

## Właściwości lecznicze betuliny i kwasu betulinowego, składników ekstraktu z kory brzozy

### Therapeutic properties of betulin and betulinic acid, components of birch bark extract

Barbara Zdzińska<sup>1</sup>, Agnieszka Szuster-Ciesielska<sup>1</sup>, Wojciech Rzeski<sup>1,2</sup>, Martyna Kandefer-Szerszeń<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Wirusologii i Immunologii, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

<sup>2</sup>Zakład Biologii Medycznej, Instytut Medycyny Wsi, Lublin

#### Streszczenie

Liście brzozy wykorzystywane są w ziołolecznictwie jako łagodne środki moczopędne w chorobach dróg moczowych. Wodne wyciągi z tych liści znalazły także zastosowanie w łagodzeniu bólu mięśni i stawów, natomiast tradycyjnie stosowane są jako środki zapobiegające wypadaniu włosów oraz łagodzące alergiczne zmiany skórne. Ostatnio więcej uwagi poświęca się ekstraktowi z kory brzozy, złożonemu głównie z trójterpenów, takich jak betulina i kwas betulinowy. Jak wykazały doświadczenia obydwie terpeny posiadają aktywność przeciwwzapalną, przeciwnowotworową, przeciwbakteryjną oraz przeciwwirusową, dlatego mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu wielu infekcyjnych i nieinfekcyjnych chorób człowieka oraz zwierząt domowych.

**Słowa kluczowe:** kora brzozy, betulina, kwas betulinowy, zastosowanie lecznicze

#### Abstract

The leaves of birch trees are used as diuretic for the treatment of bacterial and inflammatory conditions of urinary tract. The tea from leaves is also recommended for treatment bone and joint complaints. Traditionally the leaf tea is used to prevent hair loss and externally as a wash for skin rashes. Recently more attention is paid to several biological activity of birch bark extract, which is mainly composed of two triterpenes, such as betulin and betulinic acid. As it was detected in experiments, both of these triterpenes possess several biological activity: anti-inflammatory, antitumor, antibacterial and antiviral and can be used to treat several infectious and noninfectious illness of human beings and domestic animals.

**Key words:** birch bark, betulin, betulinic acid, therapeutic application

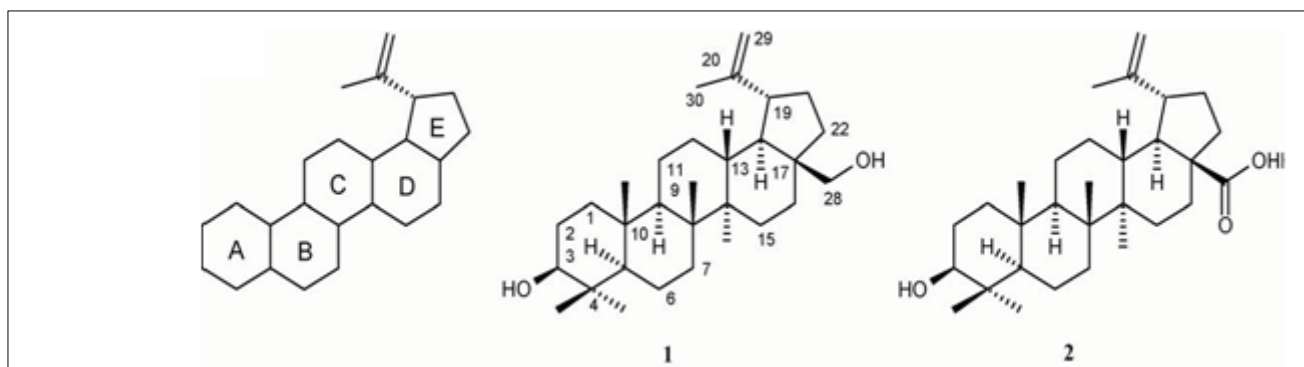
### Terpeny

Terpeny są naturalnie występującymi substancjami, wytwarzanymi przez wiele roślin i niektóre zwierzęta. Ich stężenie zwykle jest duże w strukturach rozrodczych oraz w liściach roślin, w czasie i zaraz po kwitnieniu. Węglowodory te są także jednym z głównych składników żywic oraz olejków eterycznych i często odpowiadają za specyficzny zapach rośliny pełniąc rolę atraktantów lub repelentów. Fizjologiczną funkcją tych wtórnych metabolitów jest najprawdopodobniej udział w odporności roślin przeciwko patogenom, ponieważ wysokie stężenie terpenów może być toksyczne dla tych organizmów [1, 2].

Biosynteza terpenów zachodzi w wyniku połączenia pięciowęglowych jednostek izoprenowych ( $C_5H_8$ ) w formy łańcuchowe lub pierścieniowe, w wyniku czego powstaje związek organiczny o wzorze ogólnym  $(C_5H_8)_n$ . W zależności od wielkości cząsteczki wyróżnia się kolejno: hemiterpeny ( $n=1$ ), monoterpeny ( $n=2$ ), seskwiterpeny ( $n=3$ ), diterpeny ( $n=4$ ), triterpeny ( $n=6$ ), tetraterpeny ( $n=8$ ) oraz politerpeny. Betulina i kwas betulinowy zaliczane są do triterpenów pentacyklicznych, natomiast liniowym triterpenem jest skwalen, główny składnik oleju otrzymanego

z wątroby rekina. Przykładem hemiterpenów jest wchodzący w skład olejków eterycznych kwas izowalerianowy. Inne znane terpeny to, np.: geraniol, mentol i kamfora (monoterpeny), farnesol (seskwiterpen, składnik olejku lipowego), retinol (diterpen, fundamentalny chromofor zaangażowany w transdukcję światła w sygnały wizualne), likopen i karoteny (tetraterpeny) oraz naturalna guma, zaliczana do politerpenów zbudowanych z długich łańcuchów izoprenowych [3]. Terpeny z łatwością ulegają modyfikacjom chemicznym, a ich pochodne, najczęściej tlenowe, zwane są terpenoidami.

Ogromna ilość struktur i funkcji terpenów oraz ich pochodnych od dawna wzbudza duże zainteresowanie wśród naukowców. Niektóre z tych związków znalazły komercyjne zastosowanie w zapobieganiu oraz terapii wielu chorób, dzięki swoim właściwościom przeciwbakteryjnym, przeciwgrzybiczym, przeciwpasożytniczym, przeciwwirusowym, przeciwalergicznym, przeciwdrgawkowym, przeciwwzapalnym, przeciwhiperlikemicznym oraz immunomodulacyjnym. Stosuje się je także jako naturalne substancje ochronne w przechowywaniu produktów rolniczych oraz jako naturalne środki owadobójcze [3]. Badania ostatnich lat wykazały, że niektóre terpeny mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu osteoporozy, ponieważ wykazują aktywność anaboliczną



Ryc. 1. Struktura chemiczna szkieletu lupanowego, betuliny (1) i kwasu betulinowego (2).

zwiększając masę kości i poprawiając ich architekturę. Na przykład, kwas ursolowy nie tylko stymuluje różnicowanie osteoblastów i ich mineralizację *in vitro*, ale również indukuje kościotworzenie *in vivo* [4].

## Betulina

Betulina (lup-20(29)-ene-3 $\beta$ ,28-diol) jest jednym z najpowszechniej występujących w przyrodzie triterpenów. Znalaziono ją w ponad dwustu gatunkach roślin, ale najlepszym źródłem tego terpenu jest zewnętrzna warstwa kory białych gatunków brzoź (*Betula*), np. *B. verrucosa*, *B. pendula*, *B. pubescens* i *B. alba*, gdzie występuje w ilości 20–35%. To właśnie betulina, występująca w formie krystalicznych skupisk w dużych, cienkościennych, powstających na wiosnę komórkach, nadaje białe zabarwienie korze tych drzew. Z kory brzożowej można ją wyizolować za pomocą sublimacji oraz na drodze ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi (chloroformem, acetonem, etanolem). Zawartość betuliny w ekstraktach pochodzących z kory różnych gatunków brzoź wynosi 70–80%, pozostałą część stanowią inne terpeny: lupeol, kwas betulinowy (4–12%), aldehyd betulinowy czy kwas oleanolowy [5]. Betulinę po raz pierwszy wyizolował z kory brzoży i opisał Lowitz w 1788 roku. Dopiero w roku 1952 ustalono dokładną (przypominającą steroidy) strukturę betuliny [6, 7]. Związek ten, zaliczany do triterpenów pentacyklicznych typu lupanu, zbudowany jest z trzydziestowęglowego szkieletu, który tworzą ułożone względem siebie w konfiguracji trans cztery pierścienie sześciocłonowe i jeden pięciocłonowy. Betulina jest węglowodorem aktywnym chemicznie dzięki ugrupowaniom hydroksylowym przy węglu 3 i 28 oraz grupie izopentylowej przy węglu 19. Stanowi ona substrat do syntezy kwasu betulinowego, który różni się od betuliny obecnością grupy karboksylowej przy węglu 17, w miejsce grupy hydroksymetylowej. Wzory strukturalne betuliny, kwasu betulinowego oraz szkieletu lupanowego przedstawione są na Ryc. 1 [7].

Terpeny typu lupanu stały się obiektem znacznego zainteresowania od momentu odkrycia, że kwas betulinowy jest czynnikiem indukującym proces apoptozy komórek czerniaka ludzkiego. W kolejnych badaniach stwierdzono dużą aktywność biologiczną betuliny oraz jej pochodnych. Jednym z mechanizmów działania tego związku jest hamowanie zależnej od c-AMP, katalitycznej podjednostki kinazy białkowej PKA – enzymu, który bierze udział w wielu szlakach sygnałowych oraz regulacyjnych. Właściwości farmakologiczne betuliny widoczne są już przy małych stężeniach. Ważną cechą tej substancji jest brak toksyczności zarówno *in vivo* jak i

*in vitro*, co umożliwia stosowanie jej jako leku. Stwierdzono, że u myszy betulina jest nietoksyczna w dawce 500 mg/kg wagi ciała [8]. Badania farmakokinetyczne wykazały dobrą biodostępność betuliny podawanej dootrzewnowo gryzoniom oraz podskórnie psom. Po 28 dniach podawania tego związku w dawce 300 mg/kg wagi ciała, stężenie betuliny w płazmie krwi tych zwierząt wynosiło 0,33  $\mu$ g/ml [8, 9].

### Właściwości hepatoprotective

Właściwości hepatoprotective naturalnych triterpenoidów zależą w dużej mierze od ich struktury chemicznej. Nawet subtelne różnice w budowie tych związków mogą znacząco wpływać na ich biologiczną aktywność. Betulina już w niskim stężeniu ma zdolność zmniejszania hepatotoksyczności chlorku kadmu ( $\text{CdCl}_2$ ) w stosunku do linii ludzkich hepatocytów HepG2, natomiast jej utleniona pochodna – kwas betulinowy nie wykazuje już takich właściwości [10]. Działanie ochronne betuliny nie polega na wiązaniu przez nią toksycznego związku, ponieważ najlepszy efekt hepatoprotective uzyskano po zastosowaniu betuliny przed podaniem  $\text{CdCl}_2$ . Przypuszcza się, że betulina indukuje syntezę białek działających ochronnie na komórki wątroby [10]. Chlorek kadmu indukuje też apoptozę hepatocytów, a betulina chroni komórki przed śmiercią, głównie na drodze hamowania apoptozy zależnej od reakcji Fas/FasL [11]. Wykazano również, że betulina chroni hepatocyty przed innymi toksycznymi związkami, mianowicie przed alkoholem etylowym i paracetamolem. Terpen ten znacząco obniża, zależną od metabolizmu etanolu i paracetamolu, produkcję reaktywnych form tlenu (ROS), które działają toksycznie na wątrobę [12]. W doświadczeniach z użyciem hodowli komórek gwiazdzistych wątroby, odpowiedzialnych za procesy jej włóknienia stwierdzono, że betulina hamuje proces aktywacji tych komórek, znacząco obniżając markery aktywacji, czyli produkcję białka  $\alpha$ -SMA i prokolagenu I, charakterystycznego dla aktywowanych komórek gwiazdzistych. Oznacza to możliwość zastosowania betuliny jako leku hamującego i prawdopodobnie odwracającego proces włóknienia wątroby spowodowany nadużyciem alkoholu lub hepatotoksycznych leków [dane nie opublikowane].

### Właściwości przeciwnowotworcze

Podawanie betuliny zmniejsza ryzyko wystąpienia kamicy nerkowej przy hiperoksalurii, czyli zaburzeniach metabolicznych polegających na zwiększonym wydalaniu

szczawianów z moczem. Betulina powoduje spadek wysycenia moczu szczawianami poprzez zwiększenie objętości wydalanego moczu. Obserwuje się także zmniejszenie ilości wydalanych szczawianów. Prawdopodobnie przeciwkamicze działanie betuliny polega na hamowaniu enzymów biorących udział w syntezie szczawianów z kwasu glikolowego. Betulina reguluje także stężenie magnezu oraz glikozaminoglikanów, które chronią przed wytrącaniem się kamieni [13].

#### *Właściwości immunomodulacyjne*

W doświadczeniach *in vivo* betulina wykazuje aktywność przeciwwzapalną hamując obrzęk łapy gryzoni indukowany karagininem [14]. Podawana w niskiej dawce (30-90 mg/kg wagi ciała) betulina stymulowała w wątrobie gryzoni aktywność enzymów antyoksydacyjnych, w tym dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GPx) [15]. Betulina oraz kwas betulinowy są inhibitorami wielu enzymów, m.in. posiadają zdolność wiązania się do fosfolipazy A2. Enzym ten jest odpowiedzialny za uwalnianie z błon komórkowych kwasu arachidonowego, głównego substratu do syntezy prostaglandyn oraz leukotrienów, uczestniczących w powstawaniu procesu zapalnego [16].

Wykazano również, że betulina może wzmacniać produkcję niektórych cytokin. Dodatek tego terpenu do hodowli leukocytów stymulowanych mitogenami, powodował wzrost syntezy TNF- $\alpha$ , cytokiny o działaniu prozapalnym i przeciwnowotworowym, natomiast nie wpływał na produkcję innej prozapalnej cytokiny - IFN- $\gamma$  oraz działającej przeciwwzapalnie IL-10. Fakt ten może oznaczać, że leukocyty, które produkują wymienione cytokiny wykazują odmienną wrażliwość na betulinę. Betulina może pobudzać monocyty, będące źródłem TNF- $\alpha$ , ale nie wpływa na limfocyty pomocnicze (Th) produkujące IFN- $\gamma$  i IL-10. Terpen ten może działać także na szlak sygnałowy związany z czynnikiem NF- $\kappa$ B, który wpływa na ekspresję genów kodujących TNF- $\alpha$ , ale nie ma związku z syntezą IFN- $\gamma$  i IL-10 [17]. Betulina hamuje też wytwarzanie rodnika ponadtlenkowego przez neutrofile stymulowane N-formylometionylleucylforyloalaniną (fMLP) hamując nadmierną aktywację leukocytów i zapobiegając stresowi oksydacyjnemu [18].

#### *Właściwości przeciwdrgawkowe i analgetyczne*

W badaniach *in vitro* oraz *in vivo* na modelu mysim wykazano, że betulina może wiązać się z receptorami kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego – GABA, który jest neuroprzekaznikiem o działaniu hamującym w całym układzie nerwowym. Odpowiada on za zmniejszanie pobudliwości i rozluźnienie mięśni. Zablockowanie jego działania powoduje konwulsje, natomiast znaczne i długotrwałe braki tego neuroprzekaznika prowadzą do śmierci. Betulina wiążąc się z receptorami GABA działa agonistycznie, czyli podobnie do tego czynnika. Poprzez podanie betuliny można znieść działanie bikukuliny, związku będącego kompetycyjnym antagonistą GABA, wiążącym się do jego receptorów i wywołującym drgawkę. Betulina działa przeciwnowotworowo blokując receptory przed aktywowaniem ich przez antagonistę GABA [19]. Ciekawy jest fakt, że podobny do betuliny kwas be-

tulinowy nie wykazuje takich właściwości. Na szczególną uwagę zasługuje antynocycetywne (analgetyczne) działanie betuliny. W badaniach na gryzoniach jest ona bardziej aktywna niż aspiryna czy paracetamol [20].

#### *Właściwości przeciwwirusowe*

Przeprowadzone badania wykazały, że betulina działa hamująco na wirus opryszczki pospolitej (*Herpes simplex virus*) typu 1 (HSV-1) oraz typu 2 (HSV-2). Kuracja polegająca na stosowaniu betuliny w połączeniu z acyklowirem - znanym środkiem przeciwwirusowym, wyraźnie wskazuje na synergistyczne działanie tych substancji, ponieważ efekt przeciwwirusowy był znacznie silniejszy, niż podczas podania tych leków oddzielnie. Oprócz tego betulina, kwas betulinowy oraz inne pochodne tego triterpenu wykazują działanie przeciw wirusowi HIV. Aktywność ta związana jest z hamowaniem fuzji wirusa z komórką oraz zakłócaniem funkcjonowania odwrotnej transkryptazy, co wywołuje upośledzenie dojrzewania cząstek wirusa oraz ich uwalniania z zakażonej komórki [21, 22, 23]. Betulina hamuje również replikację wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy gębowej bydła (VSV) oraz wirusa zapalenia mózgu i mięśnia sercowego (EMCV) [24].

#### *Przeciwnowotworowa aktywność betuliny*

Betulina posiada niższą aktywność przeciwnowotworową niż kwas betulinowy [25]. Na przykład słabiej hamuje proliferację komórek czerniaka w porównaniu z pochodnymi kwasu betulinowego [26]. Także linie komórek białaczkowych (HL60, U937, K562) i nerwiaka zarodkowego są bardziej odporne na betulinę niż na inne badane triterpeny typu lupanu [27]. Jednakże ostatnio wykazano, że betulina indukuje apoptozę komórek raka jelita grubego, raka piersi oraz raka płuc [28, 29], głównie na drodze zwiększenia przepuszczalności błon mitochondrialnych. Obecność cholesterolu silnie zwiększa przeciwnowotworowe działanie betuliny w stosunku do komórek białaczkowych (Jurkat), raka szyjki macicy (HeLa) oraz raka płuc (A549), co wskazuje na jej wpływ na funkcję błon komórkowych [30]. Betulina indukuje apoptozę komórek raka płuc A549 powodując zmiany w ekspresji wielu genów. Na szczególną uwagę zasługuje hamowanie przez betulinę ekspresji białka szoku termicznego Hsp90, odpowiedzialnego, między innymi za lekooporność wielu komórek nowotworowych [29].

#### *Inne biologiczne właściwości betuliny*

W doświadczeniach *in vitro* z użyciem komórek nabłonkowych dróg oddechowych stwierdzono, że betulina zwiększa wydzielanie śluzu, co sugeruje możliwość jej zastosowania w regulacji funkcji błon śluzowych w przewlekłych chorobach dróg oddechowych [31]. Betulina i kwas betulinowy stymulują aktywność śródłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS) i wytwarzanie NO. Są też inhibitorami oksydazy NADPH, hamując w komórkach śródłonka naczyniowego stres oksydacyjny i poprawiając ich funkcje. Świadczy to o potencjalnej możliwości zastosowania tych terpenów w chorobach sercowo-naczyniowych [32]. Jedną

z ostatnio odkrytych, najciekawszych właściwości betuliny jest jej zdolność wiązania się do receptorów melanokortynowych. Receptory te wiążąc melanokortyny odpowiadają za pigmentację skóry, natomiast wiążąc ACTH wpływają na wagę ciała. Betulina, z jej charakterystyczną strukturą może być prekursorem niskocząsteczkowych inhibitorów receptorów melanokortynowych. Z drugiej strony aktywność ta sugeruje konieczność podjęcia badań nad wpływem betuliny na regulacje hormonalne w organizmie [33].

## Kwas betulinowy

Kwas betulinowy (BA), czyli kwas 3 $\beta$ , hydroksyl-lup-20(29)-en-28-owy, podobnie jak betulina występuje w zewnętrznej korze wielu gatunków drzew, np. w białej korze brzoźowatych, jednak jego zawartość w roślinach jest stosunkowo niewielka [34]. Wyjątek stanowi bagienna roślina - bobrek trójlistkowy (*Menyanthes trifoliata*), której podziemne części zawierają znaczne ilości wolnego BA oraz saponin, posiadających ten terpen w części aglikonowej. BA wykazuje największą aktywność biologiczną spośród triterpenów pentacyklicznych i posiada wiele cennych z punktu widzenia medycznego właściwości, np.: działa przeciwzapalnie, przeciwnowotworowo, przeciwmalarycznie, przeciwwirusowo oraz hepatochronnie [35].

### *Właściwości przeciwnowotworowe*

Przeciwnowotworowa aktywność BA wynika z jego zdolności do hamowania angiogenezy w obrębie nowotworu, inhibicji eukariotycznej topoizomerazy I (działanie antyproliferacyjne) oraz pobudzania drogą wewnątrzpochodną apoptozy w komórkach nowotworowych.

Inhibicja angiogenezy następuje w wyniku hamowania aktywności kluczowego dla tego procesu enzymu - aminopeptydazy N, którego zwiększona ekspresja widoczna jest w niektórych typach nowotworów [34]. Innym mechanizmem prowadzącym do hamowania angiogenezy jest aktywacja selektywnej, zależnej od proteasomu degradacji czynników transkrypcyjnych: Sp1, Sp3 i Sp4, które regulują ekspresję czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) [36]. BA jest też inhibitorem eukariotycznej topoizomerazy I, równie skutecznym jak powszechnie stosowany inhibitor tego enzymu - CPT (camptothecin). Topoizomeraza I ma zdolność hydrolizy pojedynczego wiązania fosfodwuestrowego w nici DNA, co prowadzi do rozplecenia podwójnej helisy i umożliwia enzymom replikacyjnym dostęp do matrycy. Działanie kwasu betulinowego polega na bezpośredniej interakcji z topoizomerazą I, co powoduje jej inaktywację i zapobiega tworzeniu kompleksu z nicią DNA. W konsekwencji BA uniemożliwia replikację i hamuje proliferację komórek nowotworowych [37]. Najważniejszym przeciwnowotworowym mechanizmem działania BA jest jego zdolność do inicjowania mitochondrialnej (wewnątrzpochodnej) drogi apoptozy [38, 39, 40]. Zaprogramowana śmierć komórek odgrywa decydującą rolę w utrzymywaniu tkankowej homeostazy, a cechą charakterystyczną ludzkich nowotworów jest właśnie zdolność unikania apoptozy. Terapia przeciwnowotworowa opiera się głównie na indukowaniu mitochondrialnej drogi apoptozy. Taką indukcję

wywołuje radioterapia oraz wiele chemioterapeutyków, co jest wynikiem stresu komórkowego bądź uszkodzenia DNA [41].

BA indukuje powstawanie ROS w liniach nowotworowych różnego pochodzenia, co wpływa na zwiększenie przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej. Inkubacja z antyoksydantami poprzedzająca podanie BA, ratuje komórki przed apoptotyczną śmiercią, co dowodzi, że indukcja ROS przez BA jest niezbędna do zainicjowania śmierci komórek w drodze wewnątrzpochodnej [40]. Białka należące do rodziny Bcl-2, wśród których są zarówno białka antyapoptotyczne, np.: Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, jak i proapoptotyczne, np.: Bax, Bak, Bad, mogą oddziaływać na mitochondria regulując przepuszczalność ich błony. BA wykazuje zdolność modulowania poziomu ekspresji tych białek, dzięki czemu może zwiększać stopień przepuszczalności błony mitochondrialnej i pobudzać apoptotyczną śmierć komórek nowotworowych [42].

W walce z nowotworami ogromne znaczenie może mieć zdolność BA do indukcji apoptozy w sposób niezależny od białka p53 – silnego supresora nowotworzenia. Jeżeli w czasie cyklu komórkowego dojdzie do bardzo dużego uszkodzenia DNA lub nieprawidłowego powielenia materiału genetycznego, stojące na straży białko p53 aktywuje transkrypcję odpowiednich genów i kieruje komórkę w stronę apoptozy. Mutacja w genie dla białka p53 jest jedną z głównych przyczyn powstawania nowotworów, dlatego godny uwagi jest fakt, że BA w podobny sposób indukuje apoptozę w liniach komórkowych z prawidłową ekspresją białka p53, jak i liniach komórkowych z mutacją genu dla tego białka [41].

Kwas betulinowy, dzięki swojej zdolności współdziałania z różnymi cytotoksycznymi czynnikami, takimi jak: promieniowanie jonizujące, chemioterapeutyki czy TRAIL, może być stosowany w różnych kombinacjach terapeutycznych, jako środek wzmagający skuteczność terapii przeciwnowotworowej [38]. Interesujący jest fakt, że komórki nerwiaka zarodkowego (neuroblastoma) odporne na działanie doksorubicyny, są wrażliwe na działanie BA. Podobnie, BA jest cytotoksyczny w stosunku do komórek ostrej białaczki wieku dziecięcego, które cechuje oporność na standardowe chemioterapeutyki. Dzięki takim właściwościom, BA może być postrzegany jako potencjalny lek przewyższający pewne formy oporności na chemioterapeutyki stosowane w terapii przeciwnowotworowej. Dotychczas wykazano przeciwnowotworowe działanie BA w stosunku do następujących ludzkich nowotworów: czerniaka (melanoma), nerwiaka zarodkowego (neuroblastoma), glejaka wielopostaciowego (glioblastoma), rdzeniaka (medulloblastoma), mięsaka Ewinga, białaczki (leukemia) oraz kilku typów raka (carcinoma), np.: raka głowy i szyi, okrężnicy, płuc, nerkowokomórkowego, wątrobowokomórkowego, prostaty, piersi, jajnika i szyjki macicy [42]. Z medycznego punktu widzenia, ogromne znaczenie ma selektywna cytotoksyczność niskich stężeń BA w stosunku do komórek nowotworowych, przy braku toksyczności tych samych dawek w stosunku do komórek prawidłowych. Obecnie BA znajduje się w I/II fazie badań klinicznych i jest stosowany powierzchniowo na dysplastyczne znamiona, które potencjalnie mogą przeobrazić się w czerniaka [34].

### Właściwości przeciwwirusowe

W toku poszukiwań środków leczniczych pochodzenia naturalnego, zdolnych do zwalczania infekcji spowodowanej wirusem HIV wykazano, że takie właściwości posiada ekstrakt z liści rośliny znanej z łacińskiej nazwy - *Syzigium claviflorum*, którego głównymi, aktywnymi składnikami są: kwas betulinowy i jego pochodna - kwas platanowy. Efektem poszukiwań bardziej aktywnych biologicznie, półsyntetycznych pochodnych BA, było odkrycie kwasu dihydrobetulinowego, który wykazuje silniejsze właściwości przeciwwirusowe niż BA oraz kwasu 3-O-(3',3'-dimetylobursztynylo)-betulinowego, znanego również jako DSB lub Bevirimat, wykazującego bardzo silne właściwości hamowania replikacji wirusa HIV typu 1 w zainfekowanych limfocytach H9 [43, 44, 45]. Mechanizm przeciwwirusowego działania pochodnych BA zależy od lokalizacji dołączonych łańcuchów bocznych. Obecność łańcucha bocznego w pozycji C3 w cząsteczce BA hamuje etap dojrzewania wirusa HIV-1, natomiast występowanie łańcucha bocznego w pozycji C28, powstrzymuje wnikanie wirusa HIV-1 do komórki. DSB jest bardzo obiecującym inhibitorem etapu dojrzewania, natomiast nie hamuje wnikania wirusa HIV-1 do komórki. Inne pochodne BA, związki znane jako: IC9564 i A43-D posiadają łańcuch boczny podstawiony w pozycji C28 i są inhibitorami wnikania wirusa HIV-1 do komórki. Godny uwagi jest fakt, że wirusy należące do podtypu C, które stanowią w przybliżeniu 50% wszystkich wyizolowanych na całym świecie wirusów HIV typu 1, są stosunkowo bardziej wrażliwe na pochodne BA będące inhibitorami wnikania niż podtypy A i B. W II fazie badań klinicznych jest obecnie Bevirimat, stosowany jako doustny lek u pacjentów zakażonych wirusem HIV. Wstępne badania wykazały, że pojedyncze, doustne dawki tego kwasu są dobrze tolerowane przez pacjentów, a jego koncentracja w cytoplazmie wyniosła od 8 do 58 µg/ml [43].

### Właściwości przeciwzapalne i przeciwalergiczne

Kwas betulinowy jest czynnym związkiem wielu roślin wykazujących aktywność przeciwzapalną. Ekstrakt z kłączy wodnej rośliny - lotosu orzechodajnego (*Nelumbo nucifera*), zawierający m.in. BA, wykazuje dużą aktywność przeciwzapalną w obręku indukowanym serotoniną i karagininem. Z kolei wyciąg z głowienki pospolitej (*Prunella vulgaris*), zawierający BA oraz kwas ursolowy i jego pochodne, posiada właściwości przeciwalergiczne. Frakcja triterpenowa tego ekstraktu hamuje degranulację mastocytów oraz uwalnianie β-heksozaminidazy i histaminy. Kluczową rolę w modulowaniu odpowiedzi czynnej na stan zapalny odgrywa zwiększona produkcja tlenu azotu. Zaobserwowano, że BA ma zdolność hamowania syntezy NO w pobudzanych przy użyciu LPS mysich makrofagach [7]. Kwas betulinowy jest również modulatorem produkcji cytokin przez subpopulacje limfocytów pomocniczych Th1 i Th2. Subpopulacja limfocytów Th1 odpowiedzialna jest za produkcję cytokin prozapalnych: IL-2 i IFN-γ, natomiast subpopulacja Th2 wytwarza IL-4 oraz IL-10 o właściwościach przeciwzapalnych, która prawdopodobnie hamuje produkcję prozapalnych cytokin przez subpopulację limfocytów Th1. BA zwiększa nie-

znacznie produkcję IL-10 i jednocześnie hamuje produkcję IFN-γ, przez co wywiera efekt przeciwzapalny [17].

### Właściwości hepatochronne

Działanie hepatochronne BA polega prawdopodobnie na hamowaniu powstawania anionorodników ponadtlenukowych w komórkach HepG2 poddanych działaniu etanolu jako hepatotoksyny. Najlepszy efekt hepatochronny uzyskuje się podając BA na 24 h przed intoksykacją etanolem, co powoduje znaczne zmniejszenie powstawania anionorodników ponadtlenukowych w komórkach HepG2. Hepatochronny efekt naturalnych triterpenów zależy również od rodzaju hepatotoksyny indukującej produkcję ROS. BA nie wykazuje właściwości hepatochronnych w przypadku zastosowania estru forbolu (PMA) jako induktora ROS, natomiast inny naturalny triterpen - kwas oleanowy, w tych samych warunkach znacznie obniża produkcję zarówno anionorodników ponadtlenukowych, jak i nadtlenu wodoru [12].

### Właściwości przeciwbakteryjne

Gruźlica, wywołwana przez bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, jest jedną z najcięższych chorób zakaźnych, powszechnie występującą na całym świecie. Wielolekowa oporność, coraz częściej spotykana wśród klinicznych izolatów mykobakteryjnych, skłania naukowców do poszukiwania nowych leków, skutecznych w jej zwalczaniu. Najbardziej obiecujące są nowe leki, o strukturze chemicznej odmiennej od tych stosowanych dotychczas. Duże nadzieje wiąże się z naturalnie występującymi triterpenami i ich pochodnymi. BA wykazuje wprawdzie stosunkowo niewielkie właściwości przeciwmikobakteryjne, z MIC (minimalnym stężeniem hamującym wzrost drobnoustrojów) równym 50 µg/ml, ale jego pochodna - ester p-kumarowy BA, wykazuje dużo większą aktywność (MIC = 6,25 µg/ml) [46]. Godny uwagi jest fakt, że ta pochodna BA wykazuje również silne działanie przeciwmalaryczne w stosunku do *Plasmodium falciparum*, podczas gdy sam BA wykazuje niewielką aktywność przeciwzarodkową [47].

### Piśmiennictwo

1. Theis N, Lerchau M. The evolution of function in plant secondary metabolites. *Int J Plant Sci* 2003; 164: 93-102.
2. Cornwell PL. Monoterpenes in breast cancer chemoprevention. *Breast Canc Res Treat* 1997; 46: 191-197.
3. Paduch R i wsp. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch Immunol Ther Exp* 2007; 55: 325-327.
4. Lee SU i wsp. Anabolic activity of ursolic acid in bone: stimulating osteoblast differentiation in vitro and inducing new bone formation in vivo. *Pharmacol Res* 2008; 58: 290-296.
5. Krasutsky PA. Birch bark research and development. *Nat Prod Rep* 2006; 23: 919-942.
6. Eckerman C, Ekman R. Comparison of solvents for extraction and crystallization of betulinol from birch bark waste. *Paperi ja Puu - Papper och Trä* 1985; 67: 100-106.

7. Achrem-Achremowicz J, Janeczko Z. Betulina - prekursor nowych środków leczniczych. *Farmacja Polska* 2002; 58: 799-804.
8. Alakurtti S, Mäkelä T, Koskimies S, Yli-Kauhaluoma J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur J Pharm Sci* 2006; 29: 1-13.
9. Jäger S, Laszczyk MN, Scheffler A. A preliminary pharmacokinetic study of betulin, the main pentacyclic triterpene from extract of outer bark of birch (*Betulae alba cortex*). *Molecules* 2008; 13: 3224-3235.
10. Miura N i wsp. Protective effects of triterpene compounds against the cytotoxicity of cadmium in HepG2 cells. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 1324-1328.
11. Oh SH, Choi JE, Lim SC. Protection of betulin against cadmium-induced apoptosis in hepatoma cells. *Toxicology* 2006; 220: 1-12.
12. Szuster-Ciesielska A, Kandefer-Szerszeń M. Protective effects of betulin and betulinic acid against ethanol-induced cytotoxicity in HepG2 cells. *Pharmacol Rep* 2005; 57: 588-595.
13. Bochniewska V i wsp. Kamica układu moczowego u dzieci – inhibitory i promotory krystalizacji. *Pediatr Med Rodz* 2006; 2: 91-99.
14. Lin LW i wsp. Comparison with various parts of *Broussonetia papyrifera* as to the antinociceptive and anti-inflammatory activities in rodents. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; 72: 2377-2384.
15. Lin YC i wsp. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Torenia concolor* Lindley Var. *formosana* Yamazaki and betulin in mice. *Am J Chin Med* 2009; 37: 97-111.
16. Bernard P i wsp. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A2 inhibitors. *Phytochemistry* 2001; 58: 865-874.
17. Zdzisińska B i wsp. Differential effect of betulin and betulinic acid on cytokine production in human whole blood cell cultures. *Pol J Pharmacol* 2003; 55: 235-238.
18. Yamashita K i wsp. Effect of three triterpenoids, lupeol, betulin, and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils. *Clin Chim Acta* 2002; 25: 91-96.
19. Muceniece R i wsp. Betulin binds to  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors and exerts anticonvulsant action in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 90: 712-716.
20. De Souza MT i wsp. Phytochemical and antinociceptive properties of *Matayba elaeagnoides* Radlk. barks. *Z Naturforsch. C* 2007; 62: 550-554.
21. Pavlova NI i wsp. Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses. *Fititerapia* 2003; 74: 489-492.
22. Gong Y i wsp. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antiviral Res* 2004; 64: 127-130.
23. Tolstikova TG i wsp. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: II. semisynthetic lupane derivatives. *Bioorg Khim* 2006; 3: 261-276.
24. Kamińska T i wsp. A comparison of the antiviral activity of three triterpenoids isolated from *Betula alba* bark. *Ann Univ Mariae Curie-Skłodowska, Sectio C* 2004; 59: 7-13.
25. Kvasnica M i wsp. Synthesis of phthalates of betulinic acid and betulin with cytotoxic activity. *Bioorg Med Chem* 2005; 13: 3447-3454.
26. Kim DSH, Pezzuto JM, Pisha E. (1998): Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8: 1707-1712.
27. Hata K, Hori K, Ogasawara H, Takahashi S. Anti-leukemia activities of lup-28-al-20(29)-en-3-one, a lupane triterpene. *Toxicol Lett* 2003; 143: 1-7.
28. Gauthier C i wsp. Synthesis and cytotoxicity of bidesmosidic betulin and betulinic acid saponins. *J Nat Prod* 2009; 72: 72-81.
29. Pyo JS i wsp. Anti-cancer effect of betulin on a human lung cancer cell line: a pharmacoproteomic approach using 2 D SDS PAGE coupled with nano-HPLC tandem Mass Spectrometry. *Planta Med* 2009; 75: 127-31.
30. Mullauer FB, Kessler JH, Medema JP. Betulin is a potent anti-tumor agent that is enhanced by cholesterol. *PLoS One* 2009; 4: 1-8.
31. Lee CJ, Seok JH, Hur GM, Lee JH, Park JS, Seol IC, Kim YH. Effects of ursolic acid, betulin and sulfur containing compounds on mucin release from airway goblet cells. *Planta Med* 2004; 70: 1119-1122.
32. Steinkamp-Fenske K i wsp. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase and NADPH oxidase by betulinic acid in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 322: 836-842.
33. Muceniece R i wsp. Betulin binds to melanocortin receptors and antagonizes alpha-melanocyte stimulating hormone induced cAMP generation in mouse melanoma cells. *Cell Biochem. Funct* 2007; 25: 591-596.
34. Fulda S. Betulinic acid for cancer treatment and prevention. *Int J Mol Sci* 2008; 9: 1096-1107.
35. Patocka J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J Appl Biomed* 2003; 1: 7-12.
36. Chintharlapalli S, Papineni S, Ramaiah SK, Safe S. Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors. *Cancer Res* 2007; 67: 2816-2823.
37. Chowdhury A i wsp. Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives. *Med Sci Monit* 2002; 8: 254-260.
38. Fulda S, Debatin KM. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic acid. *Neoplasia* 2005; 7: 162-170.
39. Liby K i wsp. Novel semisynthetic analogues of betulinic acid with diverse cytoprotective, antiproliferative and proapoptotic activities. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 2113-2119.
40. Tan Y, Yu R, Pezzuto JM. Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2866-2875.
41. Selzer E i wsp. Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 935-940.

42. Rzeski W i wsp. Betulinic acid decreases expression of bcl-2 and cyklin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2006; 374: 11-20.
43. Huang L, Ho P, Chen CH. Activation and inhibition of proteasome by betulinic acid and its derivatives. *FEBS Lett* 2007; 581: 4955-4959.
44. Lai W i wsp. Betulinic acid derivatives that target gp120 and inhibit multiple genetic subtypes of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 128-136.
45. Sakalian M i wsp. 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl) betulinic acid inhibits maturation of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor assembled in vitro. *J Virol* 2006; 80: 5716-5722.
46. Tanachatchairatana T, Bremner JB, Chokchaisiri R, Suksamrarn A. Antimycobacterial activity of cinnamate-based esters of the triterpens betulinic, oleanolic and ursolic acids. *Chem Pharm Bull* 2008; 56: 194-198.
47. Suksamrarn A, Tanachatchairatana T, Kanokmedhakul S. Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. *J Ethnopharmacol* 2003; 88: 275-277.

data otrzymania pracy: 25.02.2010 r.

data akceptacji do druku: 05.03.2010 r.

**Adres do korespondencji:**

Barbara Zdzisińska  
Zakład Wirusologii i Immunologii  
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii UMCS  
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin  
tel: +48 81 537 59 42, fax: 81 537 59 40  
e-mail: basiaz@poczta.umcs.lublin.pl