeren očitavanjem fluorescencije u BEAS-2B ćelijama pretretiranim sa UDO i stimulisanim H_2O_2 bio je niži u odnosu na kontrolne uzorke koji su bili tretirani sa DMSO-om i H_2O_2 . Nivo oksidativnog stresa u ćelijama koje su tretirane sa 100 μM H_2O_2 bio je niži za oko 25%, a u tretiranim sa 300 μM H_2O_2 oko 20% u odnosu na kontrole. **Pretretman ćelija sa Probotanic UDO je doveo do smanjenja unutarćelijskog oksidativnog stresa izazvanog vodonik peroksidom.** Rezultati su prikazani na Slici 3 i u Tabeli 2.



Slika 3. Relativna fluorescencija DCF-DA u BEAS-2B ćelijama tretiranim UDO nakon stimulacije oksidativnog stresa sa H₂O₂ prikazana u odnosu na kontrolu (DMSO i H₂O₂).

Tabela 2. Relativni fluorescencija DCF-DA u BEAS-2B ćelijama pretretiranim UDO ili DMSO-om nakon stimulacije oksidativnog stresa sa H₂O₂.

	kontrola DMSO + H ₂ O ₂ 100 µM	UDO 10µg/mL + H ₂ O ₂ 100 µM	kontrola DMSO + H ₂ O ₂ 300 µM	UDO 10µg/mL + H ₂ O ₂ 300 µM
Relativna fluorescencija DCF-DA, %	100,00	75,15 ± 5,26	100,00	79,32 ± 9,45

Beograd, 30. 09.2020.

Podnosilac izveštaja
Dr Marija Stanković

INSTITUT ZA MOLEKULARNU GENETIKU
I GENETIČKO INŽENJERSTVO
BEOGRAD, Vojsvođe Stepe 444 a