

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 owadożernih 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<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>), witaminy (chlorowodorek tiaminy, chlorowodorek 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 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 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 rosiczki 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 całych roślin z gatunku *Drosera gigantea* pozyskanych techniką mikrorozmnażania w sterylnych warunkach *in vitro*, gdzie ekstrakt uzyskuje się w rozpuszczalniku stanowiącym 50% roztwór tetrahydrofuranu w wodzie. W pierwszym etapie roślinę przygotowuje się poprzez oczyszczenie materiału roślinnego z pozostałości pożywki i zmrożenie tkanki. Następnie umieszcza się ją w 50% roztworze tetrahydrofuranu w wodzie. Stosuje się stosunek masy rośliny do rozpuszczalnika 1 g świeżej masy FW w 10 mL 50% roztworu tetrahydrofuranu w wodzie, a tym samym objętość roztworu dostosowuje

się do użytej masy roślinnej. Tkanę roślinną zanurzoną w roztworze tetrahydrofuranu w wodzie poddaje się działaniu ultradźwięków, po czym wysala się przez dodanie chlorku sodu w celu wydzielenia frakcji wodnej wysyczonej chlorkiem sodu, frakcji organicznej i frakcji metabolitów wtórnych rozpuszczonych w tetrahydrofuranie. Proces wydzielenia frakcji usprawnia się poprzez zwirowanie mieszaniny przy prędkości 2800 rcf przez 5 minut, a z zebranej frakcji tetrahydrofuranowej zawierającej metabolity wtórne 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, gdyż suchą pozostałość można następnie rozpuścić w dowolnym rozpuszczalniku lub dowolnej mieszaninie zawierającej rozpuszczalnik uzyskując płynny roztwór o pożądanym stężeniu.

Wynalazek obejmuje również kompozycję, tj. ekstrakt z gatunku *D. gigantea*, otrzymaną opracowaną metodą oraz zastosowanie jej jako środka o działaniu antybakteryjnym wobec bakterii *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Efektywność wobec *E. coli* jest obserwowana po zastosowaniu zwiększonej dawki od 128, tj. 256 mg FW/mL, natomiast wobec *S. aureus* poniżej 128 tj. 32 mgFW/mL jak opisano w przykładzie i w Tabeli 2.

Ekstrakt ten to ekstrakt uzyskany w 50% roztworze tetrahydrofuranu. Według wynalazku stosuje się konkretny wytypowany na podstawie badań ekstrakt wykazujący działanie.

Ekstrakt uzyskany w 50% roztworze tetrahydrofuranu z masy roślinnej rosiczki z gatunku *D. gigantea* pozyskanej techniką mikrorozmnażania w sterylnych warunkach *in vitro* 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% roztworze

tetrahydrofuranu w wodzie jest nawet 38-krotnie niższe niż w przypadku pozostałych gatunków roślin owadożernych, co opisano dokładnie w przykładzie i pokazano w Tabeli 1.

Wynalazek opisano w przykładach potwierdzających skuteczność metody oraz działanie wybranych ekstraktów, tj. 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% roztworze tetrahydrofuranu w wodzie. Na rycinie znajdują się chromatogramy dla (od góry): *Dionaea muscipula*, *Drosera intermedia*, *Drosera binata*, *Drosera gigantea* i wzorca naftochinonu (plumbaginy).

Fig. 3. Porównanie aktywności bakteriobójczej ekstraktów uzyskanych w 50% tetrahydrofuranie w wodzie 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. 4. Porównanie potencjału ekstraktów z tkanek roślin owadożernych uzyskanych w 50% roztworze tetrahydrofuranu w wodzie do hamowania wzrostu gronkowca

złocistego (*S. aureus* ATCC 25923) na podłożu stałym. A – murawa bakteryjna poddana działaniu kropli 1% gumy ksantanowej zawierającej 0,5 µg/mL plumbaginy. B – E 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 z *D. muscipula*, C – ekstrakt z *D. intermedia*, D – ekstrakt z *D. binata*, E – ekstrakt z *D. gigantea*.

Fig. 5. Porównanie potencjału ekstraktów z tkanek roślin owadożernych uzyskanych w 50% roztworze tetrahydrofuranu w wodzie do hamowania wzrostu pałeczki okrężnicy (*E. coli* ATCC 25922) na podłożu stałym. A – murawa bakteryjna poddana działaniu kropli 1% gumy ksantanowej zawierającej 0,5 µg/mL plumbaginy. B – E 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 z *D. muscipula*, C – ekstrakt z *D. intermedia*, D – ekstrakt z *D. binata*, E – ekstrakt z *D. gigantea*.

Fig. 6. 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% roztworze tetrahydrofuranu w wodzie oraz wzorca naftochinonu (plumbaginy).

Fig. 7. Toksyczność ekstraktów z tkanek wybranych gatunków roślin owadożernych uzyskanych w 50% roztworze tetrahydrofuranu w wodzie wobec hodowli nicieni z gatunku *Caenorhabditis elegans*.

#### 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  $\text{KNO}_3$ , 85 mg/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 825 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 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  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 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, miażdżono w moździerzu, 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 kolejną płynną zawartość pojemnika umieszczano w probówkach wirowniczych o objętości 15 mL i dodawano do nich 2 g chlorku sodu (cz.d.a., Chempur). Próbkę 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) pod wyciągiem laboratoryjnym, a suchą pozostałość rozpuszczano w stosownej do testów bakteryjnych pożywce. 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 cieczowej (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 trifluoroctowego (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  $\mu$ L pożywki zawierającej ekstrakt roślinny dodawano 10  $\mu$ L zawiesiny komórek bakteryjnych w późnej fazie wzrostu logarytmicznego (hodowla 6-godzinna w pożywce CA-MHB) zawierającej około  $1 \times 10^6$  JTK (jednostek tworzących kolonie) w 1 mL (w przypadku wyznaczania stężenia

MIC) lub około  $2,5 \times 10^5$  JTK/mL (w celu oznaczenia stężenia MBC). Po 24-godzinnej inkubacji w  $37^\circ\text{C}$  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  $0,5 \mu\text{g/mL}$ . 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  $100 \mu\text{L}$  żelu zawierającego badany ekstrakt w formie kropli. Szalki Petriego zawierające tak przygotowaną pożywkę inkubowano przez 24 godziny w  $37^\circ\text{C}$ . 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  $100 \mu\text{L}$  pożywki zawierającej około 30 nicieni i dodawano po  $100 \mu\text{L}$  roztworów ekstraktów w pożywce w stężeniu odpowiadającym MBC wobec *S. aureus* ATCC 25923. Po 24 godzinach inkubacji w  $25^\circ\text{C}$  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 mikrorozmnażania 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). Tabela 1 przedstawia średnią zawartość naftochinonu plumbaginy w ekstraktach z tkanek wybranych gatunków roślin mięsożernych pozyskanych w 50% roztworze tetrahydrofuranu w wodzie. Z kolei na Fig. 2 umieszczono chromatogramy reprezentujące profile metabolitów wtórnych właściwe dla ekstraktów uzyskanych z badanych gatunków roślin uzyskanych tą właśnie metodą (Fig. 2), których detekcji dokonano przy długości fali 254 nm w czasie retencji od 0 do 25 minut z wykorzystaniem techniki 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, tj. 1 mL ekstraktu wodnego zawiera  $14,4 \pm 6,46$   $\mu\text{g}$  plumbaginy jak wykazano w Tabeli 1. W związku z tym, że 1 mL ekstraktu uzyskanego w 50% roztworze tetrahydrofuranu w wodzie zawiera metabolity wtórne odpowiadające 200 mg świeżej tkanki roślinnej, stężenie plumbaginy uzyskane w przypadku ekstrakcji z wykorzystaniem 50% roztworu tetrahydrofuranu w wodzie wynosi mniej niż 100  $\mu\text{g}$  związku w przeliczeniu na 1 gram świeżej tkanki roślinnej. Wynika to z obliczeń na podstawie danych zawartych w Tabeli 1. Jak wskazano na

Fig. 2 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). Średnie stężenie naftochinonu w ekstraktach z tkanek *D. gigantea* pozyskanych w 50% roztworze tetrahydrofuranu w wodzie jest nawet 38-krotnie niższe w porównaniu do pozostałych gatunków roślin co wynika z Tabeli 1. Wynik ten świadczy o efektywności wynalazku.

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. 3 umieszczono wyniki analiz właściwości przeciwbakteryjnych ekstraktów w przeliczeniu na stężenie zawartej w nich plumbaginy. Bakteriobójcze stężenie naftochinonu w preparatach uzyskanych z *D. gigantea* z użyciem 50% roztworu tetrahydrofuranu w wodzie 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 pozwoliła ustalić rzeczywisty potencjał innych związków zawartych w badanych tkankach roślinnych. Fig. 4 i 5 przedstawiają zdjęcia hodowli bakteryjnych (odpowiednio *S. aureus* i *E. coli*) w formie murawy na pożywce stałej, które poddano działaniu ekstraktów zawieszonych w gumie ksantanowej zadanych centrycznie na powierzchnię hodowli. Dla żadnego z badanych ekstraktów nie zaobserwowano właściwości hamujących wobec patogenów bakteryjnych. Pomimo, że wynik ten wskazuje, że ekstrakt pozyskany z użyciem rozpuszczalnika jakim jest 50% roztwór tetrahydrofuranu w wodzie nie jest aktywny wobec *S. aureus* i *E. coli*, to inne badania potwierdzają dużą skuteczność wynalazku.

W celu optymalizacji procesu pozyskiwania biologicznie aktywnych substancji z tkanek *D. gigantea* przygotowano wyciągi uzyskane wybranymi metodami

ekstrakcji, a następnie poddano je analizie mikrobiologicznej (Tabela 3) i fitochemicznej (Fig. 6). Najwyższą aktywnością bakteriobójczą wobec modelowych bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych charakteryzują się 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 usunięcia wody oraz zawieszenia suchej pozostałości w medium hodowlanym lub w wodzie. Pomimo zbliżonych profili metabolitów wtórnych do ekstraktów uzyskiwanych w 50% tetrahydrofuranie (co wykazały analizy chromatograficzne przedstawione na Fig. 6), ekstrakty etanolowe, metanolowe, 2-propanolowe wykazują niższą aktywności przeciwbakteryjną (Tabela 3). Ekstrakty uzyskane z tkanek *D. gigantea* z wykorzystaniem 50% roztworu tetrahydrofuranu w wodzie wykazują najwyższą aktywność spośród badanych ekstraktów, tzn. ich minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) wynosi odpowiednio 32 i 256 mg FW/mL jak wskazano w Tabeli 3. W przypadku zastosowania wobec *S. aureus* wszystkie ekstrakty (poza ekstraktem chloroformowym) działały bakteriobójczo wobec tego patogenu w niskich dawkach, tj. od 32 do 64 mg FW/mL. Najwyższą aktywnością wobec *S. aureus* charakteryzowały się ekstrakty uzyskane w 50% roztworze tetrahydrofuranu w wodzie (MBC = 32 mg FW/mL). Ekstrakty chloroformowe charakteryzujące się znaczną zawartością naftochinonu, nie wykazują aktywności przeciwbakteryjnej wobec żadnego z badanych patogenów (Tabela 3, Fig. 6), tzn. ich stężenie MBC było wyższe niż 256 mg FW/mL, co potwierdza znaczenie innych niż naftochinon związków dla obserwowanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Na tej podstawie wybrano najbardziej efektywny ekstrakt jako wynalazek. Ze względu na korzystną aktywność ekstraktu i największą zawartość naftochinonu ekstrakcja w 50% roztworze tetrahydrofuranu w wodzie jest optymalną procedurą uzyskiwania metabolitów wtórnych, w tym aktywnych biologicznie substancji z tkanek *D. gigantea*. Użycie zatem ekstraktu uzyskanego w 50% roztworze tetrahydrofuranu w wodzie jest najlepszym wariantem wynalazku w przypadku pozyskiwania związków o działaniu przeciwbakteryjnym i związków z grupy naftochinonów.

Analizy toksyczności ekstraktów z tkanek roślin owadożernych wobec nicieni *C. elegans* potwierdziły wysoki potencjał farmakologiczny ekstraktów z tkanek *D. gigantea* uzyskanych w 50% roztworze tetrahydrofuranu w wodzie (Fig. 7). Jak pokazuje Fig. 7 przedstawiająca toksyczność ekstraktów z tkanek czterech gatunków roślin mięsożernych uzyskanych w roztworze 50% tetrahydrofuranu w wodzie, wyłącznie ekstrakty z tkanek *D. gigantea* nie wykazują toksyczności wobec hodowli nicieni. Unikalna kompozycja związków zawartych w tkankach *D. gigantea* wykazująca aktywność przeciwbakteryjną bakteryjnych patogenów gram-dodatnich i gram-ujemnych, nie jest znacząco toksyczna wobec organizmów żywych.

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

Gatunek rośliny	Stężenie NCH w ekstrakcie ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	AV	SD
<i>Dionaea muscipula</i>	556,65	253,39
<i>Drosera intermedia</i>	494,80	269,77
<i>Drosera binata</i>	429,33	99,14
<i>Drosera gigantea</i>	14,44	6,46

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

Tabela 2. Porównanie aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów uzyskiwanych w 50% roztworze tetrahydrofuranu w wodzie z tkanek wybranych gatunków roślin owadożernych wobec bakterii gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*) i gram-ujemnych (*Escherichia coli*).

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

FW – świeża masa roślinna (masa zmrożonej tkanki roślinnej); \* – szczep ATCC 25923; \*\* – szczep ATCC 25922.

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
100% tetrahydrofuran	$11,14 \pm 6,34$	64	256
50% tetrahydrofuran	$14,44 \pm 6,46$	32	256

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

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