

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

Przedmiotem wynalazku są ekstrakty roślinne pozyskane z roślin z rodzaju *Miscanthus* (*Miscanthus sacchariflorus*) do wytwarzania preparatów o działaniu przeciwnowotworowym.

Przeciwnowotworowe działanie badanego ekstraktu daje podstawę do twierdzenia, że może 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*.

Obecnie zwalczanie chorób nowotworowych wciąż pozostaje wyzwaniem dla współczesnej medycyny, dlatego zasadne jest poszukiwanie nowych substancji pochodzenia naturalnego wykazujących aktywność przeciwnowotworową.

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

Ekstrakt ma zastosowanie do wytwarzania preparatu w postaci tabletek, granulek, kapsułek, drażetek, lingwetek.

Pozyskany według wynalazku nadkrytyczny ekstrakt roślinny ( $\text{scCO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ) z roślin z rodzaju *Miscanthus* (*Miscanthus sacchariflorus*) wykazał silną aktywność przeciwnowotworową wobec komórek czerniaka G-361 i czerniaka A-375. Badany ekstrakt może znaleźć zastosowanie do wytwarzania nowych leków w terapii chorób nowotworowych ludzi i zwierząt.

Przykład wykonania wynalazku

#### **Proces ekstrakcji nadkrytycznej**

W procesie ekstrakcji nadkrytycznej pozyskano ekstrakt z roślin z rodzaju *Miscanthus* (*Miscanthus sacchariflorus*). 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 przeciwnowotworowe**

Badania aktywności przeciwnowotworowej ekstraktu prowadzono *in vitro* na modelach ludzkich linii komórek nowotworowych czerniaka złośliwego: linia G-361 (ATCC CRL-1424) hodowane w McCoy's 5a Medium Modified (Corning, USA) oraz linia A-375 (ATCC CRL-1619) hodowane w DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Corning, USA). Cytotoksyczność ekstraktów badano na modelu ludzkich fibroblastów skórnych BJ (ATCC CRL-2522) hodowane w EMEM Eagle's Minimum Essential Medium (Corning, USA).

### **Hodowle komórkowe**

Cytotoksyczność ekstraktu badano na modelu ludzkich fibroblastów skórnych BJ (ATCC CRL-2522). Komórki hodowano w EMEM Eagle's Minimum Essential Medium (Corning, USA).

Właściwości przeciwnowotworowe ekstraktów badano na modelach:

ludzkich linii komórek nowotworowych czerniaka złośliwego:

- linia G-361 (ATCC CRL-1424) hodowane w McCoy's 5a Medium Modified (Corning, USA).
- linia A-375 (ATCC CRL-1619) hodowane w DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Corning, USA).

Wszystkie hodowle komórkowe prowadzono w mediach wzbogaconych 10% płodową surowicą bydlęcą FBS (PanBiotech, Niemcy) oraz streptomycyną (100 µg/mL), penicyliną (100 U/mL) i amfoterycyną B (2,5 µg/mL) (Sigma, USA) w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub>.

### **Ocena żywotności komórek – test MTT**

Żywotność komórek oceniano przy pomocy testu MTT. Wykorzystuje się w nim aktywność mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej, która w żywych komórkach o niezaburzonym metabolizmie i łańcuchu oddechowym przekształca

rozpuszczalną w wodzie żółtą sól tetrazoliową MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazolowy), w formę zredukowaną, nierozpuszczalny formazan, wytrącający się w postaci fioletowych kryształów.

Komórki hodowano na płytce 96-dółkowej do uzyskania 70-80% konfluencji. Następnie wymieniano medium na nowe zawierające kolejne stężenia badanych ekstraktów (1 – 500 µg/ml) . Po 24 h inkubacji usuwano supernatant i dodawano świeże medium (200 µl/dółek) z dodatkiem MTT (4 mg/ml). Po 4 h inkubacji w 37°C zebrano roztwór MTT z nad powstałych kryształów formazanu. Następnie do każdego dółka dodawano 200 µl DMSO celem rozpuszczenia wytrąconych kryształów. Stężenie produktu końcowego oceniano mierząc absorbancję przy  $\lambda = 570$  nm. Z otrzymanych danych wyliczono odsetek żywych komórek w obecności badanego związku, przyjmując średnią absorbancję roztworu komórek kontrolnych za 100%. Wartości  $IC_{50}$  obliczono przy użyciu kalkulatora AAT Bioquest (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>).

Aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek nowotworowych potwierdzono poprzez analizę morfologii komórek obu linii czerniaka w mikroskopie kontrastowo-fazowym z odwróconą optyką Nikon Eclipse Ti. Komórki obu linii czerniaka poddano działaniu ekstraktu w stężeniu odpowiadającym wartości  $IC_{50}$ , wyznaczonej na podstawie testu MTT dla każdej z linii. Uwzględniono zmiany morfologiczne komórek tj. obecność odklejonych i martwych komórek, obkurczenie komórek, zahamowanie wzrostu kolonii i proliferacji. Obserwację porównywano z kontrolą, którą stanowiły komórki czerniaka hodowane bez dodatku ekstraktu.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono zbliżoną aktywność cytotoksyczną badanego ekstraktu w stosunku do dwóch użytych w badaniu linii komórkowych czerniaka złośliwego, przy równoczesnym braku toksyczności w stosunku do prawidłowych fibroblastów ludzkich (w zakresie zastosowanych stężeń, Tab. 1).

Tabela 1. Wartości  $IC_{50}$  ekstraktu nadkrytycznego  $CO_2$  z udziałem wody jako współrozpuszczalnika z *Miscanthus sacchariflorus*, ocenione na podstawie testu MTT

| linia komórkowa   | czerniak G-361 | czerniak A-375 | fibroblasty BJ |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|
| $IC_{50}$ [µg/ml] | 321,9          | 316,38         | >500           |

Analiza morfologii komórek wykazała, że przy stężeniu ekstraktu odpowiadającym

wartości  $IC_{50}$  komórki czerniaka linii G-361 zaczynały się kurczyć i stopniowo zmieniać swój prawidłowy wrzecionowaty kształt w bardziej zwinięty i kulisty. W podłożu hodowlanym obserwowano odklejone, martwe komórki. Podobnie w przypadku drugiej linii komórek (A-375) – obserwowano odklejone komórki o kształcie kulistym w odróżnieniu od prawidłowego obrazu "kostki brukowej" komórek kontrolnych.

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.