

MICHAŁ PLAKWICZ, WIRGINIA JANISZOWSKA

*Zakład Biochemii Roślin
Instytut Biochemii
Uniwersytet Warszawski
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
E-mail: mplakwicz@student.uw.edu.pl
wjanisz@biol.uw.edu.pl*

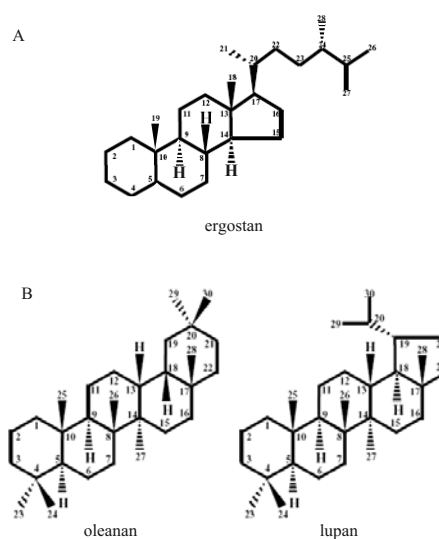
PRZECIWWIRUSOWE DZIAŁANIE TRITERPENOIDÓW ROŚLINNYCH

WSTĘP

Choroby wirusowe towarzyszą ludzkości od zarania dziejów, jednak jak dotąd nie wynaleziono uniwersalnego leku do ich zwalczania. Przeprowadzane od ok. 200 lat szczepienia odgrywają dużą rolę w zapobieganiu rozprzestrzeniania się niektórych zakażeń wirusowych, ale są to przede wszystkim środki profilaktyczne, natomiast jeśli już dojdzie do rozwoju choroby, leczenie bywa trudne i często wymaga stosowania syntetycznych farmaceutyków, którymi na ogół trudno jest zwalczać infekcje latentne, to jest takie, w których wirus „ukrywa się” w komórkach zakażonego pod postacią wirusowego DNA. Ponadto, zakres stosowania leku jest zwykle ograniczony do pojedynczego rodzaju wirusa lub kilku blisko ze sobą spokrewnionych, a co więcej, często wywołuje on efekty uboczne, takie jak dolegliwości żołądkowo-jelitowe, zmiany w układzie nerwowym i szpiku kostnym, niedobory krwinek czy zaburzenia rozwoju płodu. Wreszcie narastającym problemem ostatnich lat jest szybkie tempo mutacji wielu rodzajów wirusów, m. in. HIV, prowadzące do uodporniania się ich na istniejące leki (COLLIER i OXFORD 2001). Wszystko to sprawia, że nieustannie poszukiwane są nowe, naturalne substancje, mogące skutecznie zwalczać choroby wirusowe. Najbogatszym źródłem takich substancji są rośliny, produkujące setki tysięcy związków zwanych metabolitami wtórnymi, które nie odgrywają ważnej roli w metabolizmie podstawowym, ale często pełnią istotne funkcje w procesach

przystosowywania się roślin do środowiska, m.in. jako broń przeciw patogenom, roślinożercom i konkurentom. Wiele z tych substancji wykazuje rozległe działanie farmakologiczne (KOHLMÜNZER 1998, MALEPSZY 2004).

Jedną z najliczniejszych grup roślinnych metabolitów wtórnych są cykliczne triterpenoidy. Powstają one ze skwalenu, zbudowanego z sześciu pięciowęglowych jednostek izoprenoidowych, który po utlenieniu do 2,3-oksydoskwalenu ulega cyklizacji do układów najczęściej cztero- lub pięciopierścieniowych (Ryc.1), rzadziej jedno-, dwu- oraz trój-



Ryc. 1. Przykładowe szkielety triterpenoidów tetracyklicznych (A) i pentacyklicznych (B).

pierścieniowych. Wśród triterpenoidów tetracyklicznych, nazywanych steroidami, trzy pierścienie są sześcioczłonowe, zaś czwarty pięcioczłonowy (Ryc. 1A). Z kolei, triterpenoidy pentacykliczne zwykle posiadają cztery pierścienie sześcioczłonowe i piąty pięciolub sześcioczłonowy (Ryc. 1B).

Triterpeny mogą ulegać utlenianiu do alkoholi, aldehydów, ketonów, epoksydów, kwasów, a także podlegać metylacji i demetylacji, hydrogenacji i dehydrogenacji, estryfikacji czy rozrywaniu pierścienia. Jednakże najliczniejszą grupę stanowią pochodne glikozydowe i glikozydoestrowe, zwane saponinami. Efektem tych wszystkich procesów jest bardzo różnorodna grupa związków, będących pod względem fizycznym ciałami stałymi, na ogół dobrze rozpuszczalnymi w rozpuszczalnikach organicznych, a słabo w wodzie. Jedynie saponiny, z hydrofilowym łańcuchem cukrowym, dość dobrze rozpuszczają się w

wodzie, tworząc z nią pianę dzięki zdolnościom obniżania napięcia powierzchniowego (KĄCZKOWSKI 1992, KOHLMÜNZER 1998).

Triterpenoidy, występujące w znacznych ilościach w roślinach leczniczych, budzą ostatnio duże zainteresowanie przemysłu farmaceutycznego, gdyż wykazują m.in. działanie wiruso-, bakterio-, grzybo- i pierwotniakobójcze, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, przeciwbólowe, przeciwcukrzycowe, hepatoprotekcyjne, a także regulują pracę serca i układu immunologicznego (KOHLMÜNZER 1998, CHOJNICKA i JANISZOWSKA 2007). Celem tego artykułu jest opisanie właściwości antywirusowych triterpenoidów i porównanie ich z powszechnie stosowanymi lekami w celu ustalenia, czy mogą być alternatywą dla istniejących środków przeciwwirusowych. Szczególna uwaga zwrócona jest na potencjalne leki przeciw HIV, ponieważ zakażenie tym wirusem do dzisiaj pozostaje nieuleczalne.

SPOSOBY WYRAŻANIA AKTYWNOŚCI PRZECIWWIRUSOWEJ

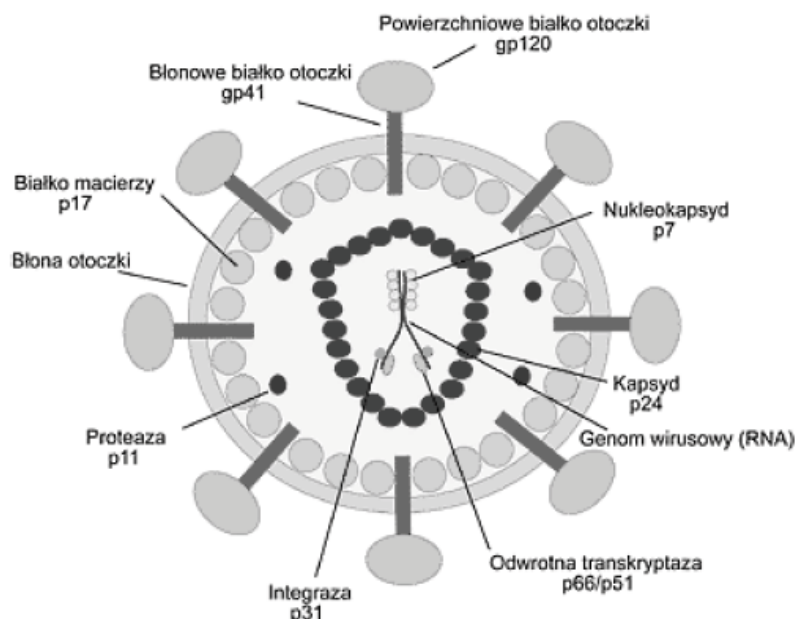
Pierwszym krokiem w badaniu przeciwwirusowej aktywności jakichkolwiek substancji jest przetestowanie ich na kulturach komórkowych zakażonych odpowiednim wirusem. W takim układzie podstawowym parametrem określającym siłę przeciwwirusowego działania związku jest EC_{50} (ang. effective concentration 50), czyli stężenie związku zmniejszające replikację wirusa w komórkach o 50%. Równie ważne jest oszacowanie toksyczności związku, określane zwykle przez CC_{50} (ang. cytotoxic concentration 50), tj. stężenie przy którym ginie 50% komórek, rzadziej przez MTC (ang. maximum tolerable concentration), czyli maksymalne stężenie niewywołujące cytotoksyczności. Stosunek CC_{50} do EC_{50} ,

zwany indeksem terapeutycznym (ang. therapeutic index, TI), określa, czy dany związek jest wystarczająco nieszkodliwy dla komórek, aby mógł być wykorzystany w medycynie. Obiecujące związki są badane pod kątem mechanizmu działania, z uwzględnieniem ich oddziaływania na białka uczestniczące w poszczególnych etapach cyklu życiowego wirusa. W badaniach aktywności poszczególnych enzymów wirusowych oznacza się IC_{50} (ang. inhibitory concentration 50), to jest stężenie związku hamujące aktywność enzymu o połowę. Następnie najskuteczniejsze związki poddawane są badaniom *in vivo*, najpierw na zwierzętach, a potem na ludziach.

DZIAŁANIE TRITERPENOIDÓW NA LUDZKI WIRUS NIEDOBRU ODPORNOŚCI (HIV)

AIDS (ang. acquired immune deficiency syndrome, nabyty zespół zaniku odporności) jest chorobą rozwijającą się na skutek upośledzenia komórek układu immunologicznego, głównie limfocytów T oraz monocytów i makrofagów, w wyniku zakażenia wirusem HIV (ang. human immunodeficiency virus, ludzki wirus niedoboru odporności) (Ryc. 2), należącym do rodziny retrowirusów (Retroviridae). Pierwsze przypadki choroby zanotowano na początku lat 80. XX w. w USA, na Haiti i w Afryce, obecnie zaś epidemia AIDS objęła

kraje na wszystkich kontynentach. HIV przenosi się poprzez kontakty seksualne, krew, a także od zakażonej matki do płodu. Po kilku latach od zakażenia wirusem u nieleczonych ludzi rozwija się pełnoobjawowy AIDS, charakteryzujący się występowaniem ciężkich zakażeń wywoływanych przez tzw. patogeny oportunistyczne, niewywołujące chorób u osób bez upośledzenia odporności. Infekcje te prowadzą w ciągu kilkunastu miesięcy do wyniszczenia organizmu i śmierci. Wyróżnia się dwa rodzaje wirusa HIV: HIV-1, wystę-



Ryc. 2. Budowa wirusa HIV.

pujący wśród mieszkańców Europy i Ameryki, oraz HIV-2, charakterystyczny dla krajów Afryki i Indii (GOŹDZICKA-JÓZEPIAK 2004). Prawie wszystkie opisane niżej triterpenoidy były testowane tylko na szczepach HIV-1.

Jak dotąd nie wynaleziono jeszcze leku, który prowadziłby do całkowitego wyleczenia, jednak stosowne środki znacznie przedłużają życie zarażonych. Podstawową przyczyną niemożności wyleczenia jest szybkie tempo mutacji HIV, wynikające z małej wierności procesu kopiowania przeprowadzanego przez odwrotną transkryptazę wirusa. Aby spowolnić pojawianie się szczepów opornych, u chorych stosuje się jednocześnie środki o różnych sposobach działania (AIKEN i CHEN 2005). Wśród 32 leków przeciw HIV dostępnych na rynku znajdują się głównie inhibitory odwrotnej transkryptazy i inhibitory wirusowej proteazy (www.fda.gov/oashi/aids/virals.html). Ponieważ nawet kombinacja różnych leków nie zapobiega całkowicie tworzeniu się wirusów opornych, prowadzone są intensywne badania nad uzyskaniem nowych leków, także triterpenoidowych.

Dotychczas wykazano, że dziesiątki triterpenoidów, zarówno wyizolowanych z roślin, jak i zmodyfikowanych chemicznie, hamuje namnażanie się HIV, a niektóre z nich wykazują wyjątkowo silną aktywność. Ze względu na mechanizm działania dzieli się je na związki blokujące wnikanie wirusa do komórki, inhibitory wirusowych enzymów (odwrotnej transkryptazy, integrazy i proteazy), a także związki zakłócające dojrzewanie wirionów

(AIKEN i CHEN 2005). Dużą grupę stanowią też związki o jeszcze nieznanym mechanizmie działania (Tabela 1, Ryc. 3).

Pierwszym etapem w cyklu replikacyjnym wirusa HIV jest adsorpcja na powierzchni komórki i fuzja jego otoczki lipidowej z błoną komórkową. Bierze w tym udział zakotwiczona w otoczce glikoproteina gp120 (Ryc. 2), oddziałująca z komórkowym receptorem CD4 i koreceptorami CCR5 lub CXCR4. Powstałe połączenie powoduje konformacyjną zmianę w zasocjowanym z gp120 białku gp41, której rezultatem jest pokonanie sił odpychania między obdarzonymi ładunkiem powierzchniami membran i zlanie się otoczki wirusa z błoną komórkową (AIKEN i CHEN 2005).

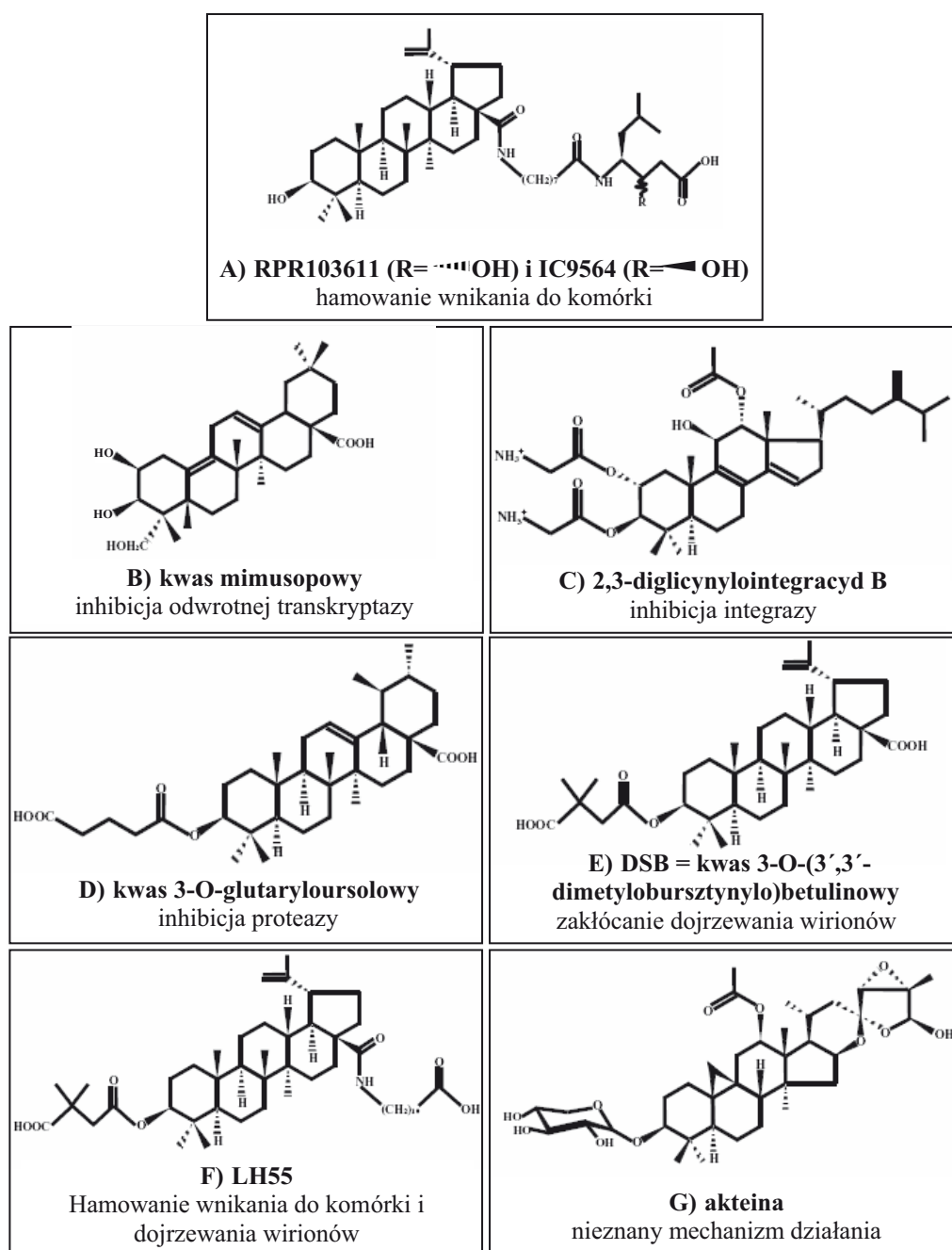
Wchodzenie wirionów do komórki hamuje między innymi glicyryzyna z korzeni lukrecji (*Glycyrrhiza* spp.), będąca najwcześniej wykrytym roślinnym triterpenoidem przeciw HIV-1. Aktywność tej saponiny jest stosunkowo słaba ($EC_{50}=150\text{ }\mu\text{M}$) (ITO i współaut. 1987), zaś mechanizm działania polega na częściowym blokowaniu adsorpcji wirusa oraz na hamowaniu działania kinazy białkowej C, komórkowego enzymu niezbędnego w procesie wnikania wirionu (HUANG i CHEN 2002, YU i współaut. 2007).

Późniejsze badania wykazały, że uzyskane chemicznie C-28-amidowe pochodne naturalnego kwasu betulिनowego znacznie skuteczniej hamują wnikanie HIV-1 do komórki. Spośród nich najefektywniej działają diastereoizomery o symbolach IC9564 i RPR103611 (Rys 3A), wykazujące znaczną siłę działania

Tabela 1. Triterpenoidy hamujące rozwój HIV-1.

Triterpenoid	Źródło związku	Hamowany enzym lub proces	Aktywność
glicyryzyna	korzenie <i>Glycyrrhiza</i> spp. (Fabaceae).		niska
IC9564 = kwas (3R,4S)-N-[N-[3β-hydroksylup-20(29)-en-28-oilo]-8-aminooktanoilo]-4-amino-3-hydroksy-6-metyloheptanowy	syntetycznie zmodyfikowany kwas betulinowy	wnikanie do komórki	wysoka
RPR103611 = kwas (3S,4S)-N-[N-[3β-hydroksylup-20(29)-en-28-oilo]-8-aminooktanoilo]-4-amino-3-hydroksy-6-metyloheptanowy	syntetycznie zmodyfikowany kwas betulinowy		wysoka
3,4-seco-cykloarta-4(28),24-dien-29-hydroksy-23-okso-3-onian metylu	liście i gałązki <i>Gardenia obtusifolia</i> (Rubiaceae)	odwrotna transkryptaza	niska
kwas mimusopowy	nasiona <i>Mimusops elengii</i> (Sapotaceae)		średnia
integracyd A	<i>Fusarium</i> sp. (Ascomycetes)	integraza	średnia
2,3-diglicynylointegracyd B	syntetycznie zmodyfikowany integracyd B		średnia
kwas ursolowy	łodygi <i>Cynomorium songaricum</i> (Cynomoriaceae)	proteaza	średnia
kwas oleanolowy	drewno <i>Xanthoceras sorbifolia</i> (Sapindaceae)		średnia
3-O-glutarylowe pochodne kwasu oleanolowego, ursolowego i betulinowego	syntetycznie zmodyfikowany kwas oleanolowy, ursolowy i betulinowy		średnia
DSB = bevirimat = kwas 3-O-(3',3'-dimetylobursztynylo) betulinowy	syntetycznie zmodyfikowany kwas betulinowy	dojrzewanie wirionów	wysoka
LH15 = N-[3-β-O-(3',3'-dimetylobursztynylo)-lup-20(29)-en-28-oilo]-L-leucyna	syntetycznie zmodyfikowany kwas betulinowy	wnikanie do komórki i dojrzewanie wirionów	wysoka
LH55 = kwas N-[3-β-O-(3',3'-dimetylobursztynylo)-lup-20(29)-en-28-oilo]-11-aminoundekanowy	syntetycznie zmodyfikowany kwas betulinowy		wysoka
akteina	kłącze <i>Cimicifuga racemosa</i> (Ranunculaceae)	mechanizm nieznany	wysoka

aktywność wysoka – EC₅₀(IC₅₀) < 1 µg/ml (µM); aktywność średnia – EC₅₀(IC₅₀) = 1 do 20 µg/ml (µM); aktywność niska – EC₅₀(IC₅₀) > 20 µg/ml (µM)



Ryc. 3. Triterpenoidy przeciw wirusowi HIV-1.

(EC_{50} wyrażane w stężeniach nanomolowych) i niską toksyczność ($TI > 100$) (HUANG i CHEN 2002).

Stwierdzono, że związki te nie blokują adsorpcji cząsteczek wirusa na powierzchni komórki, ale hamują fuzję jego otoczki z błoną cytoplazmatyczną. Analiza mutantów opornych na te triterpenoidy ustaliła, że miejscem oddziaływania są glikoproteiny gp120 i gp41. Przypuszcza się, że IC9564 i RPR103611 zakłócają molekularne sygnały między tymi białkami, ale dokładny mechanizm działania

pozostaje nieznany i wymaga dalszych badań (AIKEN i CHEN 2005).

Kolejnym etapem cyklu replikacyjnego HIV jest przepisanie zawartego w nukleokapsydzie (+)RNA na dwuniciowy DNA przy pomocy specyficznego dla retrowirusów enzymu – odwrotnej transkryptazy (RT) (GOŹDZICKA-JÓZEPIAK 2004). Enzym ten jest celem licznych leków przeciw HIV, m.in. azydetymidyny czy efawirenzu, hamujących jego aktywność już w stężeniach nanomolowych (HUANG i CHEN 2002). Również wśród

triterpenoidów istnieją związki hamujące odwrotną transkryptazę, ale wykazują znacznie słabsze działanie. I tak np. 3,4-seco-cykloart-4(28),24-dien-29-hydroksy-23-okso-3-onian metylu, występujący w liściach i gałązkach *Gardenia obtusifolia*, w stężeniu 200 µg/ml hamuje działanie RT aż o 99,9%, jest jednak zbyt toksyczny, aby mógł być wykorzystany w medycynie (TUCHINDA i współaut. 2002). Lepszy pod tym względem jest kwas mimusopowy (Ryc. 3B), uzyskany z nasion *Mimusops elengii*, którego IC_{50} wynosi od 10 do 20 µM (HUANG i CHEN 2002).

Po zakończeniu odwrotnej transkrypcji kapsyd wirusa rozpada się, zaś prowirusowy DNA jest transportowany do jądra i włączany w losowe miejsce w genomie komórki. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa wirusowy enzym zwany integrazą (GOŹDZIK-KA-JÓZEFIAK 2004). Do tej pory znaleziono tylko jeden lek (raltegravir) oddziałujący na ten etap cyklu replikacyjnego (www.fda.gov/oashi/aids/virals.html), tak więc intensywnie poszukiwane są związki hamujące aktywność tego enzymu. Ostatnio wyizolowano z grzyba *Fusarium* sp. pięć tetracyklicznych triterpenoidów zwanych integracydami, które okazały się być inhibitorami integrazy, przy czym najsilniejsze działanie wykazuje integracyd A (IC_{50} od 4 do 9 µM). Syntetyczne pochodne integracydów są bardziej aktywne niż związki naturalne, a wśród nich najefektywniejszym jest 2,3-diglicynylointegracyd B ($IC_{50}=1,7$ µM) (Ryc. 3C) Obecność obdarzonej ładunkiem reszty glicynowej sugeruje, że związek ten może oddziaływać z dwuwartościowym metalem (np. Mg^{2+}), znajdującym się w centrum aktywnym integrazy. Niestety integracydy są dość toksyczne dla komórek, co ogranicza ich stosowanie jako leków przeciw HIV (SINGH i współaut. 2003).

Po integracji prowirusowego DNA z genomem komórki następuje jego transkrypcja. Na matrycy powstałego mRNA syntetyzowane są poliproteiny Env, Gag, Pol i Gag-Pol. Env podlega obróbce przez komórkową proteazę z wytworzeniem białek otoczki gp120 i gp41, natomiast pozostałe poliproteiny w wyniku działania specyficznej wirusowej proteazy są przekształcane w białka tworzące dojrzały rdzeń wirusa. Proteaza HIV-1 jest, obok odwrotnej transkryptazy, kluczowym enzymem cyklu replikacyjnego tego patogenu i stanowi cel licznych leków, takich jak np. indinawir czy ritonavir (www.fda.gov/oashi/aids/virals.html). Niektóre triterpenoidy hamują aktywność proteazy HIV-1, choć

ich działanie jest zdecydowanie słabsze od stosowanych farmaceutyków. Przykładami takich związków są kwas ursolowy z *Cynomorium songaricum* i kwas oleanolowy z *Xanthoceras sorbifolia*. Ich aktywność można zwiększyć poprzez chemiczne modyfikacje, np. 3-O-glutarylowe pochodne kwasu ursolowego (Ryc. 3D), oleanolowego i betulinowego wykazują silniejsze działanie ($IC_{50} = 4\mu M$). Przypuszcza się, że mechanizm ich działania polega na hamowaniu dimeryzacji enzymu (HUANG i CHEN 2002).

Ciekawą grupę stanowią triterpenoidy zakłócające dojrzewanie wirionów. Wśród nich bardzo silną aktywność wykazuje kwas 3-O-(3',3'-dimetylobursztynylo)betulinowy (DSB) (Ryc. 3E), syntetyczna pochodna naturalnego kwasu betulinowego. Związek ten zmniejsza namnażanie wirusa o 50% już przy stężeniu 0,35 nM i jest praktycznie nietoksyczny dla komórek ($TI > 20000$) (HUANG i CHEN 2002). DSB opóźnia cięcie przez proteazę poliproteiny Gag w miejscu pomiędzy białkiem kapsydu (zwanym CA lub p24) a peptydem SP1, prawdopodobnie poprzez niekowalencyjne oddziaływanie z poliproteina. Miejsce to jest przecinane jako ostatnie i w związku z tym ma ono decydujący wpływ na szybkość obróbki Gag. Efektem działania DSB jest nagromadzenie peptydów CA-SP1 w powstającym wirionie i tworzenie cząstek wirusowych z nieprawidłowym rdzeniem, wykazujących bardzo słabą infekcyjność (AIKEN i CHEN 2005).

Ponieważ DSB wykazuje bardzo silną aktywność i znikomą toksyczność *in vitro* oraz nowy, unikalny sposób działania, zbadano jego właściwości *in vivo*. W testach na myszach podawany doustnie DSB redukował replikację wirusa o ponad 90%. Wyniki te skłoniły firmę Panacos do przeprowadzenia testów klinicznych, które jednoznacznie wykazały, że związek ten, nazwany bevirimatem, odznacza się dobrymi właściwościami farmakokinetycznymi i powoduje znaczny spadek miana wirusa nawet w przypadku szczepów opornych na inne leki. Wiosną 2006 r. rozpoczęto fazę IIb testów klinicznych, zaś lek powinien pojawić się na rynku około 2009 r. (www.panacos.com/product_2.htm).

Ponieważ pochodne kwasu betulinowego z zablokowaną grupą karbonylową C-28 hamują wnikanie HIV-1 do komórki, zaś pochodne z zestryfikowaną grupą hydroksylową przy C-3 zakłócają jego dojrzewanie, postanowiono stworzyć triterpenoidy o podwójnym działaniu poprzez zmodyfikowa-

nie obu wymienionych grup funkcyjnych. W ten sposób otrzymano związki o symbolach LH15 i LH55 (Ryc. 3F). Zgodnie z oczekiwaniem związki te hamowały zarówno fuzję otoczki wirusa z błoną komórkową, jak i cięcie CA-SP1 przez proteazę (AIKEN i CHEN 2005), przy czym okazały się być co najmniej kilkukrotnie efektywniejsze od DSB i IC9564 i co więcej, hamowały replikację szczepów opornych na te dwa triterpenoidy (ALAKURTTI i współaut. 2006). Tak więc, LH55 i LH15 są obiecującymi kandydatami

na leki przeciw HIV-1, ale nie były jeszcze testowane klinicznie.

Mechanizm działania dużej grupy roślinnych triterpenoidów wykazujących aktywność przeciw HIV nie został jeszcze zbadany. Przykładem takiego związku jest akteina (Ryc. 3G), saponina wyizolowana z kłączy pluskwicy (*Cimicifuga racemosa*), która wykazuje dość wysoką skuteczność ($EC_{50}=0,55 \mu M$) oraz niską cytotoksyczność ($TI=144$) (YU i współaut. 2007). Niewątpliwie związek ten będzie dalej testowany.

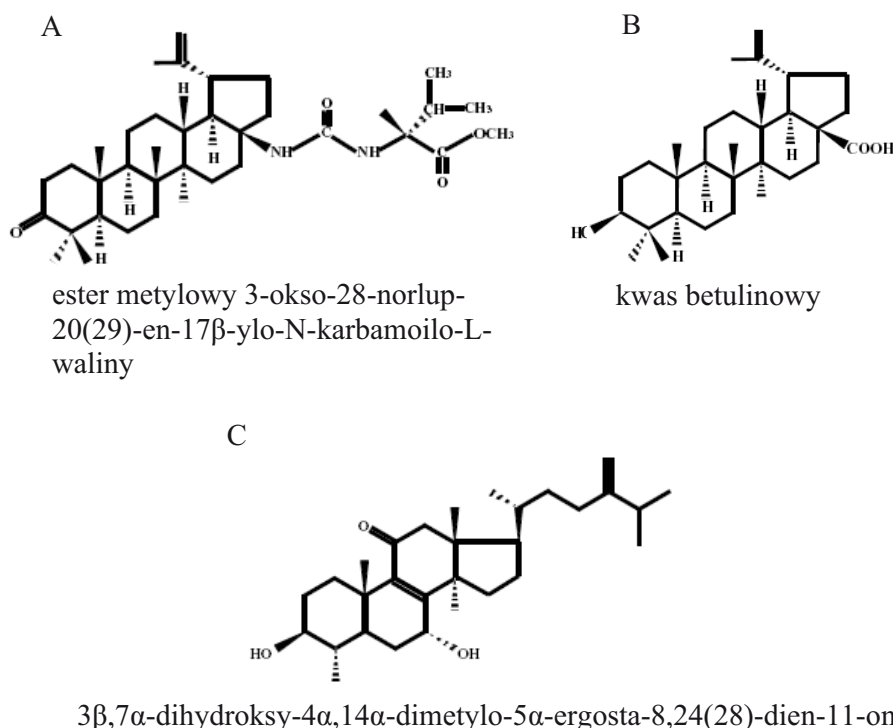
DZIAŁANIE TRITERPENOIDÓW NA INNE WIRUSY

Triterpenoidy hamują replikację nie tylko HIV-1, ale także wielu innych wirusów, należących do rozmaitych rodzin (Ryc. 4, Tabela 2). Wiele z nich to, podobnie jak w przypadku wirusa HIV, pochodne betuliny (lup-20(29)-en-3,28-diolu), naturalnego triterpenoidu występującego w dużych ilościach (10-35%) w korze różnych gatunków brzozy (*Betula* spp.) (BALTINA i współaut. 2003).

GONG i współaut. (2004) stwierdzili, że betulina hamuje rozwój zarówno wirusa HSV-1 ($EC_{50}=0,40 \mu g/ml$), odpowiedzialnego za opryszczkę wargową, jak i HSV-2 ($EC_{50}=4,15 \mu g/ml$), będącego przyczyną opryszczki narządów płciowych. Co więcej, w obu przypadkach związek ten działa synergistycznie z

acyklowirem, znanym lekiem zwalczającym herpeswirusy. Tym samym wykazano, że betulina może być stosowana razem z innymi lekami. Również ester metylowy 3-okso-28-norlup-20(29)-en-17 β -ylo-N-karbamoilo-L-waliny (Ryc. 4A) skutecznie zwalcza wirusa HSV-1, osiągając $EC_{50}=0,17 \mu M$ i $MTC=85 \mu M$ (FLEKHTER i współaut. 2003).

Z kolei PAVLOVA i współaut. (2003) wykazali, że powstały przez utlenienie betuliny kwas betulinowy (Ryc. 4B) posiada bardzo wysoką aktywność względem wirusa ECHO-6, odpowiedzialnego m.in. za zakażenia dróg rodnych i opon mózgowo-rdzeniowych oraz zatrucia pokarmowe. Związek ten zmniejsza replikację wirusa już przy stężeniu $0,007 \mu M$,



Ryc. 4. Przykłady triterpenoidów działających na wirus HSV-1 (A), wirus ECHO-6 (B) i wirus Epstein-Barr (C).

Tabela 2. Triterpenoidy działające na wirusy inne niż HIV.

Triterpenoid	Źródło związku	Wirus	Aktywność
betulina	kora <i>Betula papyrifera</i> (<i>Betulaceae</i>)	Hesper simplex virus1 = HSV-1 (<i>Herpesviridae</i>)	wysoka
		Hesper simplex virus2 = HSV-2 (<i>Herpesviridae</i>)	średnia
kwas betulinowy	syntetycznie zmodyfikowa- wana betulina	Enteric cytopathogenic human orphan virus 6 = ECHO-6 (<i>Picornaviridae</i>)	wysoka
amid kwasu betulonowego	syntetycznie zmodyfikowa- wana betulina	Influenza A virus (<i>Orthomyxoviridae</i>)	wysoka
ester metylowy 3-okso-28- norlup-20(29)-en-17β-ylo- N-karbamoilo-L-waliny	syntetycznie zmodyfikowa- wana betulina	Hesper simplex virus1 = HSV-1(<i>Herpesviridae</i>)	wysoka
28-deacetylosendanina	owoce <i>Melia azaderach</i> (<i>Meliaceae</i>)	Hesper simplex virus1 = HSV-1(<i>Herpesviridae</i>)	średnia
1-cynamoilo-3,11-dihydroksyme- liakarpina	liście <i>Melia azaderach</i> (<i>Meliaceae</i>)	Hesper simplex virus1 = HSV-1(<i>Herpesviridae</i>)	średnia
		Vesicular stomatitis virus =VSV (<i>Rhabdoviridae</i>)	średnia
ester metylowy kwasu glicyretowa- wego	syntetycznie zmodyfikowa- ny kwas glicyretowy	Hesper simplex virus1 = HSV-1(<i>Herpesviridae</i>)	średnia
kwas 3-O-glukozylooleanolowy	<i>Thinouia coriacea</i> (<i>Sapindaceae</i>)	Hesper simplex virus1 = HSV-1(<i>Herpesviridae</i>)	niska
glukozyloester kwasu tormento- wego	<i>Sargentodoxa cuneata</i> (<i>Sargentodoxaceae</i>)	Hesper simplex virus1 = HSV-1(<i>Herpesviridae</i>)	niska
kadsufilakton B	liście i łodygi <i>Kadsura</i> <i>phillipinensis</i> (<i>Schisandraceae</i>)	Hepatitis B virus =HBV (<i>Hepadnaviridae</i>)	średnia
3β,7α-dihydroksy-4α,14α-dimety- lo-5α-ergosta-8,24(28)-dien-11-on	cała roślina <i>Euphorbia</i> <i>chamaesyce</i> (<i>Euphorbiaceae</i>)	Epstein-Barr virus = EBV (<i>Herpesviridae</i>)	średnia
(24R) 24,25-dihydroksyhelianol, (24S) 24,25-dihydroksyhelianol	ziarna pyłku słonecznika zwyczajnego (<i>Helianthus</i> <i>annuus</i> , <i>Asteraceae</i>)	Epstein-Barr virus = EBV (<i>Herpesviridae</i>)	średnia

aktywność wysoka – EC50(IC50)<1 µg/ml(µM); aktywność średnia – EC50(IC50)=1 do 20 µg/ml(µM); aktywność niska – EC50(IC50)>20 µg/ml(µM)

zaś jego MTC wynosi 29 μM , co jest wynikiem lepszym od pleconarilu, leku zwalczającego pikornawirusy. Z kolei amid kwasu betulonowego wykazuje wysoką aktywność w stosunku do wirusa grypy typu A ($\text{EC}_{50}=0,7 \mu\text{M}$) i jest toksyczny dopiero przy stężeniu 933 μM (BALTINA i współaut. 2003).

Dokładny mechanizm działania powyższych triterpenoidów nie został jeszcze poznany. Znany jest natomiast mechanizm działania 28-deacetylosendaniny, nietypowego triterpenoidu tetracyklicznego z *Melia azaderach*, hamującego namnażanie HSV-1 ($\text{EC}_{50}=1,46 \mu\text{g/ml}$). Obserwacje w mikroskopie elektronowym wykazały, że związek ten powoduje powstawanie wadliwych nukleokapsydów niezdolnych do opuszczania komórki oraz hamuje syntezę wirusowej kinazy tymidynowej, niezbędnej we wczesnej fazie infekcji (KIM i współaut. 1999).

Inny triterpenoid otrzymany z *Melia azaderach*, 1-cynamoilo-3,11-dihydroksymeliakarpina, zakłóca replikację HSV-1 poprzez hamowanie transportu wirusowych glikoprotein, przez co gromadzą się one w aparacie Golgiego i nie są w stanie organizować się w wiriony. Podobny wynik uzyskano dla wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV), niepatogennego dla człowieka, ale blisko spokrewnionego z niebezpiecznym wirusem wścieklizny (BARQUERO i współaut. 2006).

Triterpenoidy typu oleananu również hamują rozwój wirusa HSV-1, zaś jednym z bardziej aktywnych jest ester metylowy kwasu glicyretowego ($\text{EC}_{50}=8,1 \mu\text{M}$ i $\text{TI}>26$) (IKEDA i współaut. 2005). Znany jest mechanizm działania saponiny należącej do tej grupy – 3-O-glukozydu kwasu oleanolowego – hamuje on produkcję wirusowego DNA. Z kolei inna saponina – glukozyloester kwasu tormentowego – zakłóca syntezę białek kapsydu (SIMÕES i współaut. 1999).

Poważny problem medyczny stanowi wirus żółtaczkowy typu B (HBV), zakażenie którym może powodować raka wątroby (GOŻ-

DZICKA-JÓZEPIAK 2004). Dość skuteczny w zwalczaniu tego wirusa jest kadsufilakton B, pochodna cykloartanu, obecna w łodygach i liściach *Kadsura philippinensis*. Redukuje on produkcję wirusowego antygenu HbsAg w komórkach linii HepA2 ($\text{IC}_{50}=6 \mu\text{g/ml}$), będąc jednocześnie nietoksycznym aż do stężenia 200 $\mu\text{g/ml}$ (SHEN i współaut. 2005).

Wirusem rakotwórczym jest również wirus Epstein-Barr (EBV) wywołujący niegroźną chorobę zwaną mononukleozą zakaźną. Przewlekłe zakażenie tym wirusem może prowadzić do poważnych następstw, tj. nowotworów takich jak chłoniak Burkitta czy rak jamy nosowo-gardłowej (GOŻDZICKA-JÓZEPIAK 2004).

Do badań nad rakotwórczymi właściwościami EBV wykorzystuje się komórki linii Raji, zawierające genom wirusa, pobudzone do produkcji białek wirusowych przy pomocy 13-octanu tetradekanoiloforbolu. Miarą aktywności przeciwwirusowej i jednocześnie przeciwnowotworowej jest ilość wyprodukowanego wczesnego antygenu EBV (EBV-EA).

Metodą tą wykryto setki naturalnych związków hamujących nowotworzenie wywołane przez EBV, w tym wiele triterpenoidów. Wśród nich wysoką aktywność wykazuje np. 3 β ,7 α -dihydroksy-4 α ,14 α -dimetylo-5 α -ergosta-8,24(28)-dien-11-on (Ryc. 4C), otrzymany z wilczomlecza (*Euphorbia chamaesyce*), który hamuje produkcję EBV-EA o 83,6% przy stężeniu 16 μM (TANAKA i współaut. 2000). Dwa inne triterpenoidy tetracykliczne – izomery 24R i 24S 24,25-dihydroksyhelianolu, wyizolowane z ziaren pyłku słonecznika (*Helianthus annuus*), wykazują w tych samych warunkach odpowiednio 81,5 i 80,9% redukcji ilości EBV-EA (UKIYA i współaut. 2003). Ponadto liczne triterpeny z *Eriobotrya japonica*, *Cammelia japonica*, *Euphorbia antiquorum* i *Momordica grosvenori* redukują poziom EBV-EA z wydajnością pomiędzy 70 i 80% (AKIHISA i współaut. 2002, 2004; UKIYA i współaut. 2002; TANIGUCHI i współaut. 2002).

PODSUMOWANIE

Przedstawione w tym artykule dane jednoznacznie wskazują, że triterpenoidy roślinne i ich pochodne są dobrymi kandydatami na leki zwalczające wirusy. Poznano już mechanizmy działania wielu z nich, zwłaszcza wobec HIV-1 i HSV-1. Ponadto niektóre tri-

terpenoidy (np. LH55 czy DSB) wykazują ekstremalnie wysoką aktywność przeciwwirusową i niską toksyczność, co sprawia, że mogą być szeroko stosowane jako uzupełnienie leczenia chemioterapeutykami. Przypadek DSB, związku przeciw HIV-1 będącego w trakcie

prób klinicznych, pozwala sądzić, że w przyszłości triterpenoidy staną się ważną grupą leków przeciwwirusowych. Aby jednak tak się stało, w większości przypadków niezbędne jest uzupełnienie badań *in vitro* badania-

mi *in vivo*, których wyniki bywają trudne do przewidzenia, gdyż zależą od skomplikowanych interakcji pomiędzy komórkami organizmu.

ANTIVIRAL ACTIVITY OF PLANT TRITERPENOIDS

Summary

One of the most interesting groups of secondary plant compounds are penta- and tetracyclic triterpenoids and their glycosides and glycosidoesters. They have a wide spectrum of pharmaceutical activities such as anti-inflammatory, anti-tumor, anti-mutagenic, cytotoxic, anti-hepatotoxic, anti-diabetic, anti-bacterial etc. This review summarises studies on an-

tiviral activity of triterpenoids and their natural and synthetic derivatives. Possible mechanisms of pharmacological effects on human immunodeficiency virus (HIV) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1) as well as the prospects for future applications of these compounds are discussed.

LITERATURA

- AIKEN C., CHEN C. H., 2005. *Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals*. Trends Mol. Med. 11, 31–36.
- AKIHISA T., WIJERATNE E.M.K., TOKUDA H., ENJO F., TORIUMI M., KIURA Y., KOINE K., NIKAIIDO T., TEZUKA Y., NISHINO H., 2002. *Eupha-7,9(11),24-trien-3 β -ol („Antiquol C”) and other triterpenes from Euphorbia antiquorum latex and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation*. J. Nat. Prod. 65, 158–162.
- AKIHISA T., TOKUDA H., UKIYA M., SUZUKI T., ENJO F., KOIKE K., NIKAIIDO T., NISHINO H., 2004. *3-Epicabraleahydroxylactone and other triterpenoids from camellia oil and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation*. Chem. Pharm. Bull. 52, 153–156.
- ALAKURTTI S., MÄKELÄ T., KOSKIMES S., YLI-KAUHALUOMA J., 2006. *Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin*. Eur. J. Pharm. Sci. 29, 1–13.
- BALTINA L. A., FLEKHTER O. B., NIGMATULLINA L. R., BOREKO E. I., PAVLOVA N. L., NIKOLAEVA S. N., SAVINOVA O. V., TOLSTIKOV G. A., 2003. *Lupane triterpenes and derivatives with antiviral activity*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 13, 3549–3552.
- BARQUERO A. A., MICHELINI F. M., ALCHE L. E., 2006. *1-Cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpin is a natural bioactive compound with antiviral and nuclear factor- κ B modulating properties*. Bioch. Biophys. Res. Comm. 344, 955–962.
- CHOJNICKA I., JANISZOWSKA W., 2007. *Przeciwnowotworowe działanie roślinnych triterpenoidów: kwasu oleanolowego i ursolowego oraz ich pochodnych*. Kosmos 56, 276–277.
- COLLIER L., OXFORD J., 2001. *Wirusologia*. PZWL, Warszawa.
- FLEKHTER O. B., BOREKO E. I., NIGMATULLINA L. R., TRETYAKOVA E. V., PAVLOVA N. I., BALTINA L. A., NIKOLAEVA S. N., SAVINOVA O. V., GALIN F. Z., TOLSTIKOV G. A., 2003. *Synthesis and antiviral activity of ureides and carbamates of betulinic acid and its derivatives*. Russ. J. Bioorg. Chem. 29, 655–661.
- GONG Y., RAJ K. M., LUSCOMBE C. A., GDAWSKI I., TAM T., CHU J., GIBSON D., CARLSON R., SACKS S. L., 2004. *The synergistic effect of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses*. Antivir. Res. 64, 127–130.
- GOŹDZICKA-JÓZEFIAK A., 2004. *Wirusologia molekularna*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań.
- HUANG L., CHEN C. H., 2002. *Molecular targets of anti-HIV-1 triterpenes*. Curr. Drug Targets Infect. Disord. 2, 33–36.
- IKEDA T., YOKOMIZO K., OKAWA M., TSUCHIHASHI R., KINJO J., NOHARA T., UYEDA M., 2005. *Anti-herpes virus type 1 activity of oleanane-type triterpenoids*. Biol. Pharm. Bull. 28, 1779–1781.
- ITO M., NAKASHIMA H., BABA M., PAUWELS R., DE CLERCQ E., SHIGETA S., YAMAMOTO N., 1987. *Inhibitory effect of glycyrrhizin on the in vitro infectivity and cytopathic activity of the human immunodeficiency virus [HIV (HTLV-III/LAV)]*. Antivir. Res. 7, 127–137.
- KĄCZKOWSKI J., 1992. *Biochemia roślin, t.1 i 2*. PWN, Warszawa.
- KIM M., KIM S. K., PARK B. N., LEE K. H., MIN G. H., SEOH J. Y., PARK C. G., HWANG E. S., CHA C. Y., KOOK Y. H., 1999. *Antiviral effects of 28-deacetylSENDANIN on herpes simplex virus-1 replication*. Antivir. Res. 43, 103–112.
- KOHLMÜNZER S., 1998. *Farmakognozja*. PZWL, Warszawa.
- Nowa Encyklopedia Powszechna*, 1995. PWN, Warszawa.
- MAŁEPSZY S., 2004. *Biotechnologia roślin*. PWN, Warszawa.
- PAVLOVA N. I., SAVINOVA O. V., NIKOLAEVA S. N., BOREKO E. I., FLEKHTER O. B., 2003. *Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and nonenveloped viruses*. Fitoterapia 74, 489–492.
- SHEN Y. C., LIN Y. C., CHIANG M. Y., YEH S. F., CHENG Y. B., LIAO C. C., 2005. *Kadsuphilactones A and B, two new triterpene dilactones from Kadsura philippinensis*. Org. Lett. 7, 3307–3310.
- SIMÕES C. M. O., AMOROS M., GIRRE L., 1999. *Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins*. Phytot. Res. 13, 323–328.
- SINGH S. B., ONDEYKA J. G., SCHLEIF W. A., FELOCK P., HAZUDA D. J., 2003. *Chemistry and structure-activity relationship of HIV-1 integrase inhibitor integracide B and related natural products*. J. Nat. Prod. 66, 1338–1344.
- TANAKA R., KASABUCHI K., KITA S., TOKUDA H., NISHINO H., MATSUNAGA S., 2000. *Bioactive steroids*

- from the whole herb of *Euphorbia chamaesyce*. J. Nat. Prod. 63, 99–103.
- TANIGUCHI S., IMAYOSHI Y., KOBAYASHI E., TAKAMATSU Y., ITO H., HATANO T., SAKAGAMI H., TOKUDA H., NISHINO H., SUGITA D., SHIMURA S., YOSHIDA T., 2002. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. Phytochemistry 59, 315–323.
- TUCHINDA P., POMPIMON W., REUTRAKUL V., POHMAKOTR M., YOOSOK C., KONGAI N., SOPHASAN S., SUJARIT K., UPATHUM S. E., SANTISUK T., 2002. Cytotoxic and anti-HIV-1 constituents of *Gardenia obtusifolia* and their modified compounds. Tetrahedron 58, 8073–8086.
- UKIYA M., AKIHISA T., TOKUDA H., TORIUMI M., MUKAINAKA T., BANNO N., KIURA Y., HASEGAWA J., NISHINO H., 2002. Inhibitory effects of cucurbitane glycosides and other triterpenoids from the fruit of *Momordica grosvenori* on Epstein-Barr virus early antigen induced by tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. J. Agric. Food Chem. 50, 6710–6715.
- UKIYA M., AKIHISA T., TOKUDA H., KOINE K., TAKAYASU J., OKUDA H., KIURA Y., NIKAIIDO T., NISHINO H., 2003. Isolation, structural elucidation and inhibitory effects of terpenoid and lipid constituents from sunflower pollen on Epstein-Barr virus early antigen induced by tumor promoter, TPA. J. Agric. Food Chem. 51, 2949–2957.
- YU D., MORRIS-NATSCHKE S. L., LEE K. H., 2007. New developments in natural products-based anti-AIDS research. Med. Res. Rev. 28, 108–132.