

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **231698**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **413017**

(22) Data zgłoszenia: **03.07.2015**

(51) Int.Cl.

A61K 36/185 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

(54) **Ekstrakt z nasion ślazuwca pensylwańskiego *Sida hermaphrodita* do zastosowania
w zwalczaniu zakażeń powodowanych przez grzyba *Candida albicans***

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

16.01.2017 BUP 02/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

29.03.2019 WUP 03/19

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet
MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ, Lublin, PL
UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**KINGA LEWTAK, Lubartów, PL
MARTA FIOŁKA, Lublin, PL
JOLANTA RZYMOWSKA, Lublin, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Maria Brodzicka

PL 231698 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowe medyczne zastosowanie ekstraktu białkowego z nasion ślazuca pensylwańskiego *Sida hermaphrodita*, z rodziny *Malvaceae*, do leczenia zakażeń grzybiczych wywołanych grzybem z rodzaju *Candida*.

Ślazowiec pensylwański *Sida hermaphrodita*, to wieloletnia roślina zielna, znajdująca głównie zastosowanie gospodarcze jako źródło biomasy w przemyśle energetycznym lub do otrzymywania włókien, co opisano np. w publikacji Borkowska i Styk, II Nat. Since Conf. „Forest-Wood-Ecology 95” t. I, 1995; Denisiuk, Inżynieria Rolnicza t. 6, 2005.

Z publikacji Ahmad i wsp., Journal of Ethnopharmacology t. 62, 1998; Medeiros i wsp., Fitoterapia t. 77, 2006; Sutradhar i wsp., Journal of Biological Sciences t. 6, 2006, znane są właściwości przeciwbakteryjne, antyoksydacyjne, przeciwbólowe czy przeciwzapalne roślin przynależących do rodziny *Malvaceae*, takich jak, *Althaea officinalis*, *Malva rotundifolia*, *Sida cordata*, *Sida acuta*.

Rośliny te znalazły zastosowanie w terapii różnorodnych dolegliwości, od gorączki po choroby układu krążenia.

Grzyby z rodzaju *Candida*, głównie *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* czy *C. parapsilopsis* to najpowszechniej atakujące ludzi patogeny grzybowe, wywołujące bardzo trudne do zwalczenia zakażenia, dotyczące ponad jedną trzecią populacji krajów rozwiniętych co przedstawiono w publikacji Moran i wsp., Microbiology, doi:10.1155/2012/205921, 2012.

Dotychczas, zbadano aktywność w kierunku hamowania wzrostu komórek grzyba *C. albicans*, ekstraktów przygotowanych na bazie octanu etylu i eteru etylowego z liści, łodyg, pędów i korzeni *Sida acuta*. Wyniki aktywności frakcji flawonoidów wyselekcjonowanych z takich ekstraktów, ujawniono m.in. w publikacji autorstwa Jindal i wsp., International Journal of Drug Discovery and Research, t. 4, 2012.

Z kolei działanie ekstraktów metanolowych i chloroformowych pozyskanych z liści *S. acuta*, ujawniono w publikacji Akilandeswari i wsp., International Journal of Pharma Science and Research, t. I, 2010.

Znana jest również bójcza i hamująca wzrost grzyba *C. albicans* na podłożu stałym, aktywność ekstraktów uzyskanych z innej rośliny – *Sida cordifolia*. Badania wodnego ekstraktu z liści oraz chloroformowego i naftowego ekstraktu z nasion, wykonano metodą dyfuzyjno-krażkową i ujawniono w publikacjach Serasanambati i wsp., International Research Journal of Pharmacy, t. 3, 2012 oraz Temikar i wsp., Journal of Cell and Tissue Research, t. 10, 2010.

Autorzy publikacji Ouédraogo i wsp., Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials t. 11, 2012, wykonując oznaczenia minimalnego stężenia hamującego i minimalnego stężenia grzybobójczego, przedstawili działanie alkaloidów pochodzących z chloroformowego ekstraktu z *S. cordifolia*.

Z pracy autorstwa Navaneethakrishnan i wsp., Asian Journal of Plant Science and Research, t. 1, 2011, wiadome jest działanie hamujące wzrost *C. albicans* na podłożu stałym, etanolowego ekstraktu z liści innej rośliny z rodziny *Malvaceae* – *Sida spinosa*.

Jak wynika z przytoczonych wyżej publikacji, wykazano wprawdzie grzybobójcze działanie ekstraktów z niektórych roślin z rodziny *Malvaceae*, jednakże nie znalazły one powszechnego i skutecznego zastosowania do leczenia lekoopornych, ogólnoustrojowych kandydoz, a co niezwykle ważne, nie przebadano działania tego rodzaju ekstraktów na komórki prawidłowe – fibroblasty.

W publikacjach Ternikar i wsp., Journal of Cell and Tissue Research, t. 10, 2010, a także Ouédraogo i wsp., Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials t. 11, 2012, opisano wręcz badania, toksycznego wpływu ekstraktu chloroformowego i naftowego, otrzymanych z nasion *Sida cordifolia* oraz alkaloidów uzyskanych z jej ekstraktów. Podanie drogą doustną (oralną) myszom, ekstraktu z nasion powodowało ich śmiertelność w dawce powyżej 2000 mg na kg masy ciała, a podanie ekstraktu z innej części rośliny *Sida cordifolia*, wywołało śmierć połowy badanych zwierząt przy dawce powyżej 3,4 g na kg masy ciała.

Jak wiadomo z prac autorstwa Cannon i wsp., Microbiology, t. 153, 2007 oraz Mishra i wsp., Acta Microbiologia Immunologica Hungarica, t. 54, 2007, dotychczasowa medycyna nie dysponuje dostatecznie skutecznymi lekami, zwłaszcza w leczeniu ogólnoustrojowej kandydozy, co jest nadal poważnym problemem medycznym powodującym wysoką umieralność pacjentów z osłabionym układem odpornościowym, po chemioterapii nowotworów, przy AIDS, czy też przyjmujących leki immunosupresyjne. Terapia grzybic zarówno skórnych jak i układowych utrudniona jest przez wzrastającą oporność *C. albicans* oraz innych gatunków grzybów należących do tego samego rodzaju na antybiotykoterapię.

Z prac Macura i Pawlik, Zarys mikologii dla pielęgniarek, 2005 oraz Seferyńska i wsp., Acta Haematologica Polonica t. 36, 2005, wiadomo, że najsilniej działającym z dotychczas poznanych leków

przeciwgrzybiczych jest amfoterycyna B, która pozostaje wciąż lekiem pierwszego rzutu w terapii układowych zakażeń grzybiczych. Jej stosowanie jest ograniczone jednak znaczną toksycznością narządową, dlatego też zasadne jest poszukiwanie nowych, naturalnych źródeł aktywności przeciwgrzybowej.

W znanym stanie techniki, nie opisano działania ekstraktu białkowego z nasion *Sida hermaphrodita* na komórki *C. albicans* przy jednoczesnym braku toksyczności na fibroblasty.

Celem wynalazku było opracowanie preparatu roślinnego do skutecznego leczenia zakażeń u ludzi powodowanych grzybem *Candida albicans*, który nie wykazywałby działania toksycznego na komórki prawidłowe.

W trakcie badań nad ekstraktami roślinnymi nieoczekiwanie otrzymano ekstrakt białkowy z nasion *Sida hermaphrodita*, wykazujący istotną aktywność przeciwgrzybową przy jednoczesnym braku toksyczności na fibroblasty.

Istotą wynalazku jest ekstrakt białkowy otrzymany z nasion ślazuwca pensylwańskiego do zastosowania w zwalczaniu zakażeń powodowanych przez grzyba *Candida albicans*.

Dla potwierdzenia istotnego efektu przeciwgrzybowego wynalazku przeprowadzono badania *in vitro* z udziałem komórek *Candida albicans*, zaś jednoczesny brak cytotoxyczności w stosunku do komórek prawidłowych udowodniono na przykładzie fibroblastów mysich.

Wynalazek i jego skuteczność w zastosowaniu medycznym przedstawiono w poniższych przykładach wykonania.

P r z y k ł a d 1

Otrzymywanie ekstraktu białkowego z nasion ślazuwca pensylwańskiego

Nasiona ślazuwca pensylwańskiego odważono w ilości 1 g, a następnie poddano płukaniu w szeregu: woda destylowana, 70% alkohol etylowy, woda destylowana, jałowa woda destylowana. Tak przygotowane nasiona roztarto z dodatkiem 20 ml buforu Sørensen'a o pH = 6,4 w ręcznym homogenizatorze szklanym. Uzyskaną zawiesinę przeniesiono do probówek typu Eppendorf i zamrożono. Probówki wraz z materiałem roślinnym umieszczono w ciekłym azocie na 10 minut, a następnie przeniesiono na 10 minut do lodu. Po rozmrożeniu materiał roślinny ponownie zhomogenizowano. Wymieniony szereg czynności powtórzono trzykrotnie.

Otrzymane zawiesiny odwirowano w temperaturze pokojowej przy obrotach 14 000 rpm przez 15 minut. Uzyskany supernatant zebrano i przesączono przez sączek Millipore o średnicy porów 0,22 μm w celu pozbawienia go zanieczyszczeń mikrobiologicznych. Przesącz przeniesiono w ilościach po 0,7 ml do probówek typu Eppendorf, zamrożono i poddano liofilizacji. Następnie uzyskany liofilizat rozpuszczano w jałowej wodzie destylowanej w celu uzyskania ekstraktu o określonym stężeniu białka równym 2 mg/ml.

P r z y k ł a d 2

Działanie ekstraktu białkowego z nasion ślazuwca pensylwańskiego na komórki *C. albicans*

Badanie działania ekstraktu z nasion ślazuwca pensylwańskiego na komórki grzyba *C. albicans*, wykonano prowadząc inkubację komórek szczepu dzikiego *C. albicans* z ekstraktem otrzymanym w przykładzie 1. Założono 5 hodowli: hodowlę kontrolną komórek *C. albicans* bez dodatku ekstraktu oraz 4 hodowle komórek grzyba z ilościami ekstraktu o różnych stężeniach białka.

Hodowle prowadzono na podłożu YPD z dodatkiem antybiotyku siarczanu streptomycyny w stężeniu 0,17 mg/ml, w termostacie przy temp. 37°C, z funkcją mieszania 120 rpm. Wyjściowa gęstość komórek *C. albicans* w hodowli wynosiła $1,9\text{--}2,0 \times 10^9$.

W trakcie badań do każdej z hodowli dodawano ekstrakt według wynalazku w proporcjach: na 200 μl hodowli – 12,5 μl ; 25 μl ; 50 μl i 100 μl ekstraktu, uzyskując stężenie białka odpowiednio: 25 $\mu\text{g/ml}$; 50 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$ i 200 $\mu\text{g/ml}$. Po 72 godzinach inkubacji, wykonano test LIVE/DEAD Yeast Viability Kit F-7030 FUN 1 (Life Technologies) umożliwiający określenie aktywności metabolicznej komórek grzyba *C. albicans*.

Procent komórek aktywnych metabolicznie w stosunku do kontroli stanowiącej 100% takich komórek, przedstawiono na rysunku w tabeli 1 (*różnice istotne statystycznie dla $P < 0,01$, określone testem T studenta). Wyniki wskazują, iż ekstrakt z nasion ślazuwca według wynalazku, uszkadzał komórki *C. albicans*, prowadząc do obniżenia lub utraty ich aktywności metabolicznej, przejawiającej się zaburzeniami w rozmnażaniu i licznymi deformacjami, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórek. Zmniejszenie aktywności metabolicznej komórek grzyba o ponad 50% w stosunku do komórek z hodowli kontrolnej następuje już w przypadku dawki ekstraktu o najniższym stężeniu białka (25 $\mu\text{g/ml}$). Najwyższą skuteczność ekstraktu uzyskano przy dawce o stężeniu białka 100 $\mu\text{g/ml}$, gdzie ekstrakt spowodował obniżenie aktywności metabolicznej komórek *C. albicans* o 75% w stosunku

do hodowli kontrolnej. Słabszy efekt działania ekstraktu przy wyższym stężeniu białka – 200 µg/ml jest spowodowany zlepianiem się komórek w agregaty ograniczające dostęp ekstraktu do wszystkich komórek grzyba.

Zmiany morfologiczne komórek *C. albicans* w poszczególnych hodowlach o zróżnicowanym stężeniu białka jak wyżej, wywołane działaniem ekstraktu po 72 godzinach inkubacji, obserwowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (Vega 3 Tescan) i mikroskopu konfokalnego fluorescencyjnego (Zeiss/Axiovert 200 M), po barwieniu barwnikiem calcofluor-white.

Obrazy mikroskopowe oznaczone na rysunku jako fig. 1. przedstawiają kolejno hodowle po 72 h:

A – kontrolną komórek *C. albicans*;

B – komórek *C. albicans* po inkubacji z ekstraktem o stężeniu białka 25 µg/ml; komórki powiększone w stosunku do komórek hodowli kontrolnej;

C – komórek *C. albicans* po inkubacji z ekstraktem o stężeniu białka 50 µg/ml; komórki zdeformowane;

D – komórek *C. albicans* po inkubacji z ekstraktem o stężeniu białka 100 µg/ml, komórki zdeformowane i pękające z uszkodzoną ścianą komórkową.

Obrazy mikroskopowe oznaczone na rysunku – fig. 2. przedstawiają kolejno hodowle po 72 h:

A – kontrolną komórek *C. albicans*;

B – komórek *C. albicans* po inkubacji z ekstraktem o stężeniu białka 25 µg/ml; komórki o zgrubiałych ścianach komórkowych powiększone w stosunku do komórek hodowli kontrolnej;

C – komórek *C. albicans* po inkubacji z ekstraktem o stężeniu białka 50 µg/ml; komórki połączone w łańcuszki, nie mogące od siebie oddzielić się;

D – komórek *C. albicans* po inkubacji z ekstraktem o stężeniu białka 100 µg/ml; komórki olbrzymie ze zgrubieniami w ścianie komórkowej widocznymi jako jaśniejsze miejsca.

P r z y k ł a d 3

Oznaczanie cytotoksyczności ekstraktu białkowego z nasion ślazuwca pensylwańskiego według wynalazku w stosunku do prawidłowych fibroblastów mysich

Badania cytotoksycznego działania ekstraktu według wynalazku, wykonano prowadząc hodowle linii fibroblastów mysich pochodzenia tłuszczowego ECACC 85011425. Założono 4 hodowle zawierające fibroblasty wraz z ekstraktami o różnych stężeniach białka oraz hodowlę kontrolną fibroblastów bez dodatku ekstraktu. Wszystkie hodowle prowadzono w inkubatorze, na podłożu RPMI 1640 z dodatkiem 8% FBS oraz antybiotyków – penicyliny i streptomycyny, w standardowych warunkach: temp. 37°C, 90% wilgotności i atmosferze z 5% zawartością CO₂. Wyjściowa gęstość komórek w hodowli wynosiła 10⁴ komórek na 1 ml podłoża. Do każdej z hodowli dodawano odpowiednio na 1 jej mililitr – 12,5 µl; 25 µl; 50 µl; 100 µl ekstraktu, uzyskując stężenie białka w płynie odpowiednio: 25 µg/ml; 50 µg/ml; 100 µg/ml i 200 µg/ml. Po inkubacji trwającej 24, 48 i 72 godziny, do hodowanych komórek dodawano trypsynę, celem całkowitego oderwania komórek od naczynia hodowlanego, a następnie błękit trypanu dla zabarwienia komórek martwych. Liczono ilość martwych i żywych fibroblastów w komorze Bürkera. Badanie powtarzano trzykrotnie.

Cytotoksyczne działanie ekstraktu według wynalazku, wyraża procent martwych komórek w odniesieniu do próby kontrolnej – fibroblastów nie inkubowanych z ekstraktem. Wyniki przedstawiono na rysunku w tabeli 2. W celu określenia zmian morfologicznych wykonano obserwacje z użyciem mikroskopu świetlnego Carl Zeiss Axiovert 40 CFL (powiększenie 200 x).

Obrazy mikroskopowe oznaczone na rysunku – fig. 3 przedstawiają kolejno hodowle po 72 h:

A – kontrolną fibroblastów;

B – fibroblastów po inkubacji z ekstraktem o stężeniu białka 100 µg/ml, wykazującym najwyższą skuteczność obniżenia lub utraty aktywności metabolicznej komórek grzyba; brak zmian morfologicznych komórek prawidłowych.

Wyniki uzyskane po 72 godzinach inkubacji komórek fibroblastów z ekstraktem z nasion *S. hermaphrodita* o różnych stężeniach białka świadczą o braku działania cytotoksycznego badanego ekstraktu na komórki prawidłowe.

Ekstrakt z nasion *Sida hermaphrodita* wykazuje działanie przeciugrzybowe wobec komórek *Candida albicans* przy jednoczesnym braku cytotoksyczności w stosunku do fibroblastów – prawidłowych komórek skóry myszy, co predysponuje go do zastosowania w zwalczaniu zakażeń wywołanych tym grzybem.

Zastrzeżenie patentowe

1. Ekstrakt białkowy otrzymany z nasion ślazuwca pensylwańskiego *Sida hermaphrodita* do zastosowania w zwalczaniu zakażeń powodowanych przez grzyba *Candida albicans*.

Rysunki

Tabela 1

Hodowla komórek grzyba z dawkami ekstraktu o różnym stężeniu białka	Relatywna aktywność metaboliczna (%)
kontrola	100
25 µg/ml	48*
50 µg/ml	37*
100 µg/ml	25*
200 µg/ml	32

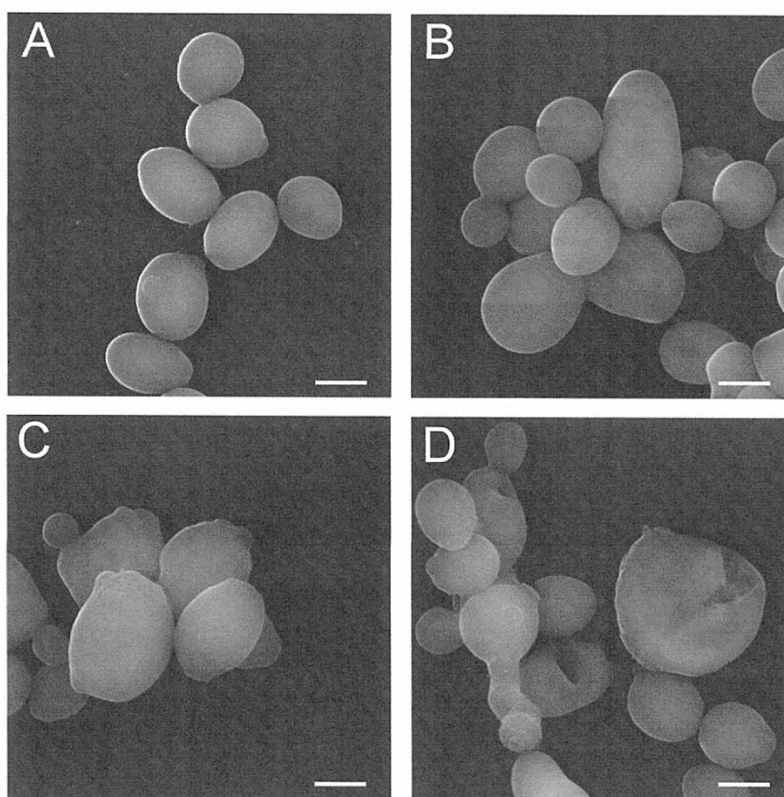


Fig. 1

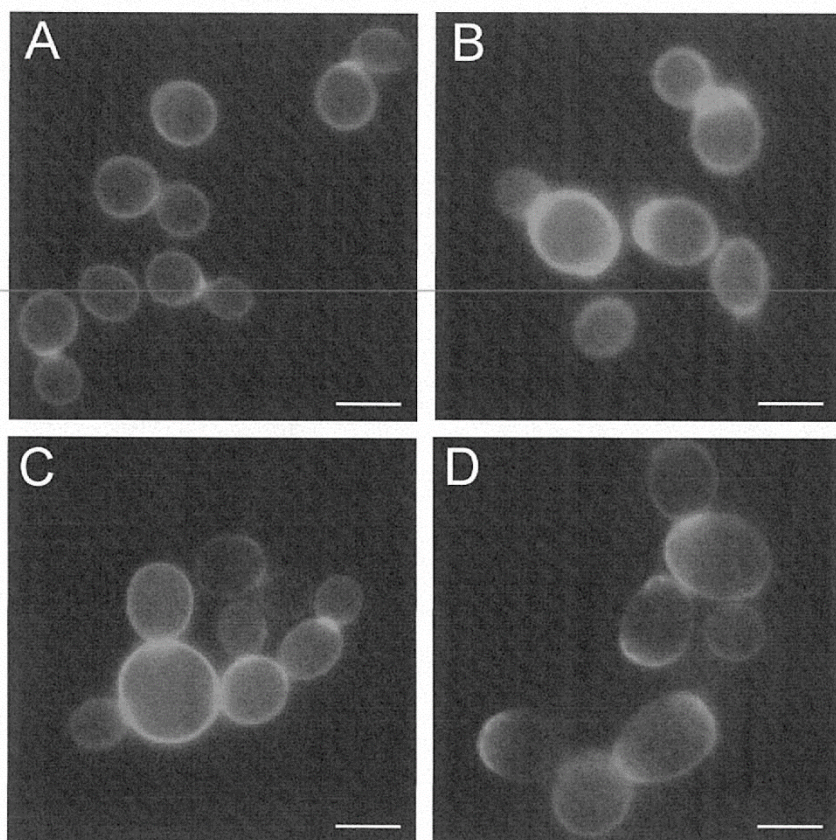


Fig. 2

Tabela 2

Hodowla fibroblastów z dawkami ekstraktu o różnym stężeniu białka	Procent komórek martwych (%)		
	Czas inkubacji (h)		
	24	48	72
kontrola	0	0	0
25 µg/ml	0	0	0
50 µg/ml	0	0	0
100 µg/ml	0	0	0
200 µg/ml	0	0	0

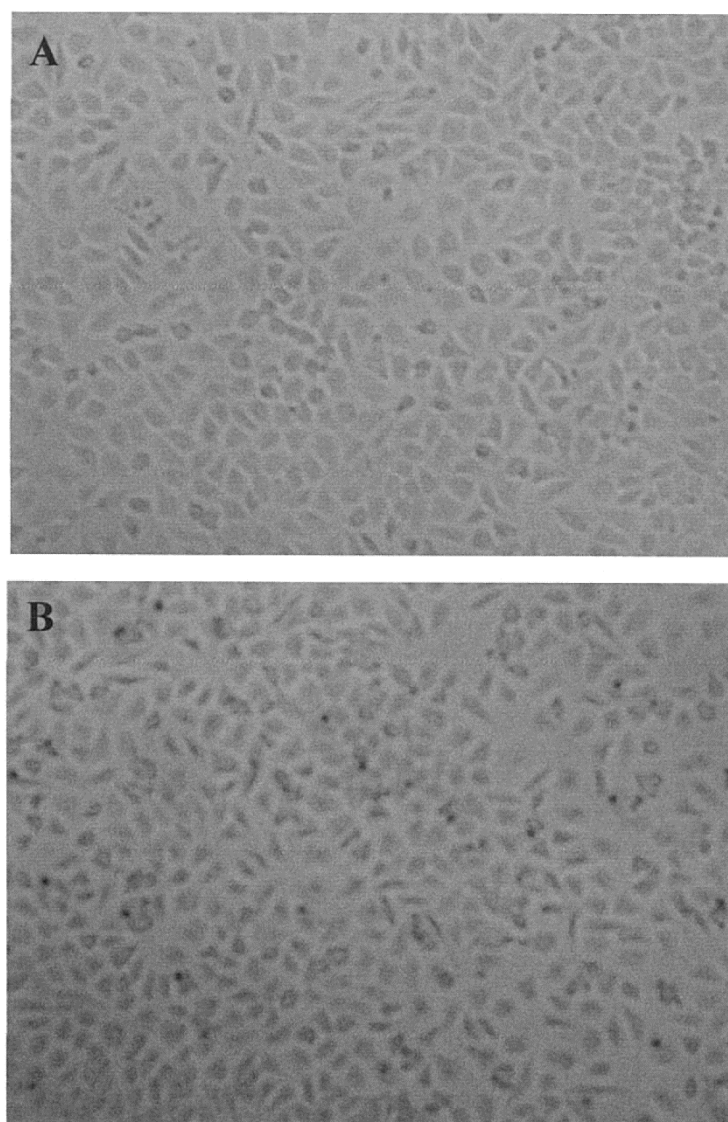


Fig. 3

