Fond
za inovacije
Crne Gore

UNIVERZITET CRNE GORE
BIOTEHNIČKI FAKULTET
Broj: 07-3268
08.08 2023

Bulevar Mihaila Lalića bb
81000 Podgorica, Crna Gora
Tel. +382 20 653 891
email: info@fondzainovacije.me
www.fondzainovacije.me
PIB: 03382052

OBRAZAC ZA IZVJEŠTAVANJE O REALIZACIJI INOVACIONIH VAUČERA

Nosilac inovacionog vaučera – podnosilac prijave / korisnik vaučera	Permakultura.me – Akademija za urbani ekološki inženjering d.o.o. , Podgorica
Naziv usluge/vaučera	Ispitivanje bioloških svojstava ekstrakta dobijenog iz mlade speltine trave
Naziv naučnoistraživačke ustanove - Pružaoca usluge	Univerzitet Crne Gore, Biotehnički fakultet u Podgorici
Ime rukovodioca naučnoistraživačke ustanove	Prof. dr Božidarka Marković, dekanica
Period realizacije vaučera (DD/MM/GG, od-do)	13.02.2023.godine – 13.08.2023.godine
Datum podnošenja izvještaja	
Ime glavne kontakt osobe / rukovodioca	Doc. dr Ana Topalović Doc. dr Mirko Knežević
Odobren iznos od strane Fonda	**8.000**
Ukupna vrijednost vaučera	**10.019**

Potpis Korisnika

Zakonski zastupnik privrednog društva

Ime i prezime: Aleksandrina Vujačić

Potpis: A. Vujačić

Potpis Pružaoca usluge

Ovlašćeni potpisnik

Ime i prezime: Prof. dr Božidarka Marković

Potpis:

Mjesto i datum: Podgorica, 08.08.2023

IZVJEŠTAJ[1]

1. AKTIVNOSTI – Planirano i ostvareno – ispunjava pružalac usluge

Nakon potpisanog Ugovora sa Naručiocem (Permakultura.me – Akademija za urbani ekološki inženjering d.o.o, Podgorica), Biotehnički fakultet je formirao radni tim u sastavu: doc. dr Ana Topalović i doc. dr Mirko Knežević kao nadležne osobe za realizaciju planirane usluge u naučnoistraživačkoj ustanovi, stručna saradnica Daliborka Lekić, dipl.ing, laborantkinja Jelena Vukčević i tehnički saradnik Mirko Bulatović. Osim pomenutih, na izradi usluge, uključena je i administrativna služba Biotehničkog fakulteta.

U okviru dogovorene usluge, planirano je ispitivanje dejstva ekstrakta dobijenog iz mlade speltine trave (*Triticum spelta* L.) na određene ćelijske linije kancera, kao i formiranje izvještaja sa rezultatima za potrebe Naručioca usluge. Treba napomenuti da je ovakva vrsta istraživanja veoma rijetka u Crnoj Gori, kao i da su istraživači Biotehničkog fakulteta (baveći se proučavanjem biljnih fenola) u zadnjih sedam godina proširili oblast interesovanja na proučavanje biološke aktivnosti biljnih ekstrakata.

U prvom koraku, krenulo se da nabavkom potrebnog materijala za pomenuto ispitivanje, potom pripremom adekvatnih ambijentalnih uslova za postavljanje eksperimenta. Ove aktivnosti zahtijevale su znatno duže vremena od planiranog, što je podrazumijevalo znatno intenzivniji laboratorijski rad tokom zadnih mjeseci.

U drugom koraku dogovorena je proizvodnja ekstrakta mlade speltine trave, u kontrolisanim uslovima, a prema ustaljenoj proceduri koju sprovodi Naručilac usluge. Tokom cijeđenja ekstrakta izdvaja se pjena koju konzumenti ekstrakta obično ne žele, tako da se ista uklanja. Pretpostavilo se da pjena sadrži biološki aktivne komponente (saponine) i da može značajno povećati antitumorsku aktivnost, te je odlučeno da se pripreme dva tipa uzoraka: prvi – bez pjene i drugi – sa pjenom. Radi očuvanja biološke aktivnosti ekstrakta trave spelte sušenje određenog broja uzoraka je obavljeno u liofilizatoru (slika 1). Prosječan udio suve materije u ekstraktu bez pjene iznosio je 6,28%, a sa pjenom 6,61%.

1

- ✓ Završni izvještaj sadrži potrebne informacije za procjenu stanja realizacije inovacionog vaučera.
- ✓ Završni izvještaj treba da bude jasan, koncizan, sadržajan i sveobuhvatan.
- ✓ Završni izvještaj je neophodno dostaviti u elektronskom formatu u PDF-u preko portala Fonda za inovacije.
- ✓ Završni izveštaj treba da sadrži temeljan pregled preduzetih i realizovanih aktivnosti u skladu sa defnisanim ciljevima u prijavi za vaučer. Potrebno je opisati sve eventualne probleme i rizike na koje se naišlo tokom realizacije, kao i moguća odstupanja od projektnih planova.

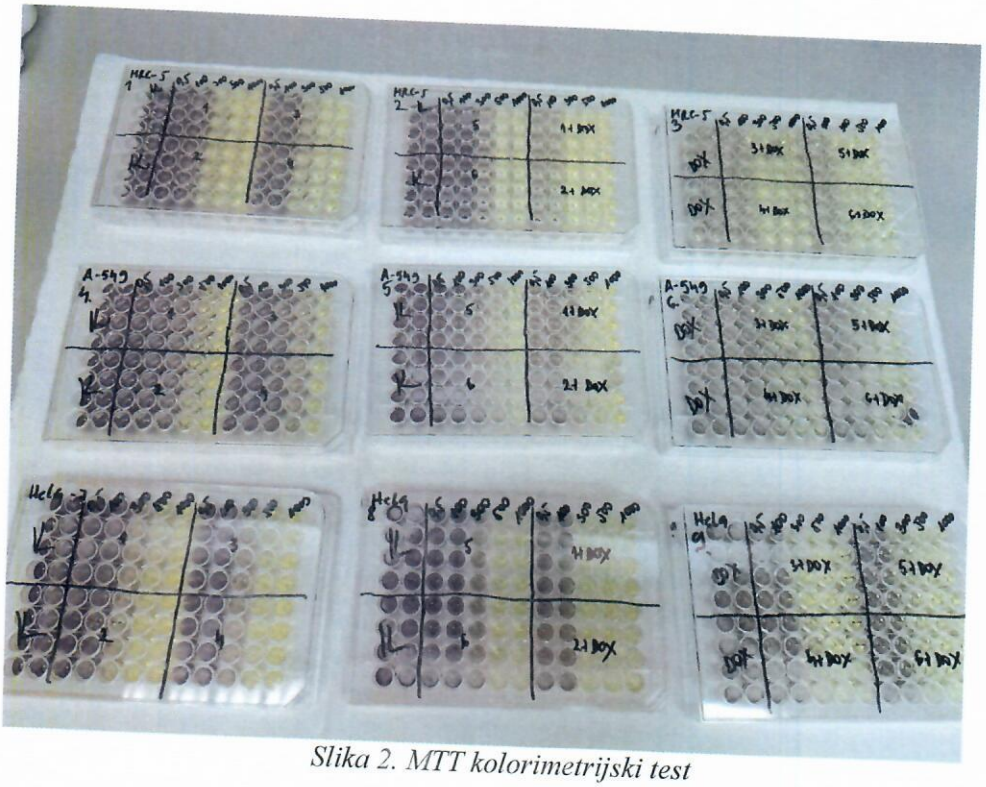


Slika 1. Liofilizacija uzoraka ekstrakta mlade trave spelte

Za pripremu odgovarajućeg ekstrakta odvagana je masa liofilizovanog uzorka (~ 0,1 g) i dodato 10 mL ekstrakcionog sredstva. Korišćena se dva ekstrakciona sredstva – aceton: voda (Ac:H_2O 4:1) i metanol: voda (MeOH:H_2O 4:1). Prema literaturnim navodima, ovi rastvarači su se pokazali veoma efikasni u pogledu ekstrakcije hlorofila i fenolnih jedinjenja, kao komponenti sa biološkim dejstvom. Ekstrakcija u trajanju 2 h (sa Ac:H_2O) i 3 h (sa MeOH:H_2O) je obavljena u ultrazvučnom kupatilu uz povremeno dodavanje leda radi očuvanja bioloških svojstava ekstrakata. Ekstrakti su centrifugirani i profiltrirani kroz membranske filtre. Uzorci originalnog ekstrakta spelte su takođe centrifugirani i profiltrirani na isti način kao pomenuti ekstrakti, čime je odvojena tečna faza koja sadrži vodorastvorljive komponente. Ovako pripremljeni uzorci su duboko zamrznuti do pripreme za izvođenje bioloških testova.

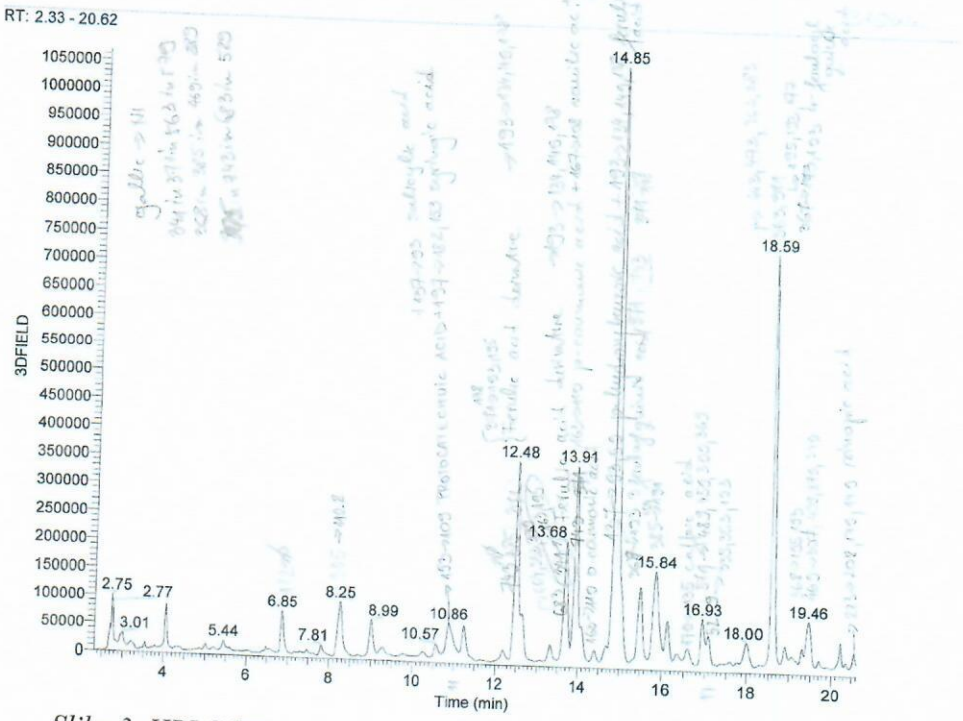
U saradnji sa Jasminkom Mrđanović, višom naučnom saradnicom Instituta za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici, sprovedeno je *in vitro* ispitivanje antitumorskog potencijala različitih uzoraka ekstrakta i odgovarajućih ekstrakata testom MTT na tri ćelijske linije humanog porijekla, od kojih je jedna bila zdrava MRC-5 (ECACC: 84101801 – fetalni fibroblasti pluća) i dvije maligno transformisane: A-549 (ECACC: 86012804 – karcinom pluća) i HeLa (ECACC: 93021013 – karcinom cerviksa). Pored toga, ispitivano je uzajamno dejstvo tečne faze ekstrakta i ekstrakata spelte i doksorubicina kao lijeka koji se koristi u hemoterapiji. Doksorubicin se često koristi za tretiranje širokog opsega kancera i sarkome mekog tkiva.

MTT kolorimetrijski test (slika 2) se bazira na sposobnosti enzima sukcinat dehidrogenaze u živim ćelijama da redukuju 3- (4, 5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromid (MTT) u formazan koji se zatim određuje spektrofotometrijski. Produkcija formazana je direktno proporcionalna broju vijabilnih ćelija, a inverzno proporcionalna stepenu citotoksičnosti.



Slika 2. MTT kolorimetrijski test

Pored dogovorenih aktivnosti, a u cilju detaljnije i bolje procjene uticaja ekstrakata na pomenute humane ćelije (u zavisnosti od sastava), urađena je i identifikacija fenolnih jedinjenja (slika 3) u svim ispitivanim ekstraktima. S tim u vezi, uradiće se i njihova kvantifikacija, tako da je za dalje ispitivanje i analizu rezultata potreban duži vremenski period. Do sada dobijeni rezultati, zajedno sa očekivanim, po kvalitetu i značaju, moći će se publikovati u nekom od prestižnih naučnih časopisa.



Slika 3. HPLC hromatogram sa identifikovanim fenolnim kiselinama

I pored ispunjavanja dogovorene usluge tj. realizacije planiranih aktivnosti, ispitivanja će se nastaviti kroz neki vid buduće saradnje sa Naručiocem, i nakon završetka ovog posla. *Za sada, naručilac je dobio rezultate bioloških testova ekstrakata spelte bez i sa pjenom (tečne faze originalnog ekstrakta i ekstrakata dobijenih iz liofilizovanog originalnog uzorka pomoću dvije vrste rastvarača) sprovedenim na tri ćelijske linije humanog porijekla.*

2. Kvalitet isporučene usluge – ispunjava korisnik usluga

U periodu od šest mjeseci od potpisivanja ugovora za izvršenje posla, bila je intenzivna komunikacija između "Permakultura.me" d.o.o. (korisnik usluge) i istraživačkog tima Biotehničkog fakulteta (pružalac usluge).

Pružalac usluge je uspješno završio sve tražene faze izrade posla u okviru maksimalnog vremenskog perioda od šest mjeseci, koji je definisan Inovacionim vaučerom. Ovo ispitivanje pruža konkretne podatke i informacije o zdravstvenim efektima ekstrakta dobijenog iz mlade trave spelte. Dokazana antikancerogena aktivnost, a u situaciji kada je više nego primjetan porast onkoloških pacijenata, značajno će povećati plasman proizvoda, jer se očekuje da će pretpostavljeni broj korisnika (dat u okviru analize izvodljivosti Ekonomskog fakulteta u Podgorici) višestruko porasti (kako među onkološkim pacijentima, tako i u svrhu prevencije).

Od Pružaoca usluge smo dobili izvještaj o sprovedenim biološkim testovima, a u nastavku teksta biće ukratko prezentovani dobijeni rezultati.

Eksperiment sa tečnom fazom ekstrakta spelte (vodorastvorljiva frakcija)

Antiproliferativni efekat ispitivanih uzoraka tečne faze originalnog ekstrakta spelte sa i bez pjene na sve tri ćelijske linije bio je prema modelu linarne zavisnosti, koja prati koncentracioni gradijent. Uzorci ekstrakta sa pjenom su na obje maligne ćelijske linije pri višim koncetracijama ispoljavali veći antitumorski efekat u odnosu na uzorke bez pjene. Ćelije karcinoma cerviksa su bile osjetljivije na antitumorsko dejstvo oba ekstrakta spelte u odnosu na ćelije karcinoma pluća. Kotretman sa doksorubicinom je rezultirao uočljivo većim antitumorskim efektom oba uzorka i sa i bez pjene. Zbog osjetljivosti vodorastvorljive frakcije i mogućih promjena tokom čuvanja uzoraka, biće provjerena ponovljivost dobijenih rezultata bioloških testova (takođe i u pogledu kvalitativnog i kvantitavinog profila fenolnih jedinjenja). Zato u ovom izvještaju nisu prikazane brojne vrijednosti ispitivanih parametara (ND – nije definisano, tabela 1).

Eksperiment sa Ac:H_2O (4:1) ekstraktom liofilizovanog uzorka spelte

Na maligno transformisanim ćelijskim linijama se može uočiti linearno povećanje antitumorskih efekata oba uzorka dobijena ekstrakcijom sa Ac:H_2O (4:1). Uzorci sa pjenom su, sa povećanjem koncentracija, bili efikasniji u odnosu na uzorke bez pjene u pogledu antiproliferativne aktivnosti na ćelijama karcinoma cerviksa i pluća. Na ćelijskoj liniji HeLa su antitumorski efekti bili daleko izraženiji u odnosu na ćelije karcinoma pluća. Oba uzorka su pokazala selektivnost prema tumorskim ćelijama karcinoma cerviksa, dok je uzorak sa pjenom bio selektivan i prema ćelijama karcinoma pluća. U kotretmanu sa doksorubicinom, sa povećanjem koncentracija, antitumorski efekti oba uzorka su bili izraženiji na obje tumorske linije.

Eksperiment sa MeOH:H_2O (4:1) ekstraktom liofilizovanog uzorka spelte

Sa porastom koncentracije ispitivanih uzoraka, linearno se povećavao antiproliferativni efekat liofilizovanih ekstrakata spelte, dobijenih ekstrakcijom sa MeOH:H_2O (4:1). Ćelijska linija karcinoma cerviksa je bila osjetljivija u pogledu antitumorskih efekata navedenih uzoraka u odnosu na ćelijsku liniju karcinoma pluća. Ekstrakt spelte sa pjenom je pokazao selektivni efekat prema ćelijama kancera cerviksa. Njegova efikasnost je, shodno tome, bila veća u poređenju sa ekstraktom bez pjene. Zajedno sa doksorubicinom, ispitivani uzorci su imali izrazitiji antitumorski efekat u poređenju sa samim doksorubicinom.

U nastavku je zbog ograničenosti ovog izvještaja, prikazana tabela sa parametrima koji se uobičajeno koriste kod prikazivanja efikasnosti antitumorskog dejstva, IC50 i NT/T. IC50 vrijednost predstavlja koncentraciju ispitivnog uzorka, koja je potrebna da inhibira ćelijski rast za 50%. Na osnovu IC50 vrijednosti, izračunat je odnos netumor/tumor (NT/T), koji kao dodatni parametar pokazuje selektivnost ispitivanih uzoraka prema tumorskim ćelijama u poređenju sa zdravom ćelijskom linijom. Vrijednosti NT/T iznad 1 odgovaraju većoj inhibiciji rasta tumorske ćelijske linije u odnosu na ćelijsku liniju izvedenu od zdravog tkiva.

Tabela 1. IC50 vrijednosti ispitivanih ekstrakata mlade trave spelte i njihova selektivnost prema tumorskim ćelijama (NT/T)

Redni br.	Uzorci ekstrakta spelte	IC_{50}			NT/T	
		MRC-6	A-549	HeLa	A-549	HeLa
1	originalni ekstrakt bez pjene	ND*	ND	ND	ND	ND
2	originalni ekstrakt sa pjenom	ND	ND	ND	ND	ND
3	liofilizovani ekstrakt bez pjene Ac:H_2O (4:1)	172,48	704,15	**60,08**	0,24	**2,87**
4	liofilizovani ekstrakt sa pjenom Ac:H_2O (4:1)	1410,48	699,60	**85,40**	**2,02**	**16,52**
5	liofilizovani ekstrakt bez pjene MeOH:H_2O (4:1)	102,89	128,64	116,26	0,80	0,88
6	liofilizovani ekstrakt sa pjenom MeOH:H_2O (4:1)	117,02	143,88	**84,25**	0,81	**1,39**

* ND – nije definisano (obrazloženje je prethodno navedeno)

3. Rezultati, održivost i uticaj na dalje poslovanje preduzeća - ispunjava korisnik usluge

Preduzeće "Permakultura.me" proizvodi suplement, ekstrakt iz mlade speltine trave (*Triticum spelta* L.), koji je 100% prirodan. Preduzeće je ciljano osnovano kako bi se za već razvijeni proizvod dokazale zdravstvene tvrdnje i na tržište izašlo sa etiketom koja ih sadrži. Tehnološki postupak je zaštićen kod Direkcije za zaštitu intelektualne svojine. Istraživanjem sprovedenim u okviru projekta "Triticum spelta L. extract as a dietary supplement" dokazane su neke od inicijalnih pretpostavki po pitanju kvalitativnog i kvantitativnog sastava i antioksidativnog svojstva, pa se prema instrukcijama sa EFSA liste, proizvodu mogu pridružiti korespondirajući zdravstveni efekti (12 komponenti, bez ispitivanja vitaminskog sastava). Najznačajniji rezultati pomenutog projekta su objavljeni u naučnom radu pod naslovom „Nutritional composition, biologically active substances and antioxidant activity of young spelt grass extract", autora Jančić *et al.*, 2022 (https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jsf2.73).

Prema našim saznanjima, na tržištu Crne Gore ne postoje 100% prirodni proizvodi kategorisani kao suplementi, makar ne na način da je proizvod prošao kroz komplikovane procedure dokazivanja prisustva nutrijenata (dugotrajno, finansijski zahtjevno, uvijek nesiguran ishod) definisane Zakonom o bezbjednosti hrane. Potencijalni

problemi sa plasmanom nisu uslovljeni konkurencijom, već činjenicom da je proizvod nov i za naše uslove finansijski zahtjevan za krajnjeg korisnika.

Ovim ispitivanjem dokazan *in vitro* antitumorski efekat kod dvije maligno transformisane ćelije, karcinoma cerviksa i pluća, podstiče na dalja istraživanja, kako *in vitro* tako i *in vivo*. Naš suštinski krajnji cilj su klinička ispitivanja u oblasti onkologije, reumatologije i endokrinologije.

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja izdvajamo sledeće konstatacije:

- ✓ ***ekstrakti iz mlade speltine trave su pokazali antitumorsko dejstvo***
- ✓ ***ekstrakti iz mlade speltine trave sa pjenom su pokazali veću antitumorsku aktivnost,***
- ✓ ***ćelije karcinoma cerviksa su bile osjetljivije na antitumorsko dejstvo ekstrakata (sa i bez pjene) u odnosu na ćelije karcinoma pluća,***
- ✓ ***kotretman sa doksorubicinom je rezultirao uočljivo većim antitumorskim efektom ekstrakata.***

I nakon okončanja ovog posla, naša saradnja (sa Pružaocem usluge) će biti nastavljena, jer očekujemo i rezultate hromatografske analize (na čemu se uveliko radi, a što je mimo dogovorenog posla).

Dosadašnja ispitivanja otvaraju nove mogućnosti saradnje i nove pravce u istraživanju, ne samo na ovim prostorima već i šire.