

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **240476**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **432475**

(51) Int.Cl.  
**A01N 63/30 (2020.01)**  
**A01P 5/00 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **31.12.2019**

(54) **Zastosowanie bioaktywnej niskocząsteczkowej frakcji całkowitej z grzyba *Cerrena unicolor* w zwalczaniu nicieni**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**05.07.2021 BUP 14/21**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:  
**11.04.2022 WUP 15/22**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet MEDYCZNY W LUBLINIE,  
Lublin, PL**

**UNIwersytet MARIi CURIE-  
-SKŁODOWSKIEJ, Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MARTA ZIAJA-SOŁTYS, Lublin, PL**

**ANNA BOGUĆKA-KOCKA, Świdnik, PL**

**PRZEMYSŁAW KOŁODZIEJ, Lublin, PL**

**MAGDALENA JASZEK, Piotrawin, PL**

**ANNA MATUSZEWSKA, Kalinówka, PL**

**DAWID STEFANIUK, Lublin, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Anna Bełz**

**PL 240476 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie niskocząsteczkowej frakcji całkowitej z grzyba *Cerrena unicolor* w zwalczaniu nicieni z rodzaju *Rhabditis* sp.

Zarażenia nicieniami stanowią większość chorób pasożytniczych ludzi, zwierząt i roślin. Stanowią poważny problem kliniczny ze względu na niespecyficzne objawy i trudności w postawieniu prawidłowej diagnozy. Nicienie pasożytujące u ludzi zarażają miliony osób rocznie, szczególnie w krajach tropikalnych, gdzie panuje niski poziom sanitarno-higieniczny. Choroby pasożytnicze przewodu pokarmowego są szczególnie groźne dla dzieci, u których mogą powodować osłabienie czy nawet wyniszczenie organizmu na skutek odwodnienia, niedokrwistości czy niedrożności jelit. Obecnie coraz większe możliwości podróżowania do krajów egzotycznych sprawiają, że pasożyty są zawlekane do miejsc, w których normalnie nie występują. Zarażenia pasożytami zwierząt hodowlanych i roślin uprawnych co roku powodują ogromne straty ekonomiczne.

Bardzo istotnym problemem jest narastająca oporność pasożytów na istniejące leki. Wiadomo, że zjawiska tego nie można zatrzymać, jest ono zgodne z prawami ewolucji i przystosowania się organizmów do nowych warunków życia. Istnieje zatem potrzeba poszukiwania nowych związków o potencjale leków przeciwpasożytniczych.

W trakcie przeprowadzanych doświadczeń okazało się, że frakcja bioaktywna będąca przedmiotem wynalazku, której źródłem jest grzyb białej zgnilizny drewna *Cerrena unicolor* wykazuje aktywność nicieniobójczą wobec modelu nicienia z rodzaju *Rhabditis* sp.

Sposób wytwarzania tej frakcji oraz jej charakterystyka biochemiczna zostały opisane w pracy: Matuszewska A, Stefaniuk D, Jaszek M, Pięt M, Zajac A, Matuszewski Ł, Cios I, Grąz M, Paduch R, Banczerz R. (2019) Antitumor potential of new low molecular weight antioxidative preparations from the white rot fungus *Cerrena unicolor* against human colon cancer cells. *Scientific Reports*, 9(1) DOI: 10.1038/s41598-018-37947-z.

W publikacji: Jaszek M, Osińska-Jaroszuk M, Janusz G, Matuszewska A, Stefaniuk D, Sulej J, Polak J, Ruminowicz M, Grzywnowicz K, Jarosz-Wilkolazka A. (2013) New Bioactive Fungal Molecules with High Antioxidant and Antimicrobial Capacity Isolated from *Cerrena unicolor* Idiophasic Cultures. *BioMed Research International* DOI: 10.1155/2013/497492 opisano i opublikowano wyniki badań dotyczące właściwości przeciwnowotworowych substancji pozyskanych z tego gatunku oraz jego właściwości przeciwutleniających czy przeciwbakteryjnych.

Istotą wynalazku jest frakcja całkowita z grzyba *Cerrena unicolor*, zawierająca niskocząsteczkowe metabolity wtórne o masie cząsteczkowej poniżej 10 kDa do zastosowania w zwalczaniu nicieni rodzaju *Rhabditis* sp.

Frakcja ta może znaleźć w przyszłości zastosowanie do wytwarzania nowych leków w terapii chorób pasożytniczych ludzi i zwierząt oraz zwalczaniu nicieni w rolnictwie.

**P r z y k ł a d 1.** Otrzymywanie niskocząsteczkowej frakcji C z grzyba *Cerrena unicolor* oraz hodowla nicieni z rodzaju *Rhabditis* sp.

Do opisywanych poniżej przykładów wykorzystano szczep *Cerrena unicolor* (nr 139) pochodzący z kolekcji grzybów Zakładu Biochemii UMCS w Lublinie. Szczep był przechowywany na pożywce agarowej w temp. 4°C. Do namnażania używano podłoża Lindeberg-Holm, pH 5,5. Hodowle fermentorowe grzyba prowadzono przez okres 14 dni w 28°C w bioreaktorach (BioFlo III, New Brunswick Scientific, Edison, Nowy Jork, USA) zawierających 2 litry podłoża Lindeberg-Holm. Po oddzieleniu grzybni, podłoża pohodowlane wykorzystywano do otrzymywania niskocząsteczkowych preparatów metabolitów wtórnych.

W tym celu płyn pohodowlany będący wyjściowym źródłem grzybowych preparatów niskocząsteczkowych w pierwszym etapie poddawano rozdzielaniu na membranie ultrafiltracyjnej Millipore TFF. W rezultacie otrzymano przesącz zawierający głównie związki o masie poniżej wartości odcięcia membrany ultrafiltracyjnej tj. o masie poniżej 10 kDa o objętości ok. 5500 ml. W kolejnym etapie frakcję tą poddawano zatężeniu drogą odwróconej osmozy na membranie TFC-75F (Aquafilter Inc. USA) przy użyciu urządzenia własnej konstrukcji, uzyskując zagęszczony preparat w objętości ok. 600 ml. Preparat ten zamrażano w porcjach po 50 ml w temperaturze -30°C i liofilizowano. Tak otrzymany liofilizat stanowił frakcję całkowitą wykorzystaną do dalszych badań.

Szczegółowo sposób wytwarzania tej frakcji oraz jej charakterystyka biochemiczna zostały opisane w cytowanej wyżej publikacji.

### Przykład 2

Hodowlę i ocenę żywotności nicieni z rodzaju *Rhabditis* sp. przeprowadzono wg autorskiej procedury (nr zgłoszenia patentowego P.421846, Bogucka-Kocka A., Kołodziej P., 2017) w 6-dołkowych płytkach przeznaczonych do hodowli *in vitro* na agarowej pożywce stałej przez 5 dni w temperaturze pokojowej, w celu uzyskania wszystkich form rozwojowych. Następnie nicienie wmywano z agarowego podłoża stałego przy pomocy 0,6% NaCl i наносzono na nowe sterylne płytki 24-dołkowe w celu prowadzenia hodowli na podłożu płynnym. Do hodowli na podłożu płynnym dodawano badany ekstrakt oraz mebendazol (kontrola dodatnia). Do przygotowanej hodowli na podłożu płynnym prowadzonej w sterylnych 24-dołkowych płytkach dodawano niskocząsteczkową frakcję całkowitą w następujących stężeniach: 0,444 mg/ml; 2,222 mg/ml; 6,666 mg/ml; 11,111 mg/ml; 22,222 mg/ml i pozostawiano na 24 godzinną ekspozycję w temperaturze pokojowej. Prowadzono także kontrolę ujemną z rozpuszczalnikiem – wodą oraz kontrolę dodatnią z mebendazolem. Nicienie poddane działaniu badanej niskocząsteczkowej frakcji całkowitej obserwowano w mikroskopie optycznym stereoskopowym i oceniano deformacje oraz zaburzenia ich rozwoju. Liczbę osobników żywych i martwych w hodowli płynnej liczono w komorach Bürkera.

T a b e l a. Porównanie aktywności nicieniobójczej badanego związku i obecnie stosowanego leku

L.p.	Nazwa ekstraktu	Aktywność nicieniobójcza (mg/ml±SD) po 24 godzinnej ekspozycji
		LC <sub>50</sub>
1.	Mebendazol (kontrola dodatnia)	20,0
2.	Niskocząsteczkowa frakcja całkowita	12,5

Aktywność nicieniobójcza przy stosowaniu niskocząsteczkowej frakcji całkowitej wzrosła niemal o połowę w stosunku do aktywności obecnie stosowanego leku mebendazolu.

### Zastrzeżenie patentowe

1. Zastosowanie niskocząsteczkowej frakcji całkowitej o masie cząsteczkowej poniżej 10 kDa otrzymywanej z grzyba *Cerrena unicolor* do zwalczania nicieni z rodzaju *Rhabditis* sp.