

Caenorhabditis elegans – dogodny nicień do badania przeciwpasożytniczej aktywności saponin roślinnych^{*)}

KINGA JÓZWICKA, KATARZYNA DONSKOW-ŁYSONIEWSKA, MARIA DOLIGALSKA

Zakład Parazytologii Instytutu Zoologii Wydziału Biologii UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Józwicka K., Donskow-Łysoniewska K., Doligalska M.

Caenorhabditis elegans nematode – convenient for the study of anthelmintic activity in plant saponins

Summary

Widely introduced parasitic control programs rely heavily on the use of synthetic or semi-synthetic antiparasitic compounds. The ineffectiveness of these therapies and growing drug resistance of nematodes leads researchers to search for new alternative methods to combat parasites. One proposal is to use the medicinal properties of herbs that have been used in medicine and veterinary practice for a longer period.

The research of activity of plant extracts and their fractions are increasingly important to develop therapies that improve the health of humans and also animals. Anthelmintic properties of plant compounds may be used in an environment where invasive forms of parasites develop. At this stage different compounds can affect the growth and development of parasites, such as inhibiting the molting process.

Knowledge of the development of nematodes is still incomplete. On account of the simple structure and transparent body of the nematode, *Caenorhabditis elegans* is a model species to study many phenomena. Development of the nematode (parasitic and free-living) is strictly programmed. Apoptosis is one of the major mechanisms involved in nematode development. The main apoptotic pathway proteins are CED-3, CED-4 (pro-apoptotic) and CED-9 (anti-apoptotic). Changes in the levels of these proteins may alter the course of organogenesis leading to adverse phenotypic effects.

Saponins are compounds commonly occurring in the plant kingdom (both in edible plants and herbs). The mechanism of the action of triterpenoidsaponins per cell is not fully understood. They show numerous properties such as immunomodulatory, antiviral, cytotoxic, or antitumor. Particularly derivatives of oleanolic acid and ursolic acid exhibit a variety of pharmacological properties without toxic side-effects.

Due to their characteristics active plant compounds, mainly derivatives of pentacyclitriterpenoids, are a potential source of anticancer, cytotoxic and anthelmintic new generation substances. These may affect the development of the parasite to regulate apoptosis. The discovery of the manner in which saponins are involved in apoptosis can be the first step toward the development a new drug for parasite diseases.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, plant saponins, nematodes

Powszechnie wprowadzone programy kontroli inwazji pasożytniczych polegają głównie na stosowaniu syntetycznych lub półsyntetycznych związków przeciwpasożytniczych. Leki te kumulują się w tkankach zwierząt, co z punktu widzenia zdrowia człowieka budzi obawy. Niepokojące jest także gromadzenie się tych związków w środowisku. Substancje te, nie podlegając degradacji i nie tracąc swojej aktywności, przez długi czas mogą oddziaływać na organizmy wolno żyjące (35). Ponadto, błędy w sposobie odrobaczania zwierząt prowadzą do pojawiania się zjawiska leko-

oporności (3, 20). Badania w ramach programów kontrolowania inwazji pasożytniczych zmierzają do opracowania nowych, bezpiecznych dla środowiska rozwiązań powstrzymujących rozprzestrzenianie się chorób pasożytniczych. Jedną z propozycji jest wykorzystanie właściwości leczniczych ziół stosowanych od dawna w medycynie i weterynarii. Spożycie wielu ziół powoduje ustępowanie objawów towarzyszących chorobom pasożytniczym prawdopodobnie z nałożenia się dwóch efektów, przeciwpasożytniczego i wzmacniającego układ odpornościowy żywiciela. Ustalono, że wiele gatunków roślin leczniczych posiada właściwości przeciwwirusowe, immunomodu-

^{*)} Badania finansowane ze środków MNiSZW nr N304 17 32/4335, BW nr 179 122, 183 110.

lujące, a nawet przeciwnowotworowe. Badania aktywności ekstraktów roślinnych i ich frakcji mają coraz większe znaczenie dla opracowania terapii poprawiających stan zdrowia nie tylko człowieka, ale i zwierząt hodowlanych (9). Kontrolowanie zarażenia poprzez fitoterapię mogłoby obniżyć koszty hodowli oraz ograniczyć toksyczną chemioterapię.

Wskazanie substancji pochodzenia roślinnego i poznanie, w jaki sposób wpływają one na procesy komórkowe (30), jest kluczowe dla wyjaśnienia mechanizmów obniżających inwazyjność pasożytów. Immunostymulujące właściwości tych związków mogą być wykorzystane do podniesienia ogólnego poziomu odporności w populacji żywiciela. To, co stwarza nadzieję na pomyślne zastosowanie fitoterapii w chorobach pasożytniczych, to prosta, bo pokarmowa droga podania leku, a także właściwości stymulujące układ odpornościowy i toksyczny wpływ na pasożyta. W celu poznania właściwości związków zawartych w roślinach niezbędne są zatem badania mechanizmów kluczowych dla przeżycia na poziomie komórkowym, jak i całego organizmu.

Przeciwnicieniowe właściwości związków pochodzenia roślinnego mogą być wykorzystane w środowisku, w którym rozwijają się formy inwazyjne pasożyta. Na tym etapie różne substancje mogą wpływać na wzrost i rozwój pasożytów, np. hamując proces linienia. Wiedza dotycząca rozwoju nicieni jest wciąż niepełna, a w opracowaniu metod zwalczania pasożytów niezbędne jest określenie mechanizmów regulujących ich rozwój, w tym apoptozę.

Caenorhabditis elegans to modelowy gatunek do badań wielu zjawisk. Zdecydowały o tym prosta budowa i przezroczyste ciało tego nicienia. Cechy te umożliwiają obserwację podziałów różnicujących się komórek w organizmie pod mikroskopem. Ustalono już mapy linii rozwojowych dla każdej komórki somatycznej. Liczba komórek poszczególnych linii jest stała i u dojrzałej formy hermafrodytycznej wynosi 959, a u samca 1031 komórek. Podczas rozwoju linii rozwijającej się w neurony w procesie apoptozy eliminowane są 131 komórki (10, 32).

Następną cechą ułatwiającą prowadzenie badań na *C. elegans* jest możliwość obserwacji w krótkim czasie efektów wywołanych dysfunkcją genów w przeżywającym organizmie. Jest to uwarunkowane mozaikowym typem rozwoju nicienia (18). Pozycja komórek w zarodku nie ma wpływu na ich dalszą specjalizację, gdyż podlegają one autosomalnej regulacji pod wpływem czynników obecnych w cytoplazmie. Każda komórka jeszcze na poziomie zarodka ma wyznaczoną liczbę podziałów. Zakończenie podziałów oznacza pojawienie się komórki o zdefiniowanej funkcji w ukształtowanym narządzie. Jeżeli komórka zostanie wyizolowana z zarodka, nicien rozwija się dalej, ale jest pozbawiony tych struktur, w które rozwinięłyby się linia usuniętej komórki (5, 39). Geny w tych liniach ulegają określonej ekspresji i są włączane se-

lektywnie (4, 40). Wydaje się, że połączenie analizy genów z możliwością obserwowania podziałów komórek pod mikroskopem, podlegających zmianom pod wpływem aktywnych związków roślinnych może przyczynić się do określenia zakresu zmian wywoływanych przez stosowane czynniki na poziomie całego organizmu, linii komórkowych i poszczególnych komórek. Także w tym przypadku *C. elegans* spełnia wszystkie warunki do przeprowadzenia badań z zastosowaniem saponin roślin leczniczych.

Apoptoza

Procesem regulującym rozwój *C. elegans*, podobnie jak u innych organizmów jest apoptoza. W wyniku tego mechanizmu usuwane są komórki zgodnie z programem rozwoju nicienia. Zahamowanie lub nadmierna indukcja programowanej śmierci komórki może prowadzić do deformacji organizmu. Zaburzenia rozwoju embrionalnego skutkują wypadaniem linii komórkowych i powstawaniem dysfunkcji krytycznych dla przeżycia organizmu (26).

Regulacja apoptozy jest złożonym procesem. Bodźce hamujące apoptozę to czynniki odpowiedzialne za przeżywanie komórek, takie jak: hormony, cząsteczki sygnałowe sąsiednich komórek czy też czynniki wzrostu. Apoptoza może być indukowana zarówno przy niedoborze czynników wzrostowych, jak i w obecności specyficznych ją wywołujących. Wiąże się to z ekspresją odpowiednich receptorów na powierzchni błony komórkowej, co rozpoczyna kaskadę reakcji prowadzących do programowanej śmierci komórki. Apoptoza może być także wzbudzona przez czynniki wewnątrzkomórkowe, poprzez tzw. szlak mitochondrialny (17, 29, 31).

Proces apoptozy dzieli się na 3 fazy: indukcji, wykonawczą i degradacji (37). W fazie indukcji komórka otrzymuje sygnał do eliminacji, w fazie wykonawczej aktywowane są enzymy proteolityczne, w fazie degradacji komórka rozpada się na ciała apoptotyczne. Fazom tym towarzyszą zmiany biochemiczne i morfologiczne, m.in.: zmniejszenie objętości w wyniku utraty wody, kondensacja chromatyny, fragmentacja jądrowego DNA poprzedzają oddzielenie otoczonych błoną komórkową fragmentów komórek, które są fagocytowane np. przez makrofagi (22, 23). Apoptoza u *C. elegans* jest regulowana przez produkty genów *ced-3* i *ced-4* (*ced*, cell-death abnormal). Oba geny są niezbędne do wejścia komórki w apoptozę i z tego powodu są one nazywane „genami śmierci”. Genem hamującym apoptozę jest gen *ced-9* (2, 14, 15).

Po wzbudzeniu apoptozy jako pierwszy ulega ekspresji gen *ced-4*, który aktywuje gen *ced-3*, indukujący kaspazy fazy wykonawczej. Podczas hamowania apoptozy produkt genu *ced-9* inaktywuje gen *ced-4*, blokując tym samym gen *ced-3*. Mutacje genu *ced-9* powodują, że niefunkcjonalne białko CED-9 słabiej wiąże się z CED-4. Niski poziom lub brak kompleksu

CED-9/CED-4 może zatem pośrednio hamować apoptozę (19, 34, 42). Poziom białka CED-9 jest także regulowany poprzez białko EGL-1 (egg-layingdefective), produkt genu *egl-1*. Białko to posiada domeny wiążące zarówno białka proapoptotyczne, jak i antyapoptotyczne; tworząc kompleks z CED-9 blokuje jego aktywność antyapoptotyczną, co skutkuje wejściem komórki w apoptozę. Dodatkowo kompleks EGL-1/CED-9 może pośrednio wpływać na zwiększenie ekspresji CED-4 i aktywację CED-3 (19, 42). Analiza genomu *C. elegans* doprowadziła do zidentyfikowania 2 genów: *ces-1* i *ces-2* (celldeathspecification) odpowiedzialnych za indukcję ekspresji EGL-1 w 131 komórkach przeznaczonych do eliminacji. Transkrypcja genów *ces* zatem pośrednio prowadzi do indukcji apoptozy: gdy aktywne białko EGL-1 łączy się z CED-9, apoptoza zostaje wzbudzona. Mechanizm wybiórczego włączania transkrypcji genów *ces* nie jest poznany i przypuszcza się, że indukcja genów *ces* związana jest z sygnałami zewnątrzkomórkowymi, a także z genem *egl-1*, który pośrednio odpowiedzialny jest za determinację płci nicienia (10).

W fazie wykonawczej apoptozy zarówno u *C. elegans*, jak i ssaków aktywowany jest układ proteaz z rodziny kaspaz (caspase – cysteineasparticacid-specificenzyne). Układ ten tworzy ponad 10 czynników, które działają na zasadzie reakcji łańcuchowej: aktywowanie jednej kaspazy prowadzi do uruchomienia innych i nieodwracalnego wprowadzenia komórki na drogę apoptozy. Substratami tej proteolitycznej kaskady są zarówno białka strukturalne, jak i enzymy istotne w przemianach metabolicznych komórki: białka szkieletu komórki, białka wyścielające wewnętrzną powierzchnię otoczki jądrowej w tym laminy, aktyna i fodryna. Ponadto kaspazy trawią szereg białek uczestniczących w procesach molekularnych związanych z cyklem komórkowym (17, 22, 31).

W fazie degradacji u *C. elegans* zidentyfikowano 6 genów: geny *ced-1*, *ced-6* i *ced-7* regulujące fagocytozę i geny *ced-2*, *ced-5*, *ced-10*, które odpowiedzialne są również za proces usuwania komórek. Mutacje w 2 genach pochodzących z 2 różnych grup powodują taki sam efekt, jak mutacja w obrębie jednej z grup. Mutacje te powodują częściowe zahamowanie fagocytozy. Sugeruje to, że obie grupy genów działają wymiennie. Wybiórczy mechanizm ekspresji genów nie jest poznany i nie wiadomo, jakie czynniki wpływają na aktywowanie grup genów odpowiedzialnych za fagocytozę (41).

Najnowsze badania pozwoliły wstępnie ocenić funkcje białek szlaku apoptotycznego. Białko CED-1 (należące do I grupy) jest śródbłonowym receptorem i pojawia się przed sfagocytowaniem ciałek apoptotycznych. Po związaniu się ligandu CED-6 z receptorem CED-1 proces fagocytowania tych ciałek wzmaga się, ale nie jest to niezbędne do rozpoczęcia fagocytozy. Ostatnim białkiem należącym do I grupy jest białko CED-7 (homolog białka ABCA1/2 u ssaków). Białko

ABCA1/2 u ssaków pełni funkcję znacznika, odpowiedzialne jest za ekspozycję cholesterolu w błonach komórek apoptotycznych. Funkcja tego białka w szlaku apoptotycznym nicienia nie jest do końca wyjaśniona i prawdopodobnie wzmacnia ono funkcje białka CED-1 (21).

Drużga grupa białek odpowiedzialnych za fagocytozę *C. elegans* to: CED-5, CED-2, CED-12. Białka te są włączone w polimeryzację filamentów aktynowych i prawdopodobnie pełnią funkcję analogiczną do białek aktywujących ścieżkę Rac u ssaków. Białka Rac należą do rodziny białek Rho odpowiedzialnych za układ cytoszkieletu aktynowego w komórkach fagocytujących (24). Dużą grupę wewnątrzkomórkowych regulatorów apoptozy szlaku mitochondrialnego u ssaków stanowi rodzina białek Bcl-2. Rodzina Bcl-2 składa się z kilku białek, które tworzą homo- lub heterodimery. Efekt biologiczny tych kompleksów może być odmienny. Bcl-x1 i Bfl-1 hamują apoptozę poprzez blokadę kaskady kaspaz. Pozostałe białka wchodzące w skład tej rodziny, tj. Bax, Bak, Bad i Bid, aktywują apoptozę. Równowaga pomiędzy białkami regulatorowymi należącymi do rodziny Bcl-2 determinuje los komórki (17, 23, 31). Poza rodziną białek Bcl-2 regulatorami są białka określane jako IAP (inhibitors of apoptosis), hamujące apoptozę.

Geny apoptotyczne *C. elegans* są wysoce konserwatywne ewolucyjnie, dzięki czemu możliwe było wyznaczenie homologicznych genów oraz białek nicienia i ssaka. Są to: CED-3 (homolog kaspazy wykonawczej), CED-4 (homolog ludzkiego Apaf-1), EGL-1 (homolog ludzkiego Bad) oraz główne białko antyapoptotyczne CED-9 (homolog ludzkiego Bcl-2). Hamowanie ekspresji genu *bcl-2* w chłoniaku grudkowym (choroba Brilla i Symmersa) powoduje wejście komórek w apoptozę (16, 25). Podobne zjawisko obserwuje się u *C. elegans*. Sugeruje to, że u nicieni i kręgowców jest ten sam molekularny mechanizm hamowania apoptozy, za który odpowiedzialne są geny nicienia *ced-9* i ludzkie *bcl-2*.

Szczegółowe badania wykazały, iż występuje wysoka homologia między produktem genu *ced-3* nicienia a asparaginową proteinazą cysteinową u ssaków. Proteinaza ta u ssaków aktywuje szlak kaspaz, co doprowadza do kondensacji chromatyny i degradacji DNA. Podobną funkcję pełni białko CED-3 u *C. elegans* (21). Podobieństwo funkcjonalne dotyczy także białek CED-4 *C. elegans* i Apaf-1 ssaków. Obie cząsteczki w swojej budowie zawierają domeny wiążące ATP, który jest niezbędny do aktywacji katalitycznej tych białek. Ponadto u ssaków komórki przeznaczone do usunięcia prezentują fosfatydyloserynę – Phosphatidyloseryne (PC) na zewnętrznej warstwie błony komórkowej. Wprawdzie u *C. elegans* udało się zidentyfikować homologiczne enzymy uczestniczące w tym procesie, ale jednak nie dochodzi do ekspozycji PC na komórkach apoptotycznych przeznaczonych do fagocytozy (9, 39).

Biochemicznym wskaźnikiem apoptozy jest fragmentacja DNA odbywająca się w określonych miejscach łańcucha DNA. Proces ten zachodzi w dwóch etapach, regulowanych przez aktywowane kaspazy, które trawią białko odpowiedzialne za utrzymywanie enzymów degradujących DNA w nieaktywnej formie. W pierwszym etapie większe fragmenty o długości 300 i 50 kb są odszczepiane, najprawdopodobniej przy udziale topoizomeryzy II (DNA-za zależna od Mg^{++}), w drugim etapie mniejsze oligonukleosomowe fragmenty odszczepiane są przez endonukleazę zależną od jonów wapnia. Fragmentacja DNA jest wykorzystywana w praktyce w badaniach morfologicznych nad apoptozą. Znakowanie specyficznych fragmentów jądrowego DNA w miejscach jego pęknięć umożliwia obrazowanie komórek w fazach apoptozy. Wiele badań nad apoptozą opiera się właśnie na metodzie oznaczania powstałych w wyniku działania terminalnej transferazy zakończonych dUTP fragmentów DNA (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling – TUNEL) (26).

Z przedstawionych powyżej danych wynika, że apoptoza u *C. elegans* może być rozpoznawana na podstawie poziomu ekspresji białek regulujących jej przebieg na wszystkich etapach. W przypadku nicieni pasożytniczych zjawisko apoptozy nie jest opisane. Wydaje się jednak, że regulacja zachodząca podczas ich rozwoju będzie miała podobne cechy jak u *C. elegans*. Formy wolno żyjące pasożytów, rozwijające się w środowisku zewnętrznym stanowią dogodny i łatwy materiał do przeprowadzenia badań porównawczych. Z dotychczas przeprowadzonych badań w Zakładzie Parazytologii UW wynika, że jaja i larwy nicienia *Heligmosomoides bakeri* są wrażliwe na saponiny triterpenoidowe lub steroidowe. Związki te w różny sposób działają toksycznie na nicienie (7), w tym także naruszają przebieg apoptozy (dane niepublikowane).

Nicienie to groźne szkodniki i pasożyty. Nowe metody kontrolowania inwazji odrzucają wybiórcze stosowanie antyhelmintyków z powodu coraz szerszej lekooporności pasożytów. Zidentyfikowanie avermektyny i milbemycyny wzbudziło szerokie zainteresowanie produktami naturalnego pochodzenia, metabolitów mikroorganizmów lub roślin (9). Obecnie zmierza się do wprowadzenia upraw roślin transgenicznych z genami oporności na patogeny obok innych biologicznych strategii (35) np. opartych o zastosowanie substancji, zawierających naturalne czynniki przeciwpasożytnicze. Przykładem mogą być saponiny triterpenoidowe izolowane z różnych roślin.

Aktywne produkty roślinne

Saponiny są związkami powszechnie występującymi przede wszystkim w królestwie roślin (zarówno w roślinach jadalnych, jak i ziołach). Już od wieków znane były ze swoich licznych właściwości leczniczych. Wynikają one z tego, że substancje te, uważane dotychczas za wtórne metabolity roślin, są niejedno-

rodną grupą związków chemicznych. Zbudowane są z części cukrowej (glikonu) i części niecukrowej (aglikonu). Podstawowym kryterium podziału saponin jest rodzaj aglikonu. Są to przede wszystkim glikozydy triterpenoidów lub steroli. Część niecukrową stanowi najczęściej od 4 do 6 pierścieni węglowych, do których przyłączone są wiązaniem eterowym lub estrowym łańcuchy cukrowe. Najpowszechniej występujące monosacharydy to: D-glukoza, D-galaktoza, L-fukoza i L-arabinoza. Pentacykliczne triterpenoidy to metabolity roślin powszechnie występujące w nasionach, liściach, łodygach. Szczególnie triterpenoidy kwasu oleanolowego i ursolowego wykazują różnorodne farmakologiczne właściwości, bez toksycznego działania ubocznego. Z tego powodu mogą być źródłem wielu czynników o szerokim spektrum działania (9, 30).

Mechanizm działania saponin triterpenoidowych na komórkę nie jest do końca poznany. Wiadomo, że dzięki swojej różnorodnej budowie mogą wpływać zarówno na szlaki przekazywania informacji w komórce, jak i na samą strukturę komórek (9). Stosunkowo dobrze scharakteryzowaną grupą związków są saponiny steroidowe. Mają zdolność uszkodzenia błon komórkowych. Związki te łączą się ze sterolami budującymi błony komórkowe głównie z cholesterolem. Połączenia te powodują powstawanie porów w błonach, a zatem zmieniają przepuszczalność błon, co zaburza selektywność transportu. Wykazano, że przyłączenie saponiny do błony jest procesem nieodwracalnym. Dodatkową właściwością saponin steroidowych jest zdolność do hemolizy błon erytrocytów. W mniejszym stopniu aktywność hemolityczną wykazują saponiny triterpenoidowe, głównie pochodne kwasu oleanolowego. Powszechnie występującymi w królestwie roślin saponinami triterpenoidowymi są glikozydowe pochodne kwasu oleanolowego. Wykazują one liczne właściwości immunomodulacyjne, przeciwwirusowe, cytotoksyczne oraz przeciwnowotworowe (9, 30). Ponadto mogą hamować wzrost bakterii, wpływać na ich morfologię, a także wzmagać ich autolizę (27). Kwas ursolowy (UA), izomer kwasu oleanolowego obecny w roślinach uprawnych i ziołach, wykazuje właściwości przeciwzapalne, oksydacyjne oraz cytotoksyczne. Wzrost zainteresowania aktywnymi substancjami roślin, a szczególnie saponinami triterpenoidowymi, wynika z faktu, iż charakteryzują się one szerokim spektrum działania. Obecnie prowadzone są badania aktywności tych związków wobec mikroorganizmów (wirusy, bakterie, grzyby), pasożytów, jak i linii komórek nowotworowych.

Naturalne triterpenoidy ze względu na swoją strukturę mogą być rozważane jako czynniki przeciwnowotworowe (12). Saponiny triterpenoidowe *Acacia victoriae* hamowały wzrost komórek nowotworowych linii Jurkat poprzez bezpośrednie indukowanie mitochondrialnego szlaku apoptozy (13). Stężenie saponin toksycznych dla tych komórek było znacznie niższe niż

wymagane do hemolizy, co może oznaczać, że za efekt cytotoksyczny odpowiada inny mechanizm niż sugerowana dotychczas perforacja błony komórkowej (11). Saponiny tworzą nierozpuszczalne kompleksy z cholesterolem także w błonach komórkowych *Toxoplasma gondii* (28). Triterpenoidy kwasu oleanolowego *Liquidambar formosana* hamują aktywność czynnika transkrypcyjnego NFAT (6).

Mechanizm uszkodzania komórek nowotworowych wymaga szczegółowych badań ze względu na zahamowany w nich proces apoptozy. Kwas oleanolowy (OA) i ursolowy (UA) hamują wzrost komórek HuH7, w których następuje wzrost ekspresji białka antyapoptotycznego – Bcl-2. OA i UA indukując apoptozę, powodują uwalnianie cytochromu c z mitochondrium do cytoplazmy, aktywując kaspazę 9 i kaspazę-3. Także aktywność NF-κB jest zahamowana w tych komórkach pod wpływem saponin (33). Badanie wybranych linii komórek nowotworowych *in vitro* jest przydatne, jednak nie obejmuje tych zjawisk, które mają miejsce w funkcjonującym organizmie. Alternatywą mogą być badania *C. elegans*. Wyniki badań tego nicienia można również bezpośrednio przenieść na nicienie pasożytnicze, a ściślej mówiąc – na ich formy wolno żyjące, dyspersyjne i inwazyjne. Oznaczenie aktywności pro- lub antyapoptotycznej saponin może stanowić pierwszy krok w identyfikacji substancji nicieniobójczej. W naszych dotychczasowych badaniach (36) wykazano antybakteryjne i przeciwpasożytnicze działanie wolnego kwasu oleanolowego i jego glikozydów oraz glukuronozydów izolowanych z nagietka *C. officinalis*. Glikozydy kwasu oleanolowego hamowały rozwój, obniżały żywotność larw stadium L3 nicienia jelitowego myszy *Heligmosomoides bakeri*. Aktywne substancje roślinne mogą również modyfikować procesy towarzyszące prawidłowemu rozwojowi organizmów, prowadząc do patologicznych zmian. Ekstrakty z *Lawsonia inermis* (lawsonia bezbronna) i *Chenopodium ambrosioides* (komosa piżmowa) posiadają silne właściwości hamujące rozwój jaja nicienia *Haemonchus contortus*. Podawanie odpowiednio spreparowanych liści *C. ambrosioides* owcom redukowało zarażenie pasożytem nawet o 36% (8). Działanie hamujące rozwój pasożytów zidentyfikowano również w wyciągach z *Allium sativum* (czosnek pospolity), które znacząco hamowały wyklucie się larw *Ascaris suum*. Mechanizm działania tych związków na jaja pasożyta nie jest poznany (38). Wykazano również, że saponiny triterpenoidowe wyizolowane z nagietka lekarskiego (*Calendula officinalis*) hamują namnażanie się wirusa opryszczki *Herpes simplex* 1 i 2 oraz wirusa grypy (9). Frakcja z liści *Rosmarinum officinalis* (rozmaryn lekarski) zawierająca 3 kwasy triterpenoidowe eliminuje pasożytniczego pierwotniaka *Trypanosoma cruzi* (1). Saponiny triterpenoidowe wykazują również działanie przeciwwgrzybicze. Hedryna wyizolowana z liści bluszczy (*Hedera helix*) oraz primulosaponina A z korzeni *Primula officinalis* (pierwiosn-

ka zwyczajnego) tworzy kompleksy z cholesterolami w ścianach grzybów, prowadząc do ich uszkodzenia (29). Obecnie prowadzi się intensywne badania nad otrzymaniem frakcji zawierającej substancje aktywne. Frakcje saponin triterpenoidowych, glikozydy i glukuronoidy kwasu oleanolowego z nagietka lekarskiego (*Calendula officinalis*) oraz buraka zwykłego (*Beta vulgaris*) wpływają na wyklucie się i przeżywalność larw inwazyjnych *H. bakeri* (7). Po zahamowaniu aktywności pompy glikoproteinowej przez te związki żywotność nicienia uległa znacznemu obniżeniu. Wykazano także, że frakcja glukuronozydów z nagietka może wpływać na zaburzenia procesu apoptozy u tego nicienia, zmieniając poziom regulacji białek proapoptotycznych, głównie białka CED-3 (dane niepublikowane).

Podsumowanie

Aktywne substancje roślinne, głównie pochodne pentacyklicznych triterpenoidów, dzięki swoim właściwościom stanowią potencjalne źródło substancji przeciwnowotworowych, cytotoksycznych i przeciwpasożytniczych nowej generacji. Mogą one wpływać na rozwój pasożyta, regulując apoptozę komórek. Prowadzić to może do pojawiania się dysfunkcji fizjologicznych prowadzących do zaburzenia cyklu życiowego pasożytów. Podawane również w odpowiednich dawkach zwierzętom mogą spełniać funkcję środka terapeutycznego.

Wskazując na potencjalne właściwości przeciwnicieniowe saponin triterpenoidowych, należy uwzględnić ich toksyczny wpływ na organizmy, zahamowanie podziałów komórkowych poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego, indukowanie procesu apoptozy, szlaku zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego oraz zdolność perforowania błony komórkowej.

Piśmiennictwo

1. Aballay, Ausubel M. F.: Programmed cell death mediated by ced-3 and ced-4 protects *Caenorhabditis elegans* from *Salmonella typhimurium* – mediated killing. PNAS 2001, 5, 2735-2739.
2. Abe F., Yamauchi T., Nagao T., Kinjo J., Okabe H., Higo H., Akahane H.: Ursolic acid as a trypanocidal constituent in rosemary. Biol. Pharm. Bull. 2002, 25, 1485-1487.
3. Barton D.: Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. Nutr. Res. Rev. 2000, 13, 279-299.
4. Bose J., Gruber A., Helming L., Schiebe S., Wegener I., Hafner M., Beales M., Kontgen F., Lengeling A.: The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. J. Biol. 2004, 3, 15.
5. Cellerino A., Bahr M., Isenmann S.: Apoptosis in the developing visual system. Cell Tissue Res. 2000, 301, 53-69.
6. Dat T., Lee S., Cai F., Shen G., Kim H.: Oleananetriterpenoids with inhibitory activity against NFAT transcription factor from *Liquidambar formosana*. Biol. Pharm. Bull. 2004, 27, 426-428.
7. Doligalska M., Józwicka K., Kiersnowska M., Mroczek A., Paczkowski C., Janiszowska W.: Triterpenoidsaponins affect the function of P-glycoprotein and reduce the survival of the free-living stages of *Heligmosomoides bakeri*. Vet. Parasitol. 2011, 179, 144-151.
8. Egual T., Giday M.: In vitro anthelmintic activity of three medicinal plants against *Haemonchus contortus*. Int. J. Green Pharm. 2009, 3, 29-34.
9. Francis G., Kerem Z., Makkar S. P. H., Becker K.: The biological action of saponins in an animal system: a review. Br. J. Nutr. 2002, 88, 587-605.

10. *Fraser A. G.*: Programmed cell death in *C. elegans*. *Cancer Metastasis Rev.* 1999, 18, 285-294.
11. *Haddad M., Laurens V., Lacaille-Dubois M.*: Induction of apoptosis in a leukemia cell line by triterpenesaponins from *Albizia adianthifolia*. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 4725-4734.
12. *Han T., Li J., Huang F., Yu G., Fang B.*: Triterpenoidsaponins from *Anemone flaccida* induce apoptosis activity in HeLa cells. *J. Asian. Nat. Prod. Res.* 2009, 11, 122-127.
13. *Haridas V., Higuchi M., Jayatilake G., Bailey D., Mujoo K., Blake M., Arntzen Ch., Gutterman J.*: Avicins: triterpenoidsaponins from *Acacia victoriae* (Bentham) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. *PNAS* 2001, 98, 5821-5826.
14. *Hengartner M. O., Ellis R. E., Horvitz H. R.*: *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992, 356, 494-499.
15. *Horvitz H. R., Shaham S., Hengartner M. O.*: The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1994, 385, 653-656.
16. *Igaki T., Miura M.*: Role of Bcl-2 family members in invertebrates. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004, 1644, 73-81.
17. *Jacobson M.*: Programmed cell death: a missing link is found. *Cell Biol.* 1997, 12, 467-469.
18. *Jacobson M., Weil M., Raff C. M.*: Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997, 88, 347-354.
19. *Kanuka H., Hisahara S., Sawamoto K., Shoji S., Okano S., Miura M.*: Pro-apoptotic activity of *Caenorhabditis elegans* CED-4 protein in *Drosophila*: Implicated mechanisms for caspase activation. *Cell Biol.* 1999, 96, 145-150.
20. *Kerboeuf D., Blackhall W., Kaminsky T., von Samson-Himmelstjerna G.*: P-glycoprotein in helminthes: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2003, 22, 332-334.
21. *Kinchen J.*: A model to die for: signaling to apoptotic cell removal in worm, fly and mouse. *Apoptosis* 2010, 15, 998-1006.
22. *Kinchen M., Ravichandran S.*: Journey to the grave: signaling events regulating removal of apoptotic cells. *J. Cell Sci.* 2007, 120, 2143-2149.
23. *Li P., Nijhawan D., Wang X.*: Mitochondrial activation of apoptosis. *Cell.* 2004, 116, S57-S61.
24. *Mangahas M., Yu X., Miller G., Zhou Z.*: The small GTPase Rab2 functions in the removal of apoptotic cells in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 2008, 180, 357-373.
25. *Maslišnska D.*: Programowana śmierć komórki (apoptoza) w procesie zapalnym. *Nowa Med.* 1999, 4, 12-17.
26. *Meier P., Finch A., Evan G.*: Apoptosis in development. *Nature* 2000, 407, 796-801.
27. *Muley B., Khadabadi S., Banarase N.*: Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review. *Trop. J. Pharm. Res.* 2009, 8, 455-465.
28. *Pacheco-Soares C., de Souza W.*: Localization of saponin-sterol complexes and lectin-binding sites during interaction of *Toxoplasma gondii* with host cell. *Parasitol. Res.* 2000, 86, 529-536.
29. *Petit P.*: Fengreek steroid saponins, food intake and plasma lipids. *Steroids.* 1995, 60, 674-680.
30. *Rochfort S., Parker A., Dunshea F.*: Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry* 2008, 69, 299-322.
31. *Savill J., Gregory Ch., Haslett Ch.*: Eat me or die. *Science* 2003, 302, 1516-1517.
32. *Schierenberg E.*: Developmental strategies during early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans*. *J. Embryol.* 1986, 97, 31-44.
33. *Shyu M., Kao T., Yen G.*: Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in HuH7 Human hepatocellular Carcinoma cells through a mitochondrial depended pathway and downregulation of XIAP. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 6110-6118.
34. *Spector M., Desnoyers S., Hoepfner D., Hengartner M.*: Interaction between the *C. elegans* cell-death regulators CED-9 and CED-4. *Nature* 1997, 385, 653-656.
35. *Stear M., Doligalska M., Donskow-Schmelter K.*: Alternatives to anthelmintics for control of nematodes in livestock. *Parasitology* 2007, 134, 139-151.
36. *Szakiel A., Ruszkowski D., Grudniak A., Kurek A., Wolska I. K., Doligalska M., Janiszowska W.*: Antibacterial and antiparasitic activity of oleanolic acid and its glycosides isolated from marigold (*Calendula officinalis*). *Planta Med.* 2008, 74, 1709-1715.
37. *Twomey C., McCarthy J.*: Pathways of apoptosis and importance in development. *J. Cell. Mol. Med.* 2005, 9, 345-359.
38. *Urban J., Kokoska L., Matejkova J.*: In vitro anthelmintic effects of medicinal plants used in Czech Republic. *Pharm. Biol.* 2008, 46, 808-813.
39. *Voronov A. D., Panchin V. Y.*: Cell lineage in marine nematode *Enoplos brevis*. *Development* 1998, 125, 143-150.
40. *Wiegner O., Schierenberg E.*: Regulative development in nematode embryo: a hierarchy of cell fate transformations. *Dev. Biol.* 1999, 215, 1-12.
41. *Wu C., Horvitz R.*: The *C. elegans* cell corpse engulfment gene CED-7 encodes a protein similar to ABC transporters. *Cell* 1998, 93, 951-960.
42. *Yan N., Gu L., Kokel D., Chai J., Wenyu H., Aidong C., Lin X.*: Structural, Biochemical, and Functional Analyses of CED-9 Recognition by the Pro-apoptotic Proteins EGL-1 and CED-4. *Mol. Cell.* 2004, 15, 999-1006.

Adres autora: mgr Kinga Józwicka, ul. Miecznikowa 1, 02-96 Warszawa;
e-mail: kingajozw@biol.uw.edu.pl