

Sposób otrzymywania ekstraktu z tkanek rosziczki gatunku *Drosera gigantea*, ekstrakt z tkanek rosziczki oraz zastosowanie ekstraktu jako środka biologicznie czynnego o wysokim potencjale przeciwbakteryjnym

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania ekstraktu z tkanek hodowanej w warunkach *in vitro* rosziczki gatunku *Drosera gigantea*. Wynalazek obejmuje również sam ekstrakt z tkanek rosziczki w danym rozpuszczalniku oraz zastosowanie ekstraktu jako środka biologicznie czynnego o wysokim potencjale przeciwbakteryjnym

Jak wskazuje Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, ang. World Health Organization) w swoim najnowszym raporcie [1] antybiotykooporność stanowi poważny problem w ujęciu klinicznym i ekonomicznym. Mimo wielu działań prewencyjnych, m. in. zrównoważonego użycia substancji stosowanych w antybiotykoterapii, infekcje bakteryjne są bezpośrednią przyczyną 38 000 zgonów rocznie w samych Stanach Zjednoczonych Ameryki [2]. Do szczególnie groźnych patogenów bakteryjnych człowieka należą te zaklasyfikowane do grupy ESKAPE [3] ze względu na znaczący stopień wirulencji oraz wysoką częstotliwość występowania wielolekooporności, tj. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* i *Klebsiella pneumoniae*.

Rośliny mięsożerne (dawniej owadożerne) z rodziny Droseraceae, tj. *Dionaea muscipula* i *Drosera* spp., stanowią bogate źródło metabolitów wtórnych, z których jedynie niewielka część została opisana w literaturze [4]. Najwięcej badań nad biologiczną aktywnością substancji znajdujących się w tkankach roślin owadożernych dotyczy związków z grupy naftochinonów (właściwie 1,4-naftochinonów), ze względu na ich wysokie stężenie w tkankach oraz właściwości przeciwnowotworowe [5]. Wykorzystanie naftochinonów jako biologicznie aktywnych związków w terapiach przeciwko infekcjom bakteryjnym jest jednak ograniczone ze względu na ich znaczącą cytotoksyczność wobec komórek eukariotycznych [6].

Dzięki długoletnim badaniom z Zakładzie Badania Związków Biologicznie Czynnych (Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) wyselekcjonowany został gatunek rośliny owadożernej – *Drosera gigantea* (Fig. 1) wytwarzający w swoich tkankach śladowe ilości naftochinonu tj. poniżej 100 µg związku w 1 g świeżej masy (FW – ang. fresh weight) roślinnej. Roślina ta jest endemitem i występuje w południowo-zachodniej Australii. W badaniach wykorzystuje się tkanki roślin *D. gigantea* uzyskane za pomocą standardowych technik mikrorozmnażania w sterylnych warunkach *in vitro* na syntetycznym podłożu o pH 5,5, do którego przygotowania podstawę stanowiła znana pożywka Murashige & Skoog opisana w: [7], opracowana przez Toshio Murashige i Folke Skoog w 1962 roku, którą zmodyfikowano w taki sposób, że zawiera zmniejszone o połowę stężenie makroelementów (tj. KNO_3 , KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , MgSO_4 , CaCl_2), witaminy (chlorowoderek tiaminy, chlorowoderek pirydoksyny, kwas nikotynowy, m-inozytol), glicynę, 2% sacharozy, 0,7% agaru oraz nie zawiera roślinnych regulatorów wzrostu. Rośliny hodowane są w temperaturze 22°C w sztucznych warunkach oświetlenia ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, czas naświetlania - fotoperiod: 16 godzin światła, 8 godzin ciemności).

Celem wynalazku było opracowanie sposobu uzyskania ekstraktu rosziczki o korzystnym profilu metabolitów wtórnych znajdujących zastosowanie jako środek przeciwbakteryjny. Dokonano porównania z innymi gatunkami rosziczek, co potwierdziło istotne różnice w profilu związków biologicznie czynnych przemawiające na korzyść gatunku *D. gigantea*.

W przykładach wykonania przedstawione zostały wyniki badań potwierdzające skuteczność przeciwbakteryjnego działania mieszaniny metabolitów wtórnych uzyskanych z tkanek *D. gigantea*, które w odróżnieniu od naftochinonów i zawierających je ekstraktów z tkanek innych gatunków roślin owadożernych, nie wykazują działania toksycznego wobec żywych organizmów.

Literatura:

1. 2019 ANTIBACTERIAL AGENTS IN CLINICAL DEVELOPMENT: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline. In. Geneva, Switzerland: WHO; 2019.
2. CDC: Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. In. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services; 2019.
3. Rice LB: Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis* 2008, 197(8):1079-1081.
4. Hatcher CR, Ryves DB, Millett J: The function of secondary metabolites in plant carnivory. *Ann Bot* 2020, 125(3):399-411.
5. Wellington KW: Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones - a review. *Rsc Advances* 2015, 5(26):20309-20338.
6. Widhalm JR, Rhodes D: Biosynthesis and molecular actions of specialized 1,4-naphthoquinone natural products produced by horticultural plants. *Hortic Res* 2016, 3:16046.
7. Murashige T, Skoog F: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Phys Plant* 1962, 15: 473-497.

Przedmiotem wynalazku jest metoda pozyskiwania ekstraktu z tkanek rosziczki gatunku *D. gigantea*, tj. całej rośliny wraz z korzeniami, o unikalnej kompozycji związków biologicznie czynnych właściwych dla gatunku *D. gigantea*, który posiada wysoki potencjał antybakteryjny, zwłaszcza do zastosowania farmakologicznego jako leku. Wykorzystany do ekstrakcji gatunek produkuje śladowe ilości cytotoksycznego naftochinonu tj. maksymalnie 100 µg plumbaginy w 1 g świeżej masy (FW, ang. fresh weight) roślinnej.

Wynalazek dotyczy sposobu uzyskiwania ekstraktu w postaci suchej pozostałości zawierającej metabolity wtórne z całej części rośliny z gatunku *Drosera gigantea* pozyskanej techniką mikrorozmnażania w sterylnych warunkach *in vitro*, gdzie ekstrakt uzyskuje się w rozpuszczalniku stanowiącym wodę. W pierwszym etapie roślinę przygotowuje się poprzez oczyszczenie materiału

roślinnego i zmrozenie tkanki, a następnie umieszcza się oczyszczony materiał w wodzie i poddaje się działaniu mikrofal przez minimum 2 i maksimum 10 minut, następnie inkubuje się przez czas minimum 30 minut i maksimum 2 godziny w temperaturze pokojowej. Stosuje się stosunek masy rośliny do wody 5 g świeżej masy FW (świeża masa) przypadającej w 100 mL – w zależności od ilości. Uzyskany ekstrakt filtruje się i odparowuje z niego wodę, korzystnie w procesie liofilizacji w celu uzyskania suchej pozostałości składającej się z metabolitów wtórnych. Sposób obejmuje uzyskanie suchej pozostałości zawierającej metabolity wtórne, jednakże nie stanowi to ograniczenia w przypadku uzyskania płynnego roztworu, gdyż suchą pozostałość następnie można rozpuścić w medium uzyskując dane stężenie. Według drugiego sposobu uzyskiwania ekstraktu w postaci suchej pozostałości zawierającej metabolity wtórne z całej części rośliny z gatunku *D. gigantea* stosuje się rozpuszczalnik - 50% roztwór tetrahydrofuranu w wodzie, zaś w pierwszym etapie roślinę przygotowuje się poprzez oczyszczenie materiału roślinnego i zmrozenie tkanki. Następnie umieszcza się ją w 50% roztworze tetrahydrofuranu. Stosuje się stosunek masy rośliny do rozpuszczalnika 1 g świeżej masy FW w 10 mL 50% roztworu tetrahydrofuranu w wodzie – w zależności od użytych ilości. Poddaje się działaniu ultradźwięków, po czym wysala się przez dodanie chlorku sodu w celu uzyskania frakcji metabolitów wtórnych rozpuszczonych w tetrahydrofuranie i po zwirowaniu z zebranej frakcji odparowuje się rozpuszczalnik w celu uzyskania suchej pozostałości składającej się z metabolitów wtórnych. Sposób obejmuje uzyskanie suchej pozostałości zawierającej metabolity wtórne, jednakże nie stanowi to ograniczenia w przypadku uzyskania płynnego roztworu, gdyż, suchą pozostałość następnie można rozpuścić w medium uzyskując dane stężenie.

Wynalazek obejmuje również kompozycję, tj. ekstrakt z gatunku *D. gigantea*, otrzymaną opracowaną metodą oraz zastosowanie jej jako środka o działaniu antibakteryjnym wobec bakterii *S. aureus*, *E. faecalis* i *A. baumannii*, jak również wobec *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*. Efektywność w zakresie 3 ostatnich jest obserwowana po zastosowaniu zwiększonych dawek - wyższych niż 128 mg FW/mL. 128 mgFW/mL i powyżej to zatem dawka działająca hamująco na *E. coli*,

P. aeruginosa, *K. pneumoniae*, zaś na *S. aureus*, *E. faecali* i *A. baumannii* hamująco działają dawki poniżej 128 mg FW/mL, tj. jak potwierdzono w przykładzie odpowiednio dawka 32, 64 i 64 mg FW/mL.

Ekstrakt ten to ekstrakt wodny lub uzyskany w 50% roztworze tetrahydrofuranu. Według wynalazku stosuje się konkretne wytypowane na podstawie badań ekstrakty wykazujące działanie.

Wodny ekstrakt masy roślinnej rosiczki z gatunku *D. gigantea* pozyskanego techniką mikrorozmnażania w sterylnych warunkach *in vitro*, ma zastosowanie jako środek przeciwbakteryjny wobec *Staphylococcus aureus* lub *Enterococcus faecalis* lub *Acinetobacter baumannii* lub *Escherichia coli* lub *Pseudomonas aeruginosa* lub *Klebsiella pneumoniae*. Ekstrakt masy roślinnej rosiczki z gatunku *D. gigantea* pozyskanego techniką mikrorozmnażania w sterylnych warunkach *in vitro*, rozpuszczony w 50% tetrahydrofuran ma zastosowanie jako środek przeciwbakteryjny wobec *Staphylococcus aureus* lub *Escherichia coli*.

Według wynalazku ekstrakt z *D. gigantea* zawiera śladowe ilości znanego składnika ekstraktów z tkanek roślin owadożernych (naftochinonu – plumbaginy) tj. zawiera maksymalnie 100 µg związku w 1 g świeżej masy roślinnej. Średnie stężenie naftochinonu w ekstraktach z *D. gigantea* uzyskanych w 50% tetrahydrofuranie i w wodzie jest odpowiednio nawet 44 i 38-krotnie niższe niż w przypadku pozostałych gatunków roślin owadożernych.

Wynalazek opisano w przykładach potwierdzających skuteczność metody oraz działanie wybranych ekstraktów - kompozycji.

Wynalazek zobrazowano na rysunku, na którym pokazano jak poniżej.

Fig. 1. Zdjęcia przedstawiające pokrój roślin z gatunku *Drosera gigantea* uzyskanych metodą mikrorozmnażania w hodowlach *in vitro* w Zakładzie Badania Związków Biologicznie Czynnych na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. A – kultura *in*

vitro po wyjęciu z naczynia hodowlanego; B – pokrój pojedynczej rośliny (podziałka: 1 mm); C – bulwy (podziałka: 1 mm); D – kwiat; E – liść ze zwiniętymi włoskami gruczołowymi; F – pokrój liścia z rozwiniętymi włoskami wydzielniczymi.

Fig. 2. Porównanie profili metabolitów wtórnych w ekstraktach z tkanek wybranych gatunków roślin owadożernych uzyskanych w 50% tetrahydrofuranie. Na rycinie znajdują się chromatogramy dla (od góry): *Dionaea muscipula*, *Drosera intermedia*, *Drosera binata*, *Drosera gigantea* i wzorca naftochinonu (plumbaginy).

Fig. 3. Porównanie profili metabolitów wtórnych w wodnych ekstraktach z tkanek wybranych gatunków roślin owadożernych. Na rycinie znajdują się chromatogramy dla (od góry): *D. muscipula*, *D. intermedia*, *D. binata*, *D. gigantea* i wzorca naftochinonu (plumbaginy).

Fig. 4. Porównanie aktywności bakteriobójczej ekstraktów uzyskanych w 50% tetrahydrofuranie z tkanek wybranych gatunków roślin owadożernych. Minimalne stężenia bakteriobójcze (MBC) wyrażono jako stężenie naftochinonu (NCH) w jednostce objętości wyznaczone eksperymentalnie dla każdego ekstraktu za pomocą techniki HPLC. Aktywność ustalono względem referencyjnych szczepów bakterii gram-dodatnich (*S. aureus* ATCC 25923) i gram-ujemnych (*E. coli* ATCC 25922).

Fig. 5. Porównanie aktywności bakteriobójczej ekstraktów wodnych z tkanek wybranych gatunków roślin owadożernych. Minimalne stężenia bakteriobójcze (MBC) wyrażono jako stężenie naftochinonu (NCH) w jednostce objętości wyznaczone eksperymentalnie dla każdego ekstraktu za pomocą techniki HPLC. Aktywność ustalono względem referencyjnych szczepów bakterii gram-dodatnich (*S. aureus* ATCC 25923) i gram-ujemnych (*E. coli* ATCC 25922).

Fig. 6. Porównanie potencjału ekstraktów z tkanek roślin owadożernych do hamowania wzrostu gronkowca złocistego (*S. aureus* ATCC 25923) na podłożu stałym. A – hodowla kontrolna (murawa bakteryjna na powierzchni pożywki, na którą centrycznie nałożono kroplę 1% gumy ksantanowej); F – murawa bakteryjna poddana działaniu kropli 1% gumy ksantanowej zawierającej 0,5 $\mu\text{g/mL}$

plumbaginy. B – E i G – K reprezentują wyniki uzyskane dla murawy bakteryjnej poddanej działaniu ekstraktów roślinnych w stężeniu znormalizowanym do 0,5 µg plumbaginy na mL zawieszonych w 1% gumie ksantanowej. B – ekstrakt wodny z *D. muscipula*, C – ekstrakt wodny z *D. intermedia*, D – ekstrakt wodny z *D. binata*, E – ekstrakt wodny z *D. gigantea*. G – ekstrakt uzyskany w 50% tetrahydrofuranie z tkanek *D. muscipula*, H – ekstrakt uzyskany w 50% tetrahydrofuranie z tkanek *D. intermedia*, I – ekstrakt uzyskany w 50% tetrahydrofuranie z tkanek *D. binata*, K – ekstrakt uzyskany w 50% tetrahydrofuranie z tkanek *D. gigantea*.

Fig. 7. Porównanie potencjału ekstraktów z tkanek roślin owadożernych do hamowania wzrostu pałeczki okrężnicy (*E. coli* ATCC 25922) na podłożu stałym. A – hodowla kontrolna (murawa bakteryjna na powierzchni pożywki, na którą centrycznie nałożono kroplę 1% gumy ksantanowej); F – murawa bakteryjna poddana działaniu kropli 1% gumy ksantanowej zawierającej 0,5 µg/mL plumbaginy. B – E i G – K reprezentują wyniki uzyskane dla murawy bakteryjnej poddanej działaniu ekstraktów roślinnych w stężeniu znormalizowanym do 0,5 µg plumbaginy na mL zawieszonych w 1% gumie ksantanowej. B – ekstrakt wodny z *D. muscipula*, C – ekstrakt wodny z *D. intermedia*, D – ekstrakt wodny z *D. binata*, E – ekstrakt wodny z *D. gigantea*. G – ekstrakt uzyskany w 50% tetrahydrofuranie z tkanek *D. muscipula*, H – ekstrakt uzyskany w 50% tetrahydrofuranie z tkanek *D. intermedia*, I – ekstrakt uzyskany w 50% tetrahydrofuranie z tkanek *D. binata*, K – ekstrakt uzyskany w 50% tetrahydrofuranie z tkanek *D. gigantea*.

Fig. 8. Profile metabolitów wtórnych zawartych w tkankach *D. gigantea* wyizolowanych za pomocą różnych metod ekstrakcji. Na rycinie znajdują się chromatogramy (od góry): ekstraktu etanolowego, ekstraktu metanolowego, ekstraktu 2-propanolowego, ekstraktu chloroformowego, ekstraktu tetrahydrofuranowego, ekstraktu uzyskanego w 50% tetrahydrofuranie, ekstraktu wodnego oraz wzorca naftochinonu (plumbaginy).

Fig. 9. Toksyczność ekstraktów z tkanek roślin owadożernych wobec hodowli nicieni z gatunku *Caenorhabditis elegans*. THF – tetrahydrofuran.

Przykład

Materiał roślinny. Jako materiał roślinny w badaniach wykorzystano tkanki czterech gatunków roślin owadożernych, tj. *Dionaea muscipula*, *Drosera intermedia*, *Drosera binata* i *Drosera gigantea* pozyskane w procesie mikrorozmnażania. Hodowle wymienionych gatunków roślin zostały wprowadzone do warunków *in vitro* z nasion pozyskanych do 2000 roku i stanowią obecnie część kolekcji Zakładu Badania Związków Biologicznie Czynnych (Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed). Hodowle roślin prowadzono w kontrolowanych warunkach, tj. w temperaturze 22°C, przy stałym oświetleniu (25 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperiod: 16 godzin światła, 8 godzin ciemności) na syntetycznym podłożu Murashige & Skoog zmodyfikowanym w ten sposób, że zawiera zmniejszone o połowę stężenie makroelementów (tj. 950 mg/L KNO_3 , 85 mg/L KH_2PO_4 , 825 mg/L NH_4NO_3 , 185 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 220 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 19 mg/L $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 14 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), mikroelementy (tj. 6,2 mg/L H_3BO_3 ; 22,3 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 8,6 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,83 mg/L KI; 0,25 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,025 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,025 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), glicynę (2 mg/L), witaminy (tj. 0,1 mg/L chlorowodoru tiaminy, 0,5 mg/L chlorowodoru pirydoksyny, 0,5 mg/L kwasu nikotynowego, 100 mg/L m-inozytolu), 2% sacharozy oraz 0,7% agaru, a jej pH wynosi 5,5. Można stosować gotowe mieszaniny soli nieorganicznych i poszczególne składniki pożywki różnych producentów np. Sigma Aldrich, Duchefa Biochemie. Po 6 miesiącach hodowli rośliny wyciągano w całości z hodowli, płukano w wodzie dejonizowanej w celu usunięcia pozostałości pożywki, delikatnie osuszano, a następnie przechowywano w szczelnie zamkniętych polipropylenowych woreczkach strunowych w temperaturze -20°C.

Metody ekstrakcji materiału roślinnego. Jako ekstrahenty w procedurach ekstrakcji tkanek roślinnych wykorzystano czyste do analizy (Chempur) rozpuszczalniki organiczne (etanol, metanol, 2-propanol, chloroform, tetrahydrofuran), wodę ultraczystą (system PURELAB Classic, ELGA LabWater) oraz 50% roztwór tetrahydrofuranu (w wodzie). Ekstrakcję z wykorzystaniem etanolu, metanolu,

chloroformu i tetrahydrofuranu przeprowadzono za pomocą wspomaganej ultradźwiękami inkubacji w rozpuszczalniku, poprzedzonej maceracją materiału roślinnego. W procedurze 1 g świeżej masy roślinnej (FW, ang. fresh weight), tj. zamrożonej tkanki roślin owadożernych, miądzono w moździerz, a następnie umieszczano w szczelnie zamykanym szklanym naczyniu zawierającym 40 mL danego rozpuszczalnika. Próbkę poddawano działaniu ultradźwięków (30 Hz, 30 minut), a następnie filtrowano przez bibułę (Whatman I). Rozpuszczalnik odparowywano, a suchą pozostałość rozpuszczano w 5 mL tego samego rozpuszczalnika. Przed wykorzystaniem ekstraktów w testach biologicznych, z ekstraktu odparowywano rozpuszczalnik. Suchą pozostałość rozpuszczano we właściwym medium (pożywce bakteryjnej). Ekstrakcję z wykorzystaniem 50% roztworu tetrahydrofuranu w wodzie przeprowadzano metodą wspomaganą wysalaniem. W tym celu 1 g zamrożonej tkanki roślinnej (1 g FW) umieszczano w szklanym pojemniku zawierającym 10 mL 50% roztworu tetrahydrofuranu w wodzie. Po zakręceniu pojemnika próbkę poddawano działaniu ultradźwięków (30 Hz, 30 minut), a następnie za pomocą pęsety usuwano tkankę roślinną. Z kolei płynną zawartość pojemnika umieszczano w probówkach wirowniczych o objętości 15 mL i dodawano do nich 2 g chlorku sodu (cz.d.a., Chempur). Próbki mieszano poprzez intensywne potrząsanie i wirowano przez 5 minut (4000 rcf). Górną frakcję o objętości około 5 mL stanowiącą metabolity wtórne rozpuszczone w tetrahydrofuranie zbierano uzyskując ostateczny ekstrakt. Przed wykonaniem analiz biologicznych z ekstraktu odparowywano tetrahydrofuran w strumieniu ciepłego powietrza (50°C) w wyciągu laboratoryjnym, a suchą pozostałość rozpuszczano w stosownej do testów bakteryjnych pożywce. Ekstrakty wodne uzyskiwano poprzez umieszczenie 5 g zamrożonej tkanki roślinnej (5 g FW) w 100 mL wrzącej wody ultraczystej znajdującej się w szczelnie zamykanych szklanych butelkach. Po zamknięciu, zawartość butelek pozostawiano w temperaturze pokojowej do całkowitego wystygnięcia. Uzyskany ekstrakt filtrowano (Whatman I), a następnie liofilizowano (-80°C) do uzyskania suchej pozostałości, którą rozpuszczano w minimalnej objętości jałowej wody ultraczystej. Wszystkie ekstrakty przechowywano w temperaturze -20°C. Stężenie ekstraktów zostało wyrażone w

gramach FW (świeżej masy roślinnej użytej podczas ekstrakcji) na jednostkę objętości (mL).

Analizy fitochemiczne. W celu zbadania różnic w profilach metabolitów roślin owadożernych oraz ustalenia stężenia plumbaginy, tj. związku z grupy naftochinonów (NCH) uznawanego za główny składnik ekstraktów z roślin owadożernych o aktywności biologicznej, przeprowadzono analizy z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC, ang. High-Performance Liquid Chromatography). Wykorzystano aparaturę Nexera X2 UHPLC System (Shimadzu) wyposażony w pompę (LC-20AD), autosampler (SIL-20AC XR), degazer eluentu (DGU-20A5R), termostat kolumn (CTO-10AS VP) oraz detektor z matrycą diodową (SPD-M20A 5R). Analizy przeprowadzono w temperaturze 22°C z wykorzystaniem kolumny Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 50 mm oraz fazy mobilnej złożonej z metanolu z 1% kwasu trifluorooctowego (A) i wody z 1% kwasu trifluorooctowego (B) przepływającej przez kolumnę z prędkością 1 mL/min. Na kolumnę nastrzykiwano objętość ekstraktu odpowiadającą objętości uzyskanej z 0,5 mg FW, tj. świeżej masy roślinnej. Program elucji przebiegał z zastosowaniem fazy mobilnej o następujących proporcjach A do B: i) 10-20% (2 min), ii) 20-40% (1 min), iii) 40 % (10 minut), iv) 40-80% (5 min), v) 80-90% (2 min), vi) 90% (5 min). Detekcji metabolitów wtórnych dokonywano przy długości fali 254 nm. Stężenie plumbaginy w ekstraktach ustalano za pomocą metody wzorca zewnętrznego, tj. wyznaczając krzywą kalibracyjną dla zależności między znanym stężeniem czystego związku (Sigma Aldrich), a sygnałem detektora dla jego czasu retencji ($R_t \sim 17$ min) przy długości fali 254 nm.

Analiza aktywności przeciwbakteryjnej. Badania przeprowadzono na następujących szczepach ludzkich patogenów bakteryjnych należących do grupy ESKAPE: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 i *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe ekstraktów ustalano za pomocą dwóch metod: i) metody mikrorozcieńczeń badanych czynników w płynnej pożywce mikrobiologicznej, ii) zmodyfikowanej metody dyfuzyjnej Kirby-Bauer'a [9].

Eksperymenty prowadzone metodą mikrorozcieńczeń pożywki w polistyrenowych jałowych płytkach 96-dołkowych wykorzystano w celu ustalenia minimalnych stężeń ekstraktów hamujących wzrost bakterii (MIC, ang. Minimal Inhibitory Concentration) oraz minimalnych stężeń bakteriobójczych ekstraktów (MBC, ang. Minimal Bactericidal Concentration) według wskazówek Clinical and Laboratory Standards Institute. Ekstrakty rozcieńczano w pożywce Mueller-Hinton'a suplementowanej kationami (CA-MHB, ang. Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth; Beckton Dickinson) do uzyskania następującego gradientu stężeń w przeliczeniu na mg FW (świeżej masy roślinnej) na 1 mL: 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4. Do dołków na płytce 96-dołkowej zawierających po 100 μ L pożywki zawierającej ekstrakt roślinny dodawano 10 μ L zawiesiny komórek bakteryjnych w późnej fazie wzrostu logarytmicznego (hodowla 6-godzinna w pożywce CA-MHB) zawierającej około 1×10^6 JTK (jednostek tworzących kolonie) w 1 mL (w przypadku wyznaczenia stężenia MIC) lub około $2,5 \times 10^5$ JTK/mL (w celu oznaczenia stężenia MBC). Po 24-godzinnej inkubacji w 37°C ustalano stężenia MIC ekstraktów, tj. najniższe stężenia hamujące wzrost bakterii w dołkach płytki polistyrenowej lub stężenie MBC, tj. najniższe stężenie redukujące o 99,9% początkową liczbę JTK znajdujących się w dołkach płytki polistyrenowej. Metodę dyfuzyjną Kirby-Bauer'a wykorzystano w celu ustalenia potencjału ekstraktów roślinnych do hamowania wzrost bakterii. Modyfikacja metody polegała na zastąpieniu krążków z antybiotykami kroplami jałowego żelu z 1% gumy ksantanowej (Sigma Aldrich) zawierającymi ekstrakty roślinne o stężeniu znormalizowanym do stężenia plumbaginy równego 0,5 μ g/mL. Na powierzchni pożywki CA-MHB zestalonej przez dodatek 1,5% agaru (Sigma Aldrich) rozprowadzano zawiesinę bakteryjną zawierającą komórki w późnej fazie wzrostu logarytmicznego (hodowle 6-godzinne w pożywce CA-MHB) za pomocą jałowych wymazówek. Następnie centrycznie nanoszono 100 μ L żelu zawierającego badany ekstrakt w formie kropli. Szalki Petriego zawierające tak przygotowaną pożywkę inkubowano przez 24 godziny w 37°C. Po tym czasie mierzono wielkość stref zahamowania wzrostu bakterii i wykonywano dokumentację fotograficzną.

Analiza toksyczności ekstraktów. W celu wstępnego zbadania bezpieczeństwa stosowania ekstraktów roślinnych wykorzystano nicienie *Caenorhabditis elegans*

jako modelowe żywe organizmy. Analizy toksyczności wykonano z użyciem hodowli osobników hermafrodytycznych *C. elegans* szczepu N2 (Bristol) pozyskanego z Caenorhabditis Genetic Center (University of Minnesota, Twin Cities, USA). Kultury w pożywce S complete suplementowanej *Escherichia coli* OP50 zawierające nicienie w stadium larwalnym L4 uzyskiwano na drodze izolacji jaj w podchlorynie sodu i synchronizacji hodowli. W dołkach jałowych polistyrenowych płytek 48-dołkowych umieszczano po 100 μ L pożywki zawierającej około 30 nicieni i dodawano po 100 μ L roztworów ekstraktów w pożywce w stężeniu odpowiadającym MBC wobec *S. aureus* ATCC 25923. Po 24 godzinach inkubacji w 25°C w dołkach zliczano liczbę żywych i martwych nicieni wykorzystując powiększenie stereomikroskopu (Leica MZ10f) w celu określenia ich przeżywalności, a tym samym toksyczności zastosowanych dawek ekstraktów.

Wyniki

Na Fig. 1. przedstawiono fragmenty oraz pokrój całych roślin z gatunku *Drosera gigantea* uzyskiwanych na drodze mikrorozmnazania w hodowlach in vitro w Zakładzie Badania Związków Biologicznie Czynnych na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Wygląd osobników w hodowli in vitro i pokrój pojedynczej rośliny przedstawia odpowiednio Fig. 1A i 1B. Z kolei na Fig. 1C pokazano mikrobulwki wytwarzane przez *D. gigantea*, a na Fig. 1D kwiat *D. gigantea*. Jak wskazano na Fig. 1F gatunek ten posiada właściwe dla roślin mięsożernych liście pułapkowe z włoskami gruczołowymi, które zwijają się w wyniku pojawienia się na ich powierzchni ofiary (Fig. 1E). W warunkach hodowli in vitro (Fig. 1A) osobniki gatunku *D. gigantea* osiągają rozmiar od około 0,5 do 4 cm (Fig. 1B). Jak wskazują dotychczasowe analizy fitochemiczne przeprowadzone w Zakładzie Badania Związków Biologicznie Czynnych, MWB UG i GUMed, rośliny z gatunku *D. gigantea* znacznie różnią się od innych gatunków roślin mięsożernych pod względem zawartości metabolitów wtórnych (Tabela 1, Fig. 2 i 3). Tabela 1 przedstawia średnią zawartość naftochinonu plumbaginy w ekstraktach wodnych i uzyskanych w 50% tetrahydrofuranie z tkanek wybranych gatunków roślin mięsożernych. Z kolei na Fig. 2 i 3 umieszczono chromatogramy reprezentujące profile metabolitów wtórnych

właściwe dla ekstraktów uzyskanych z badanych gatunków roślin w 50% tetrahydrofuranie (Fig. 2) lub w wodzie (Fig. 3), których detekcji dokonano przy długości fali 254 nm w czasie retencji od 0 do 25 minut z wykorzystaniem HPLC. Jak wskazują dane w Tabeli 1 w porównaniu do innych roślin mięsożernych, tj. muchołówki amerykańskiej (*D. muscipula*), występującej w Europie rosiczki pośredniej (*D. intermedia*) oraz rosnącej w Australii i Nowej Zelandii rosiczki dwudzielnej (*D. binata*), rośliny *D. gigantea* syntetyzują w swoich tkankach jedynie niewielkie ilości naftochinonu ($0,29 \pm 0,09$ lub $14,44 \pm 6,46$ μg plumbaginy w 1 mL ekstraktu, co skutkuje mniej niż 100 μg związku w przeliczeniu na 1 gram świeżej tkanki roślinnej). Jak wskazano na Fig. 2 i 3 ekstrakty uzyskane z tkanek *D. gigantea* charakteryzują się odrębnym od innych gatunków roślin owadożernych profilem metabolitów wtórnych pod względem jakościowym (obecność sygnałów dla związków, których brak w ekstraktach z pozostałych gatunków) i ilościowym (niższy sygnał dla związków obecnych w pozostałych gatunkach, np. dla naftochinonu plumbaginy). Zarówno w ekstraktach wodnych, jak również w wyciągach uzyskanych w obecności tetrahydrofuranu zdolnego do rozpuszczania substancji polarnych i niepolarnych, średnie stężenie naftochinonu w tkankach *D. gigantea* jest odpowiednio nawet 44 i 38-krotnie niższe w porównaniu do pozostałych gatunków roślin (Tabela 1).

W odniesieniu do świeżej masy roślinnej (FW) użytej podczas ekstrakcji do przygotowania ekstraktu w danym rozpuszczalniku aktywność bakteriobójcza ekstraktów z tkanek *D. gigantea* wobec bakterii gram-dodatnich (*S. aureus*) i gram-ujemnych (*E. coli*) jest od 4 do 8 razy niższa niż aktywność wyciągów z roślin o wysokiej zawartości naftochinonu (Tabela 2). Odniesienie stężenia ekstraktu do świeżej masy użytej podczas procedury ekstrakcji jest jednak jednostką relatywną. Na Fig. 4 i 5 umieszczono wyniki analiz właściwości przeciwbakteryjnych ekstraktów w przeliczeniu na stężenie zawartej w nich plumbaginy. Zarówno w przypadku ekstraktów uzyskanych w 50% tetrahydrofuranie (Fig. 4), jak również ekstraktów wodnych (Fig. 5), bakteriobójcze stężenie naftochinonu w preparatach uzyskanych z *D. gigantea* jest średnio 10 razy niższe niż w preparatach z innych gatunków roślin mięsożernych. Przeprowadzona następnie standaryzacja stężeń ekstraktów z badanych gatunków roślin względem zawartości naftochinonu

pozwoiliła ustalić rzeczywisty potencjał innych związków zawartych w badanych tkankach roslinnych. Fig. 6 i 7 przedstawiajĄ zdjecia hodowli bakteryjnych (odpowiednio *S. aureus* i *E. coli*) w formie murawy na pozywce stałej, które poddano działaniu wodnych ekstraktów w gumie ksantanowej zadanych centrycznie na powierzchnię hodowli. Wyłącznie dla ekstraktu wodnego z tkanek *D. gigantea* (Fig. 6E) obserwuje się znaczącą strefę zahamowania wzrostu *S. aureus* o średniej wielkości 29 ± 1 mm. W przypadku murawy *E. coli* ten sam ekstrakt nie wykazuje aktywności hamującej (Fig. 7), co wynika bezpośrednio z jego umiarkowanych właściwości przeciwbakteryjnych wobec tego patogenu (MBC wynosiło 256 mg/mL) w porównaniu do *S. aureus* (Tabela 2). Ekstrakt wodny z tkanek *D. gigantea* wykazuje bowiem znaczącą aktywność przeciwbakteryjną wobec *S. aureus*, *E. faecalis* i *A. baumannii* (MIC poniżej 128 mg FW/mL), ale również wykazuje aktywność umiarkowaną wobec *E. coli*, *P. aeruginosa* i *K. pneumoniae* (MIC powyżej 128 mg/mL) jak wskazano w Tabeli 4.

W celu optymalizacji procesu pozyskiwania biologicznie aktywnych substancji z tkanek *D. gigantea* przygotowano wyciągi uzyskane wybranymi metodami ekstrakcji, a następnie poddano je analizie mikrobiologicznej i fitochemicznej. Najwyższą aktywnością bakteriobójczą wobec modelowych bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych charakteryzują się ekstrakty wodne, tj. ekstrakty uzyskane poprzez zalanie 5 g zmrożonej tkanki roślinnej 100 mL wody ultraczystej, podgrzaniu mieszaniny do wrzenia za pomocą mikrofal przez od 2 do 10 minut i odstawieniu do ostygnięcia na od 30 minut do 2 godzin, a następnie przefiltrowaniu przez bibułę Whatman I i liofilizacji w celu zateżenia oraz ekstrakty uzyskane w 50% tetrahydrofuranie (Tabela 3), tj. ekstrakty uzyskane poprzez umieszczenie 1 g tkanki w 10 mL 50% roztworu tetrahydrofuranu w wodzie ultraczystej, poddaniu mieszaniny w szczelnie zamkniętym szklanym naczyniu działaniu ultradźwięków o częstotliwości 30 Hz przez 30 minut, usunięcie tkanki roślinnej, dodanie 2 g chlorku sodu do uzyskanego roztworu, poddanie go wytrząsaniu w celu rozpuszczenia soli i wirowaniu przez 5 minut przy prędkości 4000 rcf, a następnie zebraniu górnej frakcji roztworu stanowiącej metabolity wtórne rozpuszczone w tetrahydrofuranie i usunięcie tetrahydrofuranu na drodze odparowania w strumieniu ciepłego powietrza (50°C) w wyciągu laboratoryjnym i zawieszenie suchej pozostałości w medium

hodowlanym lub w wodzie. Minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) ekstraktów uzyskanych w innych niż woda i tetrahydrofuran rozpuszczalnikach nie zostało wykazane wobec *E. coli* (MBC > 256 mg FW/mL). Ekstrakty uzyskane w wodzie i w 50 % roztworze tetrahydrofuranu wykazywały działanie bakteriobójcze wobec *E. coli* w bardzo wysokim stężeniu, tj. 256 mg FW/mL. Analogiczny trend obserwowano przy zastosowaniu ekstraktów wobec *S. aureus*, z tą różnicą, że wszystkie ekstrakty poza ekstraktem chloroformowym działały bakteriobójczo wobec tego patogenu w niskich dawkach, tj. od 32 do 64 mg FW/mL. Najwyższą aktywnością charakteryzowały się ekstrakty wodne i uzyskane w 50% tetrahydrofuranie (MBC = 32 mg FW/mL). Ekstrakt chloroformowy z kolei nie wykazał działania również wobec *S. aureus* (MBC > 256 mg FW/mL). Pomimo zbliżonych profili metabolitów wtórnych do ekstraktów uzyskiwanych w 50% tetrahydrofuranie (co wykazały analizy chromatograficzne przedstawione na Fig. 8), ekstrakty etanolowe, metanolowe, 2-propanolowe wykazują niższą aktywności przeciwbakteryjną (Tabela 3). Z kolei ekstrakty chloroformowe charakteryzujące się znaczną zawartością naftochinonu, nie wykazują aktywności przeciwbakteryjnej wobec żadnego z badanych patogenów (Tabela 3), co potwierdza znaczenie innych niż naftochinon związków dla obserwowanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Na tej podstawie wybrano najbardziej efektywne ekstrakty jako wynalazek. Ze względu na korzystny stosunek aktywności ekstraktu i zawartości cytotoksycznego naftochinonu ekstrakcja w wodzie jest najbardziej optymalną procedurą uzyskiwania aktywnych biologicznie substancji z tkanek *D. gigantea*. Użycie zatem ekstraktu wodnego jest najlepszym wariantem wynalazku. Aktywność przeciwbakteryjną ekstraktu wodnego ustalono również wobec panelu bakteryjnych patogenów z grupy ESKAPE (Tabela 4). Mieszanina związków zawartych w ekstrakcie wykazuje silne właściwości przeciwbakteryjne wobec bakterii gram-dodatnich (*S. aureus*, *E. faecalis*) oraz bakterii gram-ujemnej (*A. baumannii*). W przypadku pozostałych gatunków bakterii gram-ujemnych (*E. coli*, *P. aeruginosa* i *K. pneumoniae*) mieszanina ta wykazuje umiarkowane działanie przeciwbakteryjne (MIC wynosi od 128 do 256 mg FW/mL).

Analizy toksyczności ekstraktów z tkanek roślin owadożernych wobec nicieni *C. elegans* potwierdziły wysoki potencjał farmakologiczny ekstraktów wodnych i

uzyskanych w 50% tetrahydrofuranie (Fig. 9). Jak pokazuje Fig. 9 przedstawiająca toksyczność ekstraktów wodnych i uzyskanych w 50% tetrahydrofuranie z tkanek czterech gatunków roślin mięsożernych, wyłącznie ekstrakty z tkanek *D. gigantea* nie wykazują toksyczności wobec hodowli nicieni. Unikalna kompozycja związków zawartych w tkankach *D. gigantea* wykazująca aktywność przeciwbakteryjną wobec wielu bakteryjnych patogenów, nie jest toksyczna wobec organizmów żywych.

Tabela 1. Porównanie stężenie naftochinonu (NCH) w ekstraktach z tkanek wybranych gatunków roślin owadożernych uzyskiwanych w wodzie lub w 50% tetrahydrofuranie.

Gatunek rośliny	Stężenie NCH w ekstrakcie ($\mu\text{g/mL}$)			
	Woda		50% THF	
	AV	SD	AV	SD
<i>Dionaea muscipula</i>	12,96	7,14	556,65	253,39
<i>Drosera intermedia</i>	11,41	4,08	494,80	269,77
<i>Drosera binata</i>	4,73	0,13	429,33	99,14
<i>Drosera gigantea</i>	0,29	0,09	14,44	6,46

NCH – naftochinon (plumbagina); THF – tetrahydrofuran; AV – wartość średnia z trzech powtórzeń biologicznych ekstrakcji; SD – odchylenie standardowe dla trzech powtórzeń biologicznych ekstrakcji.

Tabela 2. Porównanie aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów wodnych i uzyskanych w 50% tetrahydrofuranie z tkanek wybranych gatunków roślin owadożernych wobec bakterii gram-dodatnich (*S. aureus*) i gram-ujemnych (*E. coli*).

Gatunek rośliny	Minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) ekstraktu (mg FW/mL)			
	wobec <i>S. aureus</i> *		wobec <i>E. coli</i> **	
	W	50%THF	W	50%THF
<i>Dionaea muscipula</i>	8	8	32	64
<i>Drosera intermedia</i>	4	8	32	32
<i>Drosera binata</i>	8	8	64	64
<i>Drosera gigantea</i>	32	32	256	256

FW – świeża masa roślinna (masa zmrożonej tkanki roślinnej); * – szczep ATCC 25923; ** – szczep ATCC 25922; W – ekstrakty uzyskane w wodzie; 50%THF – ekstrakty uzyskane w 50% tetrahydrofuranie.

Tabela 3. Porównanie wydajności różnych metod ekstrakcji materiału roślinnego gatunku *D. gigantea* w odniesieniu do stężenia naftochinonu (NCH) oraz aktywności przeciwbakteryjnej uzyskanych preparatów.

Rozpuszczalnik	Stężenie NCH ($\mu\text{g/mL}$)	Minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) ekstraktu (mg FW/mL)	
		wobec <i>S. aureus</i> *	wobec <i>E. coli</i> **
Etanol	$6,30 \pm 3,81$	64	>256
Metanol	$8,84 \pm 2,72$	64	>256
2-propanol	$4,53 \pm 0,87$	64	>256
Chloroform	$7,48 \pm 2,65$	>256	>256
Tetrahydrofuran	$11,14 \pm 6,34$	64	256
50%	$14,44 \pm 6,46$	32	256
Woda	$0,29 \pm 0,09$	32	256

FW – świeża masa roślinna (masa zmrożonej tkanki roślinnej); NCH – naftochinon (plumbagina);

* – szczep ATCC 25923; ** – szczep ATCC 25922;

Tabela 4. Aktywność preparatu z tkanek *Drosera gigantea* uzyskanego na drodze ekstrakcji w wodzie wobec wybranych patogenów człowieka reprezentujących grupę ESKAPE, tj. najgroźniejszych z klinicznego punktu widzenia gatunków bakterii charakteryzujących się wielolekoopornością.

Patogen	MIC (mg FW/mL)	MBC (mg FW/mL)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	16	32
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	64	128
<i>E. coli</i> ATCC 25922	128	256
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	256	>256
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	64	128
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	128	>256

FW – świeża masa roślinna (masa zmrożonej tkanki roślinnej); MIC – minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii; MBC – minimalne stężenie bakteriobójcze.