



## Jegyzőkönyv

a **Ganoderma lucidum** (pecsétviaszgomba, PV.20.törzs) gombából készült kivonatok *in vitro*, humán tumoros sejtvonalakra gyakorolt, élettani hatásának előkísérleteiről

Az előkísérleteket **Vígh András** (szül.: Nyíregyháza, 1964.09.16, lakcím: 4400. Nyíregyháza, Bessenyei tér 3-4 sz.) és **Arany Szabolcs** (szül.: Nyíregyháza, 1965.11.07, lakcím: 4400. Nyíregyháza, Honfoglalás u. 2 sz.) magánszemélyek kérésére végeztük, 2012. 10. 01-12. között az AMKSZI Humán Sejtbiológia Laboratóriumában.(Nyíregyházi Főiskola, Kótaji út 9-11, 4400. Nyíregyháza)

Az előkísérletek tárgya: a hazai megrendelők által termesztett *Ganoderma lucidum* (PV.20. törzs) gomba *in vitro* élettani hatásának vizsgálata.

A távlati cél olyan sejtbioológiai, analitikai-kémiai és termékfejlesztési kísérletek elvégzése, melyek alátámasztják a hazai megrendelők által termesztett *Ganoderma lucidum* felhasználhatóságát az immunrendszer működésének javításában, a kemoterápia mellékhatásainak ellensúlyozásában, egyes rákbetegségek kiegészítő kezelésében. A pecsétviaszgomba fent említett hatásairól a nemzetközi szakirodalomban sok adat található (pl. Sufen Zhao, Gang Ye, Guodong Fu, Jian-Xin Cheng, Burton B.Yang, Chun Peng, *Ganoderma lucidum* exerts anti-tumor effects on ovarian cancer cells and enhances their sensitivity to cisplatin, IJO 38: 1319-1427, 2011).

### **Anyagok és módszerek**

#### **A gombakivonat és a kezelő oldatok elkészítése:**

A sejtvonalakon tesztelt szerves oldószeres kivonatot a gomba vegyes (termőtest+szár) szárított örleményéből készítettük. A szárított örleményt a megrendelő biztosította.

Szerves oldószeres kivonat:

5 g gombaörleményt 200 ml 80 %-os etilalkoholban oldottunk és 24 órán át rázógépen ráztunk 40 C°-on. Ezután a kapott oldatot szűrőpapíron átszűrjük és rotációs vákuumbepárlón az oldószert elpárologtattuk. Egy száraz filmbevonatot kaptunk, melyet 5 ml tápoldattal (RPMI1640) oldottunk le a lombik faláról. Ezt használtuk a továbbiakban a szerves kivonat törzsoldatáknak, ebből készítettük el a kísérlet során használt feles hígítási sort (10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,62%, 0,31%), mely koncentrációjú oldatokkal a sejteket kezeltük. Oldószerként a sejtek tápoldatát használtuk.

#### **Használt sejtvonalak (biológiai modellrendszerek):**

A rendelkezésünkre álló sejtvonalakból randomszerűen választottuk ki az alábbiakat:

K-562 (ATCC-CCL-243): krónikus meduláris leukémia
T-47D (ATCC-HTB133): ductális emlőrák

## **A sejtenyészetet alkotó sejtek életképességének és proliferációjának vizsgálata a gombakivonattal történő kezelés hatására**

Az adherens sejteket (T-47D) a megfelelő tápoldatban 37 °C-on, 5 % CO<sub>2</sub> atmoszférában tenyésztettük, figyelve a konfluenciát, melynek ideális esetben 70-80 %-osnak kell lennie a sejteknek kísérletekben való felhasználhatósága szempontjából. Tripszin segítségével feloldottuk a plazmahidakat, melyekkel a sejtek a tenyésztőedény aljához kapcsolódnak (kivélet K-562, mely szuszpenzióban levő sejtvonal), szuszpenzióba vittük őket, majd leállítottuk az enzim tevékenységét Ca<sup>2+</sup>-t tartalmazó tápoldattal. 10 µl sejtuszpenziót megfestettünk 10 µl Trypan-kékkel, majd Bürker – kamra és mikroszkóp segítségével megszámoltuk a sejteket, a kísérletbe vitt sejtek számának meghatározása céljából (10 000 sejt/well). Ezután a sejteket 96 lyukú wellplate-ben tenyésztettük RPMI1640 tápoldatban 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> atmoszférában. A letapadási idő (kivélet K-562) 24 h volt, majd a tápoldatot a gombakivonat különböző koncentrációjú (10%-0,31%) oldataira cseréltük és 48 órán át inkubáltuk a sejteket a fenti tenyésztési körülmények között.

A sejtek életképességének és proliferációjának változását a kivonat hatására, egy kezeletlen kontrollhoz képest (K), MTT kolorimetriás módszerrel határoztuk meg. (kivélet K-562, melynél az MTT módszer egy újabb változatát, a WST-1 módszert használtuk)

A különböző koncentrációjú *Ganoderma lucidum* (PV.20. törzs) kivonattal 48 óráig kezelt sejtenyészetekhez hozzáadott tetrazólium só az élő sejt mitokondriumában redukálódik bordó formazánná. A formazán mennyisége (abszorbancia abszolút értéke 500-600 nm-en/490 nm-en a WST1-nél) egyenes arányban van az élő sejtek mennyiségével. A kísérletet háromszor ismételtük.

### **Eredmények**

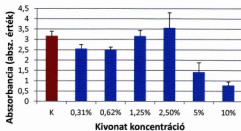
A *Ganoderma lucidum* (PV.20. törzs) általunk használt módszerrel készített szerves kivonata koncentrációfüggő hatást fejt ki *in vitro*, a kezelt humán tumoros sejtek életképességére és proliferációjára.

A 10%-os és az 5%-os oldat gátló hatással van a K-562, krónikus meduláris leukémia (CML) és a T-47D emlőadenokarcinóma sejtek proliferációjára.

A K-562 leukémia sejtvonalnál az alacsonyabb koncentrációjú oldatok hatásában mutakozó szórás tisztázása további kísérleteket tesz szükségessé. Feltételezhető, hogy a kivonat készítés technikájának módosításával, a proliferációt csökkentő hatás koncentráció tartománya szélesíthető. A T-47D emlő adenokarcinóma sejtek proliferációját az alacsonyabb koncentrációjú gombakivonat oldatok vagy nem befolyásolják (2,50%) vagy serkentik a kontroll kezeletlen sejtekhez képest (1,25%, 0,60%).

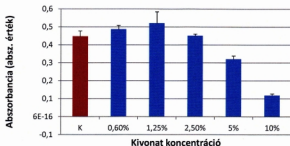
- a. A *Ganoderma lucidum* (PV.20. törzs) szerves kivonatának hatása a K-562 CML leukémia sejtek életképességére és proliferációjára

### K-562 - WST-1



- b. A *Ganoderma lucidum* (PV.20. törzs) szerves kivonatának hatása a T-47D emlő adenokarcinóma sejtek életképességére és proliferációjára


### T-47D - MTT



Az előkísérletek eredményei szerint, a megrendelők által termesztett *Ganoderma lucidum* (PV.20. törzs) gombából készített szerves oldószeres kivonatnak koncentráció-függő hatása van a vizsgált tumoros sejtek életképességére és proliferációjára. (lásd az a. és b. pontok oszlopdiagramjait) Az eredmények reprodukálhatósága szempontjából szükségesnek tartjuk a kísérletek megismétlését, esetleg más sejtvonalak, módszerek bevonásával. A természetes eredetű növényi kivonatokban levő bioaktív (kemopreventív) hatóanyagok ugyanis specifikusan hatnak a különböző tumoros sejtvonalak életképességére és szaporodási képességére. A kivonatok elkészítésének technikája további fejlesztést igényel a rendelkezésre álló hazai és nemzetközi irodalom adatait felhasználva, mint kiindulópont,

hiszen a kivonatban fellelhető biológiaiilag aktív hatóanyagok mennyisége nagymértékben függ a kivonatkészítés módjától és összefügg az élettani hatás mértékével.



  
Csapár Mária  
Biológus

Nyíregyháza, 2012. 10. 17.