

E(x)plory

BADANIE ANTYKANCEROGENNYCH WŁAŚCIWOŚCI EKSTRAKTU
Z WROŚNIAKA GARBATEGO (TRAMETES GIBBOSA)
ORAZ JEGO WPŁYWU NA MIKROORGANIZMY.



**AUTOR/AUTORZY
PROJEKTU:**

**Barbara Siewert
Maciej Uranowski**

OPIEKA NAUKOWA:

**Paulina Zegarska
Dr Marta Polańska**

SZKOŁA:

**III Liceum Ogólnokształcące
im. Marynarki Wojennej RP w Gdyni
Katolickie Liceum Ogólnokształcące
Księży Pallotynów w Chełmnie**



O badaniach

Nasze badania wykonaliśmy z pasji do natury i nauki. Dotyczą one związków chemicznych zawartych w wrośniaku garbatym (*Trametes Gibbosa*). Nasze badania mają na celu wykazanie właściwości przeciwnowotworowych oraz wpływu na mikroorganizmy ekstraktu z wyżej wymienionego grzyba. Grzyb, który jest przez nas badany nie został jeszcze sprawdzony pod kątem tego co my robimy, nasze badanie, poniekąd, odkrywa nowe ścieżki i przeciera szlak do dalszych badań. Naszym celem jest wykazać, że ukryta potęga królestwa grzybów może mieć zaskakujące i praktyczne zastosowania.



Metody

Metody przez nas używane to:

- Ekstrakcja na drodze maceracji rozpuszczalnikiem.

Do przeprowadzenia ekstrakcji użyliśmy mieszanki trzech rozpuszczalników, DCM, 2-propanol, aceton. Do maceracji użyliśmy zmielonego grzyba. Następnie wysuszony, zmielony owocnik trafił do butli i został zalany mieszanką. Macerował się przez dwie doby. Następnie nadmiar ekstrahenta został usunięty na wyparce próżniowej.

- GC.

Dzięki uprzejmości PPNT była możliwość wykonania chromatografii gazowej. Niestety jeszcze oczekujemy na wyniki.

- Hodowla bakterii i drożdżaków oraz antybiogramy.

Hodowla była prowadzona na pożywkach TSA a w wypadku drożdżaków SAB. Hodowane przez nas mikroorganizmy to P. Aeruginosa, S. Aureus, K. Pneumoniae, E. Coli oraz Candida Albicans. Mikroby były hodowane w osiemnastogodzinnych hodowlach w cieplarkach o temperaturze 37 stopni Celsjusza. Podczas rozwoju hodowli na pożywkę z wysianymi organizmami położono krążki nasączone ekstraktem, następnie za pomocą wzroku oceniono jego skuteczność.

- Hodowla komórkowa komórek raka piersi HCC1806.

Jesteśmy w trakcie jej prowadzenia oraz prowadzenia badań nad komórkami nowotworu. Dokładniejszy, planowany jej przebieg zostanie opisany w dalszej części.



Ekstrakcja

Była przeprowadzana przez dwie doby. By ją wykonać użyliśmy mieszaniny 1:1:1 trzech rozpuszczalników, izopropanolu, acetonu i DCM. Z siedemdziesięciu gram suchej masy otrzymaliśmy 61,4 mg ekstraktu do badań nad nowotworami. Ekstraktu do antybiogramów było 86,4 mg.

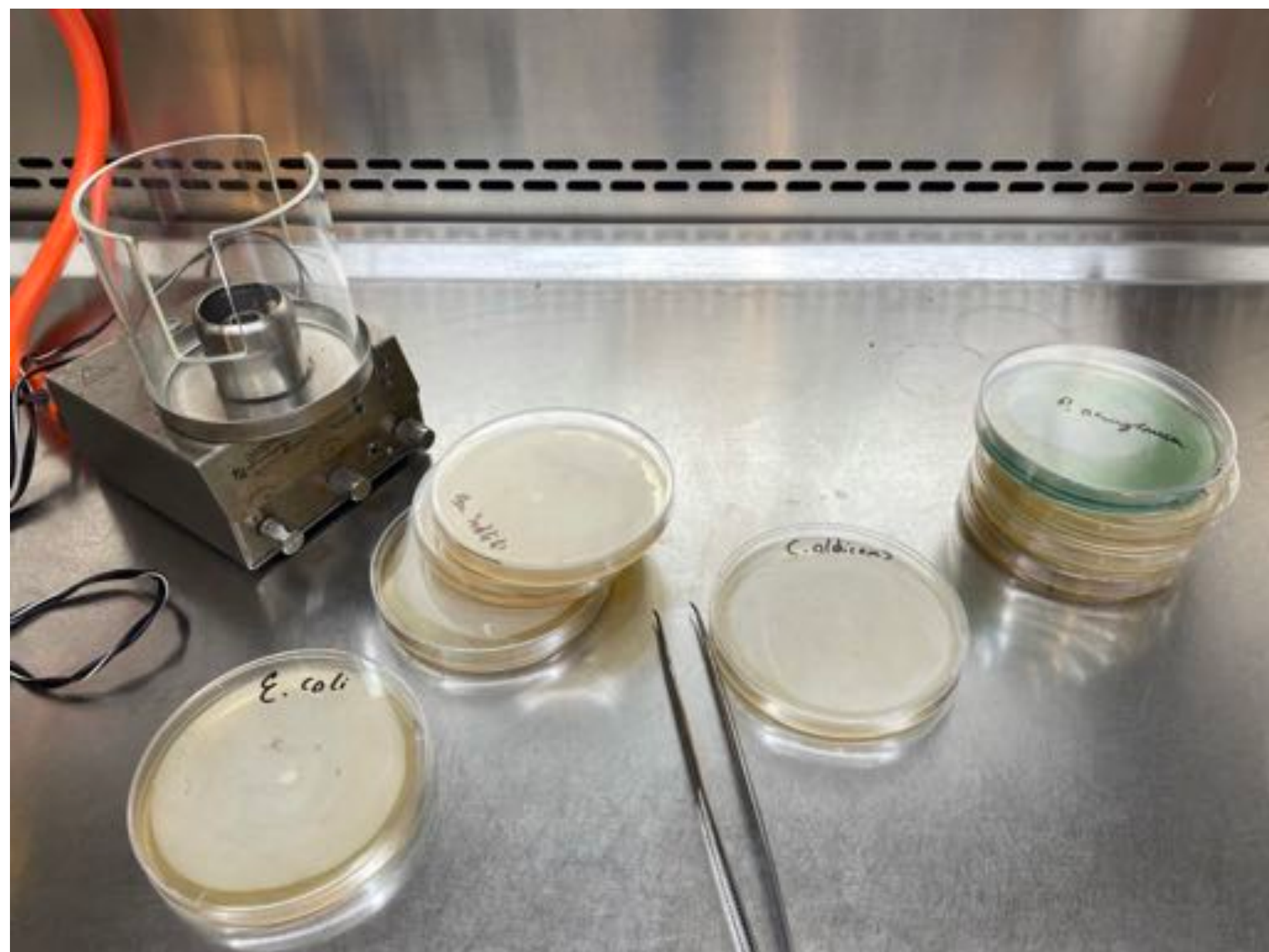


Chromatografia gazowa



Wyniku chromatografii spodziewamy się w okolicach marca, jednak możemy założyć, że niektóre grupy związków z pewnością występują w tym grzybie. Są to na przykład związki polifenolowe, związki lotne odpowiadające za zapach, polisacharydy na przykład PSP lub PSK, których obecność udało się udowodnić doświadczalnie otrzymując je według odpowiedniej preparatyki, flawonoidy, sterole, wyższe alkohole, triterpenoidy oraz inne związki. Zakładamy, że skład jakościowy nie będzie bardzo odbiegać od składu podobnych gatunków (*Trametes Hirsuta*, *Trametes Versicolor*).

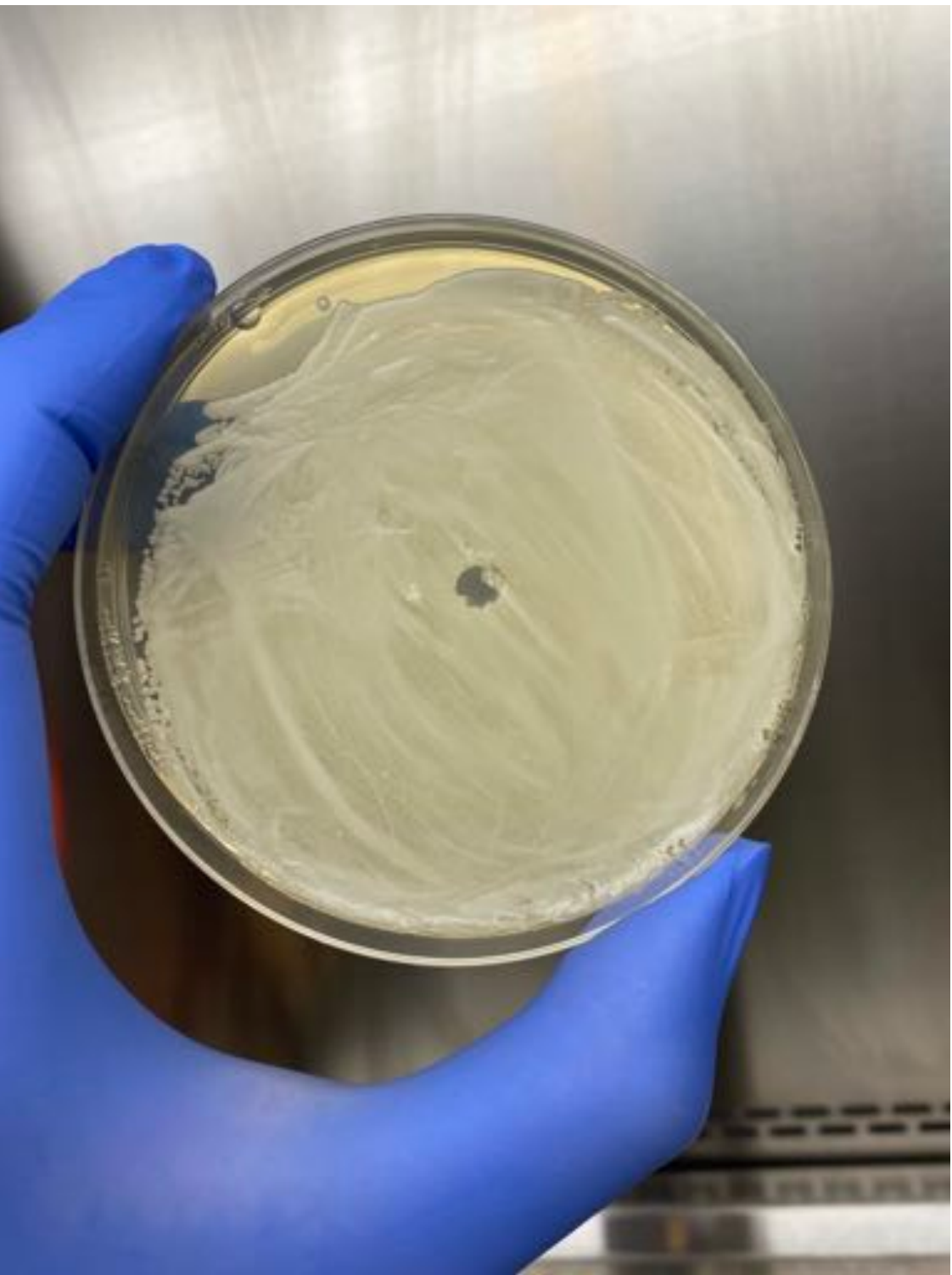
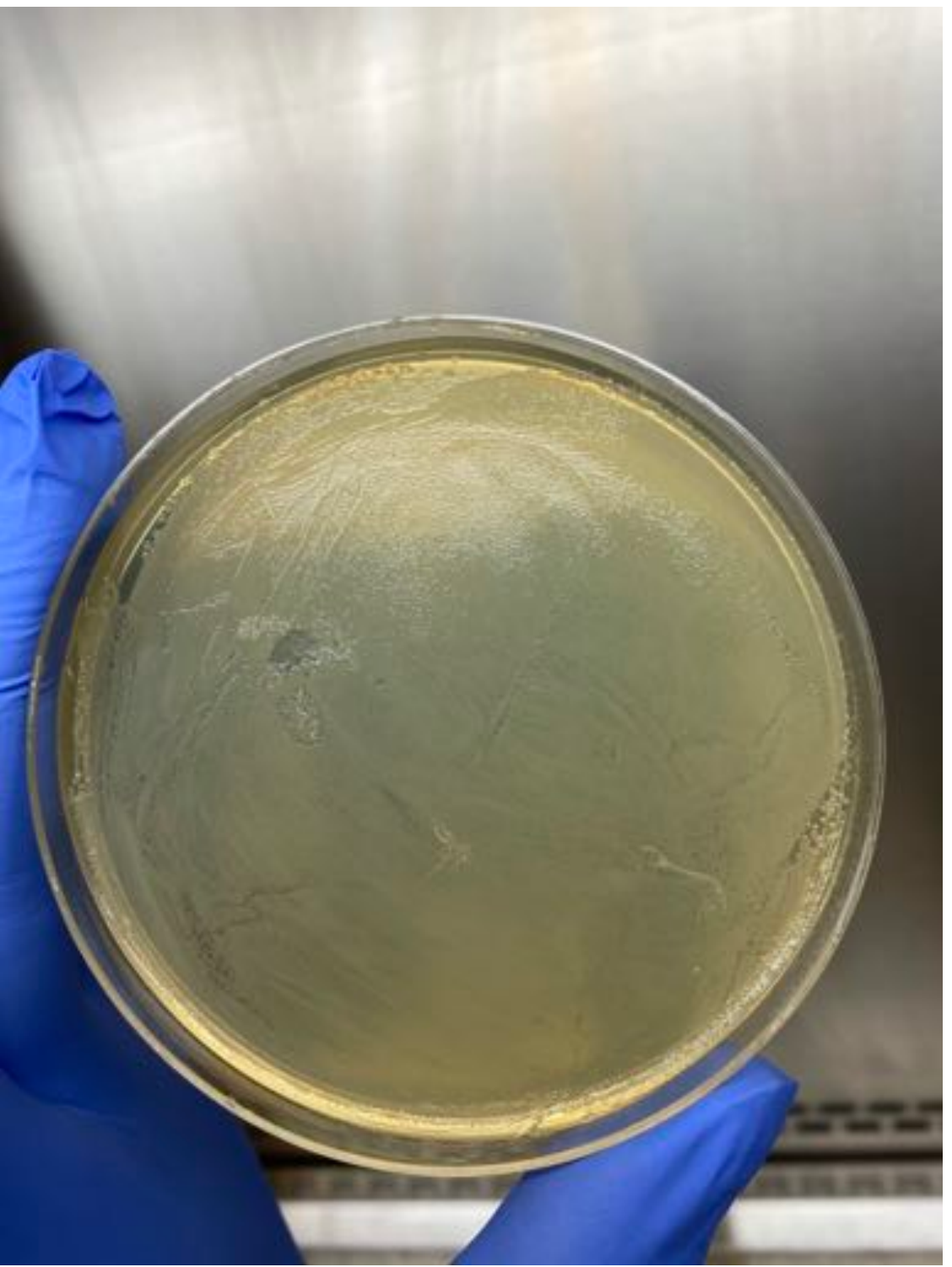
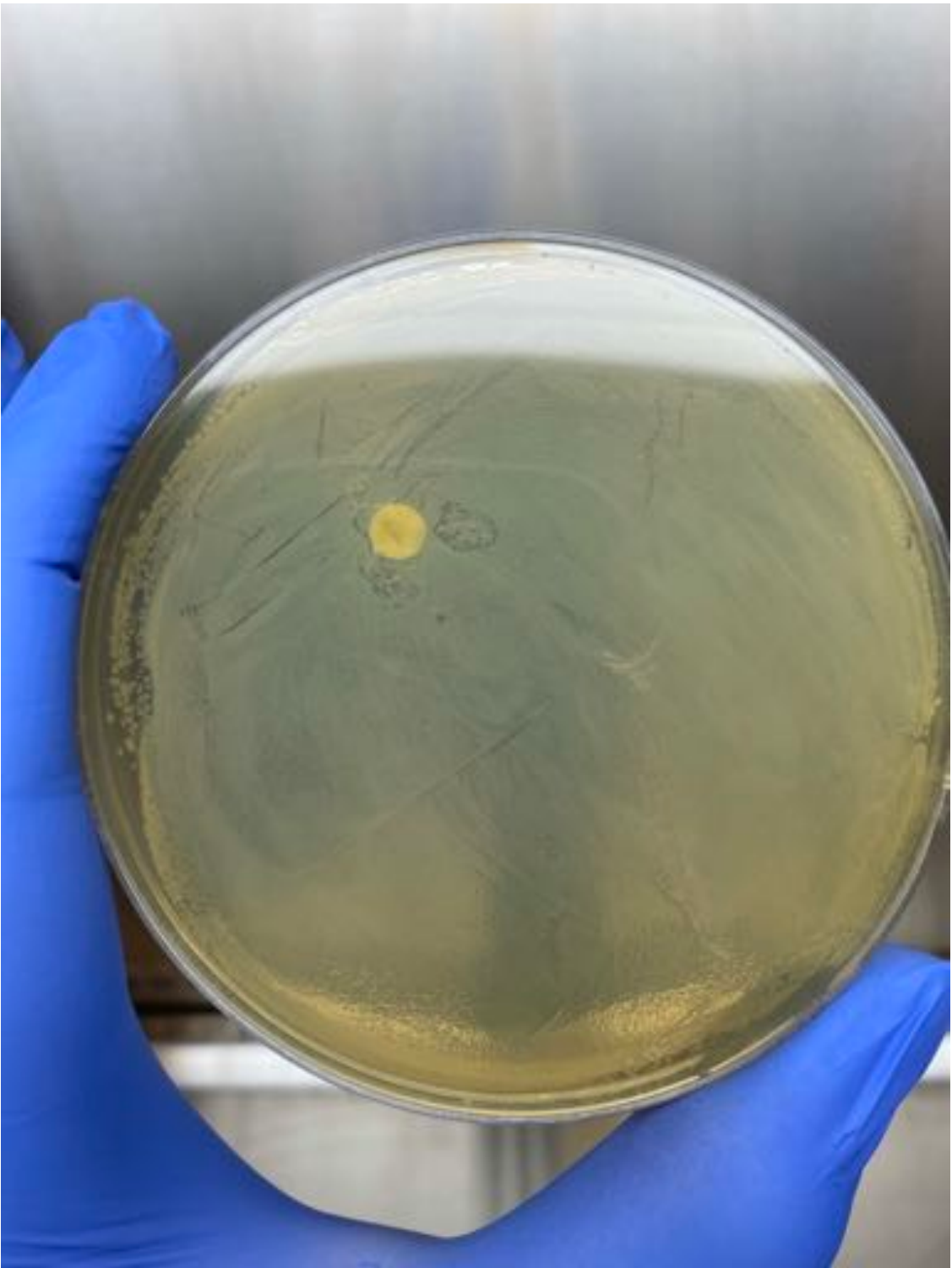
E(x)plory



Hodowla była prowadzona w laboratorium mikrobiologicznym w bezpiecznych warunkach. Posiewy wykonano pod komorą laminarną a hodowlę trzymano w cieplarni w trzydziestu siedmiu stopniach przez osiemnaście godzin. Hodowane gatunki to *P. Aeruginosa*, *S. Aureus*, *K. Pneumoniae*, *E. Coli* (podłoże TSA) oraz *Candida Albicans* (SAB). Największy efekt osiągnięto na pałeczce ropy błękitnej. Nieznaczny efekt był widoczny też na reszcie użytych szczepów. Zastosowano na każdy krążek po 50 mikro litrów o stężeniu 1,65%.



Wyniki antybiogramów



Od lewej: *P. Aeruginosa*, *K. Pneumoniae*, ostatnie to kolonia *C. Albicans*.



Hodowla komórkowa

Aktualnie jesteśmy w trakcie badań nad komórkami nowotworowymi ale chętnie przedstawimy to co będziemy robić. Nasze badanie mają na celu wykazanie antykancerogenego potencjału ekstraktu z wybranego grzyba.

Badanie właściwości tego ekstraktu wymaga stworzenia hodowli komórkowej, a także opracowania kolejnych kroków.

Następnie zbadane zostanie działanie roztworu

i na podstawie podjętych prób zostanie określone adekwatne stężenie w odniesieniu do wybranego typu komórek.

Kolejnym ważnym krokiem będzie inkubacja

i określenie poszczególnych parametrów potrzebnych do dalszego testowania.





Cel

Projekt zakłada zbadanie aktywności cytotoksycznej ekstraktu w hodowli in vitro komórek z linii HCC1806 za pomocą m.in. testu MTT w ocenie ich metabolizmu po wystawieniu na działanie badanej substancji ze względu na to, że zalecany jako referencyjny przez międzynarodowe organizacje normotwórcze. Jest to wskazane ze względu na przypuszczenia o inhibicji proliferacji poprzez zakłócenie progresji cyklu komórkowego w różnych etapach interfazy lub indukcji apoptozy. Postępowanie w przypadku testu MTT (mikrokulturowego testu tetrazolowego) jest oparte o standardowe metody, a test polega na pomiarze redukcji soli tetrazolowej do nierozpuszczalnego formazanu o purpurowym zabarwieniu w żywych komórkach.





Technikalia

Komórki zostaną wysiane na sterylne płytki. Po całkowitej inkubacji zostają zmienione media na zawierające odpowiednie ilości badanych substancji. Przez około 24 godziny następuje kolejne inkubowanie komórek. Potem dodany zostanie roztwór MTT w PBS i inkubowany zostanie na parę godzin. DMSO zostanie dodane w celu rozpuszczenia powstałego formazanu. Absorbancja zostanie odczytana przy długości fali 570 lub 575 nm. Uzyskane wyniki zostaną przeanalizowane przy użyciu wybranego języka oprogramowania. Próbkę ekstraktu zostanie rozpuszczona w DMSO a następnie podana do hodowli komórkowej, zostanie wykonana również próba badawcza z samym DMSO.

Zastrzegamy sobie prawo do drobnych modyfikacji opisanych metod lub/i rozbudowaniu ich o kolejne kroki/testy (np. z kaspazą-3 -dokładne zbadanie apoptozy) celem lepszego i dokładniejszego zbadania działania ekstraktu. Obecnie jesteśmy w fazie badań, w której nie możemy jeszcze potwierdzić naszych hipotez, po wnikliwej analizie literatury w tym temacie jesteśmy, jednak pełni optymizmu.



DZIĘKUJEMY ZA UWAGĘ



**Barbara Siewert
Maciej Uranowski**

Zdjęcia

Zdjęcia pochodzą z prywatnej kolekcji.

Piśmiennictwo

- McCall, C.A. *et al.* (1989) 'Biotherapy: A New Dimension in Cancer Treatment', *Bio/Technology*, 7(3), pp. 231–240. doi:[10.1038/nbt0389-231](https://doi.org/10.1038/nbt0389-231)
- Fisher, M. and Yang, L.-X. (2002) 'Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PSK): implications of cancer immunotherapy', *Anticancer research*, 22(3), pp. 1737–1754.
- Wong, J.H. *et al.* (2020) 'Mushroom extracts and compounds with suppressive action on breast cancer: evidence from studies using cultured cancer cells, tumor-bearing animals, and clinical trials', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), pp. 4675–4703. doi:[10.1007/s00253-020-10476-4](https://doi.org/10.1007/s00253-020-10476-4).
- Sun, C. *et al.* (2012) 'Polysaccharide-K (PSK) in Cancer - Old Story, New Possibilities?', *Current Medicinal Chemistry*, 19(5), pp. 757–762. doi:[10.2174/092986712798992020](https://doi.org/10.2174/092986712798992020).
- Tsukagoshi, S. *et al.* (1984) 'Krestin (PSK)', *Cancer Treatment Reviews*, 11(2), pp. 131–155. doi:[10.1016/0305-7372\(84\)90005-7](https://doi.org/10.1016/0305-7372(84)90005-7).
- Chu, K.K.W., Ho, S.S.S. and Chow, A.H.L. (2002) 'Coriolus versicolor: A Medicinal Mushroom with Promising Immunotherapeutic Values', *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42(9), pp. 976–984. doi:[10.1177/009127000204200904](https://doi.org/10.1177/009127000204200904).