

**Zastosowanie ekstraktów nadkrytycznych (scCO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O)  
pozyskanych z roślin z rodzaju *Miscanthus* do wytwarzania  
preparatów o działaniu przeciwwirusowym i wirusobójczym.**

Przedmiotem wynalazku są ekstrakty roślinne pozyskane z roślin z rodzaju *Miscanthus* do wytwarzania preparatów o działaniu przeciwwirusowym i wirusobójczym.

Przeciwwirusowe i wirusobójcze działanie badanych ekstraktów daje podstawę do twierdzenia, że mogą one znaleźć zastosowanie w przemyśle medycznym, farmaceutycznym i weterynaryjnym.

Miskanty dzięki niewielkim wymaganiom pokarmowym można hodować nie tylko na żyznych glebach, gdzie rosną najlepiej, ale również na gruntach marginalnych [1]. Jest to szczególna grupa gatunków, o zróżnicowanych i specyficznych właściwościach biologicznych i ekologicznych. Spośród traw z rodzaju *Miscanthus* trzy gatunki uznawane są za szczególnie cenne przy produkcji biomasy: miskant olbrzymi, chiński oraz cukrowy. Do końca ubiegłego stulecia nie były postrzegane jako rośliny z potencjałem bioenergetycznym. Dopiero pod koniec lat 60-tych XX wieku po raz pierwszy zaobserwowano, że biomasa tych traw może być potencjalnym materiałem do produkcji włókien celulozowych, badane są pod kątem przydatności w uprawach bioenergetycznych oraz jako źródło nowoczesnych biopaliw ze względu na wysoką wydajność biomasy Miskantów [2,3]. Oprócz możliwości wykorzystania przy produkcji bioenergii miskanty znalazły zastosowanie w przemyśle celulozowym w produkcji papieru, opakowań, płyt z włókniny [4], do produkcji brykietów opałowych, materiałów budowlanych [5,6].

Zioła i wyciągi z traw są stosowane w medycynie naturalnej od najdawniejszych czasów. Wykorzystywane są w różny sposób, nie tylko w

formie klasycznej tabletki, ale także stosowane jako nalewki, napary, kompresy czy maści. Leki oraz suplementy zawierające ekstrakty pochodzenia naturalnego są bardziej bezpieczne i zalecane również osobom nadwrażliwym lub podatnym na alergię. W związku z narastającą opornością drobnoustrojów chorobotwórczych na leki, powiększającą się liczbą występowania działań niepożądanych wywołanych przez syntetyczne produkty lecznicze oraz brakiem skutecznej profilaktyki i farmakoterapii w zwalczaniu wirusów można zaobserwować trend powrotu do produktów pochodzenia naturalnego wykorzystanych zarówno w zapobieganiu ale i terapii farmakologicznej. W dostępnej literaturze brak jest doniesień o zastosowaniu *Miscanthus* sp. w medycynie, farmacji czy kosmetologii. Biorąc jednak pod uwagę ciągle rosnącą popularność uprawy miskantów oraz szerokie zastosowanie innych traw w różnych dziedzinach życia, jest bardzo prawdopodobne odkrycie kolejnych możliwości wykorzystania tych roślin nie tylko w przemyśle energetycznym czy ogrodnictwie [7,8].

W świetle obecnej literatury brak jest doniesień dotyczących aktywności biologicznej substancji pozyskanych z traw z rodzaju *Miscanthus*.

Lekiem z wyboru stosowanym przy zwalczaniu infekcji spowodowanych przez alphaherpeswirusy jest acyklowir [9,10]. Acyklowir jest najbardziej skutecznym i zarazem najmniej toksycznym znanym lekiem przeciwwirusowym, mimo to może powodować reakcje niepożądane. Oporność na acyklowir występuje w nie więcej niż 1% przypadków. Zazwyczaj jest wynikiem mutacji punktowej w obszarze genu kodującego kinazę tymidynową. Efektem tego jest zbyt mała produkcja enzymu lub brak zdolności enzymu do fosforylacji acyklowiru. [11,12]. Wirusy z rodziny *Herpesviridae* w tym wirus opryszczki (HSV) występuje powszechnie u ludzi na całym świecie. Wywoływane przez nie zakażenia

mogą prowadzić do zgonu lub mieć bardzo ciężki przebieg u pacjentów z poważnymi niedoborami odporności lub leczonych immunosupresyjnie.

Badania aktywności przeciwwirusowej i wirusobójczej ekstraktów prowadzono *in vitro* w hodowli komórkowej Vero (ATCC-CCL-81). Do analizy wirusologicznej został użyty wirus HSV-1 (ATCC-VR-260). Oceny cytotoksyczności ekstraktów dokonano w oparciu o test MTT, natomiast do oceny aktywności przeciwwirusowej i wirusobójczej przyjęto zdolność ekstraktu do redukcji miana wirusa.

Obecnie zwalczanie infekcji wirusowych wciąż pozostaje wyzwaniem dla współczesnej medycyny, dlatego zasadne jest poszukiwanie nowych substancji pochodzenia naturalnego wykazujących aktywność przeciwwirusową i wirusobójczą.

Istotą wynalazku są ekstrakty nadkrytyczne ( $\text{scCO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ) pozyskane z roślin z rodzaju *Miscanthus* do zastosowania jako preparaty w leczeniu chorób wirusowych u ludzi i zwierząt.

Ekstrakty z roślin z rodzaju *Miscanthus* pozyskane metodą ekstrakcji nadkrytycznej dwutlenkiem węgla ( $\text{scCO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ) do zastosowania jako preparat wirusobójczy.

Ekstrakty z roślin z rodzaju *Miscanthus* pozyskane metodą ekstrakcji nadkrytycznej dwutlenkiem węgla ( $\text{scCO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ) do zastosowania w postaci tabletek, granulek, kapsułek, drażetek, lingwetek.

Pozyskane według wynalazku nadkrytyczne ekstrakty roślinne ( $\text{scCO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ) z roślin z rodzaju *Miscanthus* wykazały silną aktywność przeciwwirusową i wirusobójczą wobec wirusa HSV-1. Badane ekstrakty mogą znaleźć zastosowanie do wytwarzania nowych leków w terapii chorób wirusowych

Przykład wykonania wynalazku

### **Proces ekstrakcji nadkrytycznej**

W procesie ekstrakcji nadkrytycznej pozyskano ekstrakty z roślin z rodzaju *Miscanthus* (*Miscanthus giganteus*, *Miscanthus sinensis*). Przed ekstrakcją surowce zwilżano wodą (do około 40% wagowo) i pozostawiano na minimum 5 godzin w zamkniętym naczyniu w celu wyrównania wilgotności w całej próbce. Proces ekstrakcji nadkrytycznej przeprowadzano z zastosowaniem dwutlenku węgla wykorzystując ciśnieniową instalację badawczą firmy SITEC. Otrzymane polarne ekstrakty rozpuszczone w wodzie odbierano w separatorze, odwirowywano i liofilizowano. Warunki przeprowadzanej ekstrakcji: temperatura równa 40°C, ciśnienie: 330 bar, zużycie dwutlenku węgla: 100 kg/kg materiału, wilgotność: zależna od próbki - od 8% do 10% wag.

### **Działanie przeciwwirusowe i wirusobójcze:**

Badania aktywności przeciwwirusowej i wirusobójczej ekstraktów prowadzono *in vitro* w hodowli komórkowej Vero (ATCC-CCL-81). Do analizy wirusologicznej został użyty wirus HSV-1 (ATCC-VR-260). Oceny cytotoksyczności ekstraktów dokonano w oparciu o test MTT, natomiast do oceny aktywności przeciwwirusowej i wirusobójczej przyjęto zdolność ekstraktu do redukcji miana wirusa. Do badań przygotowywano roztwór macierzysty ekstraktu o stężeniu 50 mg/ml DMSO.

### **Ocena cytotoksyczności**

Badane ekstrakty były rozpuszczone w DMSO do końcowego stężenia 50 mg/ml. Hodowle komórek prowadzono w plastikowych płytkach 96-dółkowych. Do płytek rozlewano po 100 µl zawiesiny komórek o gęstości  $1,5 \times 10^4$  komórek na dółek, przygotowanej w podłożu hodowlanym z dodatkiem 10% surowicy. Po 24 h inkubacji w 37°C podłoże z hodowli usuwano i dodawano roztwory badanych ekstraktów w płynie hodowlanym z dodatkiem 2% surowicy. Końcowe stężenia ekstraktów były następujące: 500; 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6; 7,8; 3,9; 2; 1, 0,5 µg/ml. Do kontroli

hodowli komórek dodawano tylko płyn hodowlany z dodatkiem 2% surowicy. Komórki poddane działaniu substancji inkubowano w 37°C w obecności 5% CO<sub>2</sub> przez 72 h.

Cytotoksyczność substancji oceniano przy użyciu kolorymetrycznego testu formazanowego MTT [13]. Na podstawie pomiarów absorbancji określano IC<sub>50</sub>, czyli stężenie badanego ekstraktu, które spowodowała o 50% spadek aktywności komórek w porównaniu z kontrolą.

### **Ocena aktywności przeciwwirusowej**

Aktywność przeciwwirusową HSV-1 określano używając 24-godzinnej hodowli komórek. Po usunięciu pożywki, dodawano do hodowli zawiesinę wirusa w dawce 100 TCID<sub>50</sub>/ml. Po 1 godzinie inkubacji w temperaturze 37°C wirusa usuwano z hodowli i płukano hodowlę roztworem PBS. Następnie dodawano do zakażonej hodowli komórek badane ekstrakty w przygotowanych rozcieńczeniach dwukrotnych od 0,5 - 500 µg/ml. Acyklowir zastosowano jako substancję referencyjną o aktywności przeciwwirusowej wobec HSV-1. Ekstrakty z roztworu wyjściowego rozcieńczano podłożem z dodatkiem 2% surowicy. Kontrolę wirusa stanowiły hodowle, do których dodawano podłoże bez dodatku ekstraktów. Po 72 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C wirus miareczkowano w hodowli komórek. Efekt cytopatyczny (CPE) oceniano w mikroskopie świetlnym a następnie przeprowadzono ocenę żywotności komórek metodą z wykorzystaniem MTT. Miano wirusa obliczano metodą Reed-Muench [14]. Aktywność zakaźną wirusa w każdym rozcieńczeniu ekstraktu porównywano z aktywnością zakaźną w kontroli wirusa.

### **Ocena aktywności wirusobójczej**

Do badania aktywności wirusobójczej ekstraktów używano 24-godzinne hodowle komórkowe linii komórkowej VERO w 96-dółkowych

plytkach. Zawiesinę wirusa HSV-1 mieszano w stosunku 1:1 z badanymi ekstraktami, które były rozcieńczone w medium hodowlanym do końcowego stężenia: 100; 50 i 25  $\mu\text{g/ml}$ . DMSO jako rozpuszczalnik w badanych stężeniach nie był toksyczny dla hodowli komórkowych oraz wirusa.

Mieszanki inkubowano w  $37^{\circ}\text{C}$  przez 1 godzinę, a następnie wirus miareczkowano w hodowli komórkowej. Rozcieńczony wirus w podłożu hodowlanym bez ekstraktu stanowił kontrolę doświadczenia. Rozcieńczenia wirusa wykonywano w postępie co 1 log od  $10^{-1}$  do  $10^{-10}$ . Z płytek z hodowlą usuwano podłoże odżywcze i dodawano odpowiednio rozcieńczone mieszaniny ekstraktów i wirusa. Do dołków z hodowlą komórkową dodawano po 100  $\mu\text{l}$  kolejnego rozcieńczenia. Do pozostałych dołków z hodowlą dodawano tylko podłoże utrzymujące z dodatkiem 2% surowicy, co stanowiło kontrolę komórek. Zakażone hodowle inkubowano w standardowych warunkach w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  w obecności 5%  $\text{CO}_2$  przez 72 godziny.

Po zakończeniu inkubacji w mikroskopie świetlnym oceniano stopień efektu cytopatycznego wywoływanego przez wirusa, a następnie przeprowadzono ocenę żywotności komórek metodą z wykorzystaniem MTT. Miano wirusów obliczano metodą Reed-Muench. Aktywność zakaźną wirusa w każdym rozcieńczeniu ekstraktu porównywano z aktywnością zakaźną w kontroli wirusa.

Tabela 1. Wpływ na replikację HSV-1 ekstraktów z traw zebranych w czerwcu

<b>Ekstrakt</b>	<b>stężenie ekstraktu [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>	<b>miano zakaźne wirusa [TCID<sub>50</sub>/ml]*</b>
<i>Miscanthus giganteus</i>	31	1,16 $\pm$ 2,01

<i>Miscanthus sinensis</i>	31	1,67±2,89
Acyklowir	125	3,73±0,35
kontrola HSV-1	0	6,68±0,29

\* miano wirusa w log<sub>10</sub>

Tabela 2. Aktywność wirusobójcza ekstraktów z traw zebranych w lutym

<b>Ekstrakt</b>	<b>stężenie ekstraktu [µg/ml]</b>	<b>miano zakaźne wirusa [TCID<sub>50</sub>/ml]*</b>
<i>Miscanthus giganteus</i>	50	1,92±1,67
	100	0,67±1,16
<i>Miscanthus sinensis</i>	100	1,3±1,47
DMSO	100	3,90±0,91
kontrola HSV-1	0	4,37±1,43

\* miano wirusa w log<sub>10</sub>

Ekstrakty otrzymane z traw zebranych w czerwcu wykazały aktywność przeciwwirusową wobec wirusa HSV-1, natomiast ekstrakty pozyskane z traw zebranych w lutym działały wirusobójczo. Oceny aktywności ekstraktów dokonano na podstawie porównania miana wirusa w hodowlach komórkowych zakażonych samym wirusem z mianem wirusa w hodowlach traktowanych wirusem w obecności ekstraktów.

1. Trąba C. Zróżnicowanie zbiorowisk trawiastych w Polsce. Łąkarstwo w Polsce. 2014, 17, 127-143.
2. Cichorz S., Gośka M., Litwiniec A. Trawy wieloletnie z rodzaju *Miscanthus*. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 2014; 274,

133-151.

3. Villaverde J., Domingues R. Miscanthus x giganteus Extractives: A Source of Valuable Phenolic Compounds and Sterols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 2009, 57, 9, 3626–3631.
4. Kozłowski S. *Trawy. Właściwości, występowanie i wykorzystanie*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne; 2012; 64-66.
5. Szulczewski W., Żyromski A., Jakubowski W., Biniak-Pieróg M. A new method for the estimation of biomass yield of giant miscanthus. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2018, 82, 2, 1787-1795.
6. Ivanyshyn V., Nedilska et al. Prospects of Growing Miscanthus as Alternative Source of Biofuel. *Ren Ene Sources: Engineering, Technol, Innovation* 2018; 801-812.
7. Pomorska-Mól M., Kwit K. Adiuwancyjne właściwości ziół. *Medycyna Wet* 2011; 67, 7, 449-452.
8. Radosz A, Klasik-Ciszewska S., Duda-Grychtoł K. Kosmetyczne i lecznicze zastosowanie roślin ozdobnych, *Med Rodz* 2018, 21, 65.
9. Figlerowicz M. Acyklowir w terapii przeciwwirusowej. *Postępy Dermatologii i Alergologii* 2003; XX, 3: 178-182.
10. Popiel M., Wietrak E., Laskus T. Opryszczkowe zapalenie mózgu. *Post Mikrobiol.* 2012; 51, 3, 185-190.
11. Bacon T. H., Levin M. J. Herpes Simplex Virus resistance to acyclovir and penciclovir after after two decades of antiviral therapy *Clin Microbiol Rev* 2003, 16, 114–128.
12. Dzieciatkowski T., Rola A., Majewska A. Solarska M., Łuczak M. Leki stosowane w leczeniu zakażeń herpeswirusami ludzi. *Post. Mikrobiol.* 2007, 46, 3, 211-221.
13. Rajtar B., Skalicka-Woźniak K., Świątek Ł., Stec A., Boguszewska A., Polz-Dacewicz M. Antiviral effect of compounds derived from *Angelica*

archangelica L. on Herpes simplex virus-1 and Coxsackievirus B3 infections. Food Chem Toxicol. 2017, 109, 1026-1031.

14. Reed L.J., Muench M.A.: A simple method of estimating fifty percent end points. Am J Hyg 1938, 27, 493-497.