

## **RAPORT KOŃCOWY**

### **z wykonania Etapu IV. Ocena aktywności in vitro otrzymanych frakcji homogenatu oraz supernatantu komórek macierzystych MIC-1 - testy proliferacji (zadanie 4.1) oraz badanie apoptozy i analiza stresu komórkowego (zadanie 4.2)**

#### **projektu pn. „Pozyskiwanie farmaceutyków drogą analizy chemicznej i ich izolacji do badań podstawowych”.**

W ramach niniejszego zadania planowano ocenić aktywność i wpływ otrzymanych frakcji homogenatu z komórek macierzystych MIC-1 oraz supernatantu pochodzącego na różne rodzaje komórek docelowych. Na podstawie eksperymentów pilotowych, do badań wybrano komórki: fibroblastyczne (3T3), glejaka mózgu (U87MG), hipokampa (HT22) oraz naskórka (BJ). Oceniano aktywność frakcji homogenatu i supernatantu komórek MIC-1, poprzez badanie ich wpływu na proliferację, apoptozę i stres wybranych linii komórkowych. Wpływ na proliferację komórek określono przy użyciu testu MTT (zadanie 4.1), wpływ na apoptozę - techniką TUNEL (zadanie 4.2), a wpływ na stres komórkowy, poprzez analizę specyficznych markerów biochemicznych (zadanie 4.2).

Wykazano, iż najmniejszą aktywność w indukcji proliferacji wybranych komórek wykazują niezagęszczone frakcje homogenatu oraz supernatantu z komórek MIC-1. Większość z badanych frakcji nie powodowała indukcji apoptozy badanych komórek przez fragmentację DNA oraz dezintegrację błony komórkowej. Wykazywały też nieznaczny wpływ na produkcję reaktywnych form tlenu.

Wyodrębniono najaktywniejsze frakcje, indukujące największą proliferację oraz wykazujące najmniejszy wpływ na indukcję apoptozy oraz stresu biochemicznego dla poszczególnych typów komórek. Dla komórek 3T3 – frakcje supernatantu zagęszczone na Amiconie o punkcie odcięcia 10 kDa i 50kDa oraz frakcje 1 i 2 supernatantu, oczyszczonego w SPE; dla komórek BJ – frakcje supernatantu wytrącone przy 70% wysyceniu siarczanem amonu i frakcja 1 po SPE oraz frakcja 1 homogenatu oczyszczona w SPE; dla komórek HT22 – frakcje homogenatu wytrącone przy 55% wysyceniu siarczanem amonu zagęszczone na Amiconie o punkcie odcięcia 50Da oraz frakcje supernatantu wytrącone 50% i 70% siarczanem amonu, jak również frakcje zagęszczone na Amiconie o punkcie odcięcia 100 kDa; dla komórek U87MG – frakcje homogenatu zagęszczone na Amiconie o punkcie odcięcia 100 kDa i frakcje 1 i 2 oczyszczone w SPE oraz frakcje supernatantu wysolone 55% i 70% siarczanem amonu, zagęszczone przy użyciu Amiconu o punkcie odcięcia 10 kDa i frakcja 2 oczyszczona w SPE.

Szczegółowe wyniki analizy znajdują się w załączniku.