

PRACE ORYGINALNE

PEŁZAKOBÓJCZE EKSTRAKTY ROŚLINNE

MONIKA DERDA, EDWARD HADAŚ, BARBARA THIEM* I ANNA SUŁEK

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Akademia Medyczna, ul. Fredry 10, 61-701 Poznań; *Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Akademia Medyczna, ul. Św. Marii Magdaleny 14, 60-681 Poznań

ABSTRACT. Amebicidal plants extracts. The free-living amoebae from genus *Acanthamoeba* are the causative agents of granulomatous amebic encephalitis (GAE), a chronic progressive disease of the central nervous system; amebic keratitis (AK), a chronic eye infection; amebic pneumitis (AP), a chronic lung infection, and skin infection. Chemotherapy of *Acanthamoeba* infection is problematic. The majority of infections have been fatal. Only a few cases are reported to have been treated successfully with very highly toxic drugs. The therapy might be succeed, if the diagnosis and therapy is made at very early stage of infection. In our experiments we used the following plant extracts: *Solidago virgaurea*, *Solidago graminifolia*, *Rubus chamaemorus*, *Pueraria lobata*, and natural plants products as ellagic acid and puerarin. Those therapeutic agents and plants extracts have been tested *in vitro* for amebicidal or amebostatic activity against pathogenic *Acanthamoeba* spp. Our results showed that methanol extracts obtained from plants are active against axenic pathogenic *Acanthamoeba* sp. trophozoites *in vitro* at concentration below 0.1 mg/ml. Further studies are needed to investigate whether these extracts are also effective *in vivo* in animal model of infection with *Acanthamoeba* sp.

Key words: free-living amoebae, natural amebic remedies, *Pueraria lobata*, *Rubus chamaemorus*, *Solidago virgaurea*, *S. graminifolia*.

WSTĘP

Pełzaki wolno żyjące z rodzaju *Acanthamoeba* mogą stanowić czynnik etiologiczny przewlekłego pełzakowego ziarniniakowego zapalenia mózgu (granulomatous amebic encephalitis – GAE), zapalenia rogówki oka (amebic keratitis – AK), zapalenia płuc (amebic pneumitis – AP), jak również zmian w innych narządach człowieka i zwierząt. Leczenie pełzakowego ziarniniakowego zapalenia tkanki jest bardzo trudne i rzadko skuteczne. Stosuje się w nim oprócz antybiotyków, zapobiegających dalszym następstwom uszkodzenia tkanki, związki, które mają działanie pełzakobójcze lub pełzakostatyczne. Są to często substancje silnie drażniące i toksyczne stosowane do dezynfekcji (Kitagawa i wsp. 2003, Seal 2003).

Celem naszej pracy było zbadanie działania pełzakobójczego lub pełzakostatycznego ekstraktów roślinnych uzyskanych z *Rubus chamaemorus*, *Pueraria lobata*, *Solidago virgaurea*, *Solidago graminifolia* oraz czystych substancji pochodzenia roślinnego jak izoflawonu – pueraryny (Sigma), lub fenolokwasu – kwasu ellagowego (Fluka) na wzrost i rozwój pełzaków wolno żyjących z rodzaju *Acanthamoeba*.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem roślinnym stosowanym do sporządzenia ekstraktów były nadziemne części roślin wraz z kwiatami z nawłoci pospolitej (Rys. 1) i wąskolistnej – *Solidago virgaurea* L. i *S. graminifolia* (L.) Salisb. (Asteraceae), korzenie z ołownika łatkowatego (Rys. 2) – *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi (Fabaceae) oraz liście z maliny moroszki (Rys. 3) – *Rubus chamaemorus* L. (Rosaceae). Okazy zielnikowe badanych gatunków roślin są przechowywane w Katedrze i Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej AM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Badane gatunki roślin były uprzednio analizowane fitochemicznie na obecność flawonoidów w *S. virgaurea* i *S. graminifolia* (Budzianowski 1990, Budzianowski i wsp. 1990, Thiem i wsp. 2001), kwasu ellagowego w *R. chamaemorus* (Thiem 2002, Thiem i Goślińska 2004, Krawczyk i wsp. 2003) i izoflawonów w *P. lobata* (Thiem 2003).

Każdą partię wysuszonego i rozdrobnionego materiału roślinnego (około 10,0 g) ekstrahowano 3x po 1h w 150 ml metanolu. Połączone poszczególne ekstrakty metanolowe odsączano i suszono w próżni na łaźni wodnej w temperaturze poniżej 40°C. Do badań właściwości terapeutycznych brano suche ekstrakty z każdego badanego gatunku roślin, które rozpuszczano w wodzie destylowanej. Materiałem badanym były również czyste substancje chemiczne pochodzenia roślinnego, takie jak kwas ellagowy (Fluka), którego bogatym źródłem są liście *R. chamaemorus* i pueraryna (Sigma), główny izoflawon obecny w *P. lobata*.

Wpływ substancji leczniczych uzyskanych z roślin testowano *in vitro* na szczepie 309 *Acanthamoeba castellanii* (patogeniczny dla myszy, izolowany ze środowiska; Kasprzak i Mazur 1972), oraz szczepie „Ograbek” *Acanthamoeba* sp. (patogenicznym dla człowieka, izolowanym z przypadku *Acanthamoeba* keratitis – szczep własny nieopisany). Właściwości patogeniczne pełzaków sprawdzono zarażając 2-tygodniowe białe myszy szczepu BALB-c według procedury opisanej przez Kasprzaka i Mazura (1972) oraz Mazura (1984).

Szczepy wzrastały aksenicznie na podłożu płynnym BC+hs (Bacto-Casitone + surowica końska) opisanym przez Červę (1966; 1969). Do aksenicznej hodowli pełzaków (5×10^4 komórek/ml) dodawano ekstrakty roślinne w stężeniach: 0,01 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1,0 mg/ml; 1,5 mg/ml. Przyrost liczby pełzaków badano w odstępach 24 godzinnych, stosując komorę Thoma. Kontrolę stanowiła hodowla pełzaków bez środków leczniczych. Współczynnik IC_{50} oznacza najniższe stężenie badanej substancji, które hamuje wzrost pełzaków w 50%.



Rys. 1. Nawłoc pospolita – *Solidago virgaurea* L. (Asteraceae)



Rys. 2. Ołownik łatkowaty – *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi (Fabaceae)



Rys. 3. Malina moroszka – *Rubus chamaemorus* L. (Rosaceae)

WYNIKI

Tabela 1. Współczynnik terapeutyczny IC_{50} wyznaczony dla poszczególnych ekstraktów substancji czystych pochodzenia roślinnego

Ekstrakt roślinny	IC_{50}
<i>Solidago virgaurea</i>	$\geq 0,01$ mg/ml
<i>Solidago graminifolia</i>	$\geq 0,05$ mg/ml
<i>Rubus chamaemorus</i>	$\geq 0,05$ mg/ml
<i>Pueraria lobata</i>	$\geq 0,01$ mg/ml
Kwas ellagowy	$\geq 0,01$ mg/ml
Pueraryna	$\geq 0,01$ mg/ml

Wyniki badań współczynnika hamowania wzrostu pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* sp. (IC_{50}) wyliczone dla poszczególnych ekstraktów roślinnych i substancji czystych przedstawiono w Tabeli 1. Stwierdzono, że ekstrakty z *Solidago virgaurea* i *Pueraria lobata* oraz substancje czyste, takie jak kwas ellagowy i pueraryna, mają właściwości chemoterapeutyczne *in vitro* w stężeniach poniżej 0,01 mg/ml. Wyniki badań IC_{50} są identyczne dla obu badanych patogenicznych szczepów *Acanthamoeba* sp.

DYSKUSJA

Pełzaki wolno żyjące z rodzaju *Acanthamoeba*, jako organizmy powszechnie występujące, mogą być znajdowane w glebie, powietrzu, w każdym zbiorniku wody słodkiej i słonej na wszystkich kontynentach, a ponadto w urządzeniach klimatyzacyjnych, w wodzie wodociągowej, prysznicach, urządzeniach sanitarnych i stomatologicznych, dializatorach, płynach do soczewek kontaktowych i zakażonych hodowlach tkankowych (Visvesvara i Stehr-Green 1990, De Jonckheere 1991, Mergeryan 1991, Szenasi i wsp. 1998;). Pierwsze sugestie, że pełzaki te mogą wywołać choroby u człowieka pochodzą z roku 1958 (Marciano-Cabral i Cabral 2003). Obecnie ludzkie przypadki pełzakowego ziarniniakowego zapalenia mózgu, zapalenia rogówki oka, zapalenia płuc i skóry są notowane na całym świecie (Fowler i Carter 1965, Callicott 1968, Jager i Stamm 1972, Willaert i wsp. 1976, Martinez i wsp. 1977, Marciano-Cabral i i wsp. 2000).

Kliniczne objawy ziarniniakowego zapalenia mózgu u człowieka (GAE) charakteryzują się bólem głowy, gorączką, zaburzeniami neurologicznymi, takimi jak halucynacje, dezorientacja i zaburzenia wzrokowe, zmianami osobowości oraz śpiączką (Martinez i Visvesvara 1997). Zapalenie rogówki oka (AK) charakteryzuje się z kolei silnymi bólami oka, światłowstrętem, widzeniem błękitno-czerwonym i krwawymi wybroczynami. W płucach pełzaki wywołują liczne ogniska zapalne (AP) z wysiękiem płynu surowiczego zawierającego trofozoity i cysty. Zmiany skórne mają charakter licznych, mniej lub bardziej rozległych owrzodzeń. Wszystkie infekcje mają charakter zazwyczaj przewlekły.

We wszystkich przypadkach inwazji *Acanthamoeba* sp. chemioterapia stanowi ogromny problem. Większość inwazji kończy się śmiertelnie. Zanotowano zaledwie kilka przypadków skutecznej chemioterapii przy zastosowaniu bardzo toksycznych leków stosowanych zazwyczaj do dezynfekcji np. pochodnych chlorheksydyny (Kitagawa i wsp. 2003, Seal 2003). Doniesienia o skutecznym leczeniu infekcji centralnego układu nerwowego lub gałki ocznej u chorych immunokompetentnych zanotowano w przypadku zastosowania terapii kombinowanej i rozpoczętej we wczesnym etapie choroby. Większość terapeutyków w późnych stadiach zarażenia jest nieskuteczna (Ficker i wsp. 1990, Dougherty i wsp. 1994, Horne i wsp. 1994, Murdoch i wsp. 1998).

Większość terapeutyków szeroko stosowanych w AK, będącej przyczyną wysokiej śmiertelności, wykazuje wysoką toksyczność dla człowieka, wywołując reakcje niepożądane. Z tego powodu poszukuje się alternatywnych propozycji nadających się do zastosowania w przypadku AK. Leki pochodzenia naturalnego zostały już wcześniej stosowane w przypadku innych chorób pasożytniczych (Rodriguez-Zaragoza i wsp. 1999, Kayser i wsp. 2003). Nasze badania ekstraktów z roślin leczniczych takich jak *Solidago virgaurea*, *S. graminifolia*, *Rubus chamaemorus*, *Pueraria lobata* wykazały, że metanolowe ekstrakty z tych roślin są aktywne w stosun-

ku do obu patogenicznych szczepów pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* w stężeniach bardzo niskich, tj. około 0,01 mg/ml i mogłyby być stosowane w kombinowanej terapii z antybiotykami.

W przypadkach zarażenia ludzi *Acanthamoeba* sp., kombinowana terapia w połączeniu ze standardowym antybiotykiem byłaby na pewno bardziej skuteczna niż terapia samym, pojedynczym lekiem. Wiele bowiem leków posiada właściwości pełzakostatyczne, lecz nie posiada właściwości pełzakobójczych. Niektóre leki są zabójcze dla trofozoitów, ale nie są skuteczne w przypadku cyst. Jak do tej pory nie znaleziono skutecznych leków w obu przypadkach (cyst i trofozoitów). Badania skuteczności działania ekstraktów roślinnych *in vivo* w doświadczalnym zarażeniu *Acanthamoeba* sp. są kontynuowane.

LITERATURA

- Budzianowski J. 1990. Two Di-C-glycosylfavones from *Solidago graminifolia*. *Scientia Pharmaceutica* 58: 413-416.
- Budzianowski J., Skrzypczak L., Wesołowska M. 1990. Flavonoids and leiocarposide in four *Solidago* taxa. *Scientia Pharmaceutica* 58: 15-23.
- Callicott J.G. 1968. Amebic meningoencephalitis due to free-living amebas of the *Hartmannella* (*Acanthamoeba*)-*Naegleria* group. *American Journal of Clinical Pathology* 49: 84-91.
- Červa L. 1966. Use of fluorescent antibody technique to identify pathogenic *Hartmannellae* in tissue of experimental animals. *Folia Parasitologica* 13: 328-331.
- Červa L. 1969. Amoebic meningoencephalitis: axenic culture of *Naegleria*. *Science* 163: 576.
- De Jonckheere J.F. 1991. Ecology of *Acanthamoeba*. *Reviews in Infectious Diseases* 13: 385-387.
- Dougherty P.J., Binder P.S., Mondino B.J., Glasgow B.J. 1994. *Acanthamoeba* sclerokeratitis. *American Journal of Ophthalmology* 117: 475-479.
- Ficker L., Seal D., Warhurst D., Wright P. 1990. *Acanthamoeba* keratitis – resistance to medical therapy. *Eye* 4: 835-838.
- Fowler M., Carter R.F. 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *British Medical Journal* 5464: 740-742.
- Horne D.D., Frizell M.E., Ingam L., Janas R.G., Gubash S.M., Anand C.M., Athar M.A. 1994. *Acanthamoeba* keratitis an emerging clinical problem. *Canadian Medical Association Journal* 150: 923-925.
- Jager B.V., Stamm W.P. 1972. Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkins disease. *Lancet* 23: 1343-1345.
- Kasprzak W., Mazur T. 1972. Free living amoebae isolated from waters frequented by people in the vicinity of Poznań, Poland. Experimental studies in mice on the pathogenicity of the isolates. *Tropenmedizin und Parasitologie* 23: 391-398.
- Kayser O., Kiderlen A.F., Croft S.L. 2003. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research* 90: 55-62.
- Kitagawa K., Nakamura T., Takahashi N., Oikawa Y., Ikeda T. 2003. A novel combination treatment of Chlorohexidine gluconate, natamycin (pimaricin) and debridement for a *Acanthamoeba* keratitis. *Japanes Journal of Ophthalmology* 47: 616-617.
- Krawczyk A., Thiem B., Szkudlarek M. 2003. High-performance liquid chromatography of ellagic acid in leaves of *Rubus chamaemorus* L. *Chemia Analityczna (Warszawa)* 48: 891-899.
- Marciano-Cabral F., Cabral G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 273-307.

- Marciano-Cabral F., Puffenbarger R., Cabral G. 2000. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. *Journal of Eucaryotic Microbiology* 47: 29-36.
- Martinez A.J., Sotelo-Avila C., Garcia-Tamayo J., Moron J.T., Willaert E., Stamm W.P. 1977. Meningoencephalitis due to *Acanthamoeba* sp. Pathogenesis and clinico-pathological study. *Acta Neuropathology (Berlin)* 37: 183-191.
- Martinez A.J., Visvesvara G.S. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathology* 7: 583-598.
- Mazur T. 1984. Występowanie *Naegleria fowleri* w środowisku wodnym i właściwości biologiczne izolowanych szczepów. *Wiadomości Parazytologiczne* 30: 3-35.
- Mergeryan H. 1991. The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. *Reviews in Infectious Diseases* 13: 390-391.
- Murdoch D., Gray T.B., Cursons R., Parr D. 1998. *Acanthamoeba* keratitis in New Zealand, including two cases with in vitro resistance to polyhexamethylene biguanide. *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology* 26: 231-236.
- Rodriguez-Zaragoza S., Ordaz C., Avila G., Munoz J.L., Arciniegas A., Romo de Vivar A. 1999. In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Buddleia cordata* (Loganiaceae, H.B.K.) on several strains of *Acanthamoeba*. *Journal of Ethnopharmacology* 66: 327-334.
- Seal D.V. 2003. *Acanthamoeba* keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye* 17: 893-905.
- Szenasi Z., Endo T., Yagita K., Nagy E. 1998. Isolation, identification and increasing importance of "free-living" amoebae causing human disease. *Journal of Medical Microbiology* 47: 5-16.
- Thiem B. 2002. In vitro culture techniques in conservation of *Rubus chamaemorus* L. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 44: 181-188.
- Thiem B. 2003. In vitro propagation of the isoflavones-producing *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *Plant Science* 165: 1123-1128.
- Thiem B., Goślińska O. 2004. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Rubus chamaemorus* L. *Fitoterapia (Elsevier)* 75: 93-95.
- Thiem B., Wesółowska M., Skrzypczak L., Budzianowski J. 2001. Phenolic compounds in two *Solidago* L. species from in vitro culture. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research* 58: 277-281.
- Visvesvara G.S., Stehr-Green J. 1990. Epidemiology of free-living ameba infections. *Journal of Protozoology* 37: 25-33.
- Willaert E., Stevens A.R., Healy G.R. 1976. Indirect immunofluorescent identification of *Acanthamoeba* causing meningoencephalitis. *Pathologie Biologie (Paris)* 24: 545-547.

Zaakceptowano do druku 5 października 2004