

Ekstrakt z brzozy brodawkowatej *Cortex Betulae*, jako źródło substancji aktywnych biologicznie

Birch extract *Cortex Betulae* as a source of biologically active substances

Magdalena Malinowska, Elżbieta Sikora, Jan Ogonowski

Instytut Chemii i Technologii Organicznej, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki, ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków, e-mail: mmalinowska@indy.chemia.pk.edu.pl

Słowa kluczowe: ekstrakt z kory brzozy, związki triterpenowe, lupeol, betulina, kwas betulinowy, kwas oleanolowy, aktywność biologicznie czynna

Key words: birch bark extract, triterpenic compounds, lupeol, betulin, betulinic acid, oleanolic acid, bioactive property

Streszczenie

Ekstrakt z kory brzozy stanowi od wieków remedium na różnorakie dolegliwości skórne. Wiąże się to z zawartością w nim cztero- lub pięciocyklicznych związków triterpenowych, między innymi betuliny, lupeolu oraz kwasów betulinowego i oleanolowego. Związki te wykazują działanie biologicznie czynne, dzięki czemu mogą znaleźć zastosowanie nie tylko w kosmetyce, ale również w profilaktyce i leczeniu wielu chorób skóry, w tym również nowotworów. Jak pokazują badania naukowe, triterpeny wywołują proces apoptozy komórek nowotworowych, nie wykazując przy tym działania toksycznego w stosunku do zdrowych tkanek. Z kolei mechanizm działania przeciwutleniającego triterpenów oparty jest na aktywacji systemu enzymatycznego organizmu odpowiedzialnego za neutralizację wolnych rodników. Aktywność przeciwbakteryjna oraz przeciwgrzybicza ekstraktu z kory brzozy umożliwia zastosowanie go w preparatach chroniących skórę przed działaniem drobnoustrojów. Substancje aktywne wyciągu z kory brzozy regulują funkcje układu odpornościowego, wzmacniają odpowiedź immunologiczną i stymulują czynności samonaprawcze organizmu. Ekstrakt brzozowy ogranicza również stany zapalne skóry. Skład suchego ekstraktu z kory brzozy zależy od warunków procesu ekstrakcji, a szczególnie jej czasu i rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika. Do ekstrakcji stosuje się najczęściej alkohole lub inne organiczne rozpuszczalniki, ze względu na silnie lipofilowy charakter triterpenów. Zawartość związków triterpenowych w suchym ekstrakcie z brzozy sięga 70% masowych, co czyni ten surowiec roślinny niezwykle bogatym źródłem związków z tej grupy.

Summary

For centuries birch extract has been a remedy for various skin problems. It is related to the fact that birch extract contains four or five cycle triterpenic compounds including betulin, lupeol as well as betulinic and oleanolic acids. These compounds have bioactive properties, thanks to which they may be applied not only in cosmetology but also in prevention and treatment of many skin diseases, including cancers. As medical research shows, triterpenes trigger the apoptosis process of cancerous cells and at the same time they toxically affect healthy cells. The mechanism of triterpene antioxidant properties is based on activating the enzyme system of an organism responsible for neutralisation of free radicals. Thanks to its antibacterial and antifungal properties, birch bark extract can be used in products protecting skin against microorganisms. Its bioactive substances regulate functions of the immune system, improve the immune response and stimulate self-healing properties of the body. Birch extract also reduces the risk of skin inflammations. Chemical composition of dry birch bark extract is dependent on the conditions of extraction, particularly its time and type of solvent. In the extraction process alcohols or other organic solvents are mostly used due to the strong lipophilic nature of triterpenes. The content of triterpenic compounds in dry birch bark extract accounts for 70%, which makes this plant raw material an extremely rich source of substances belonging to this group.

Wstęp

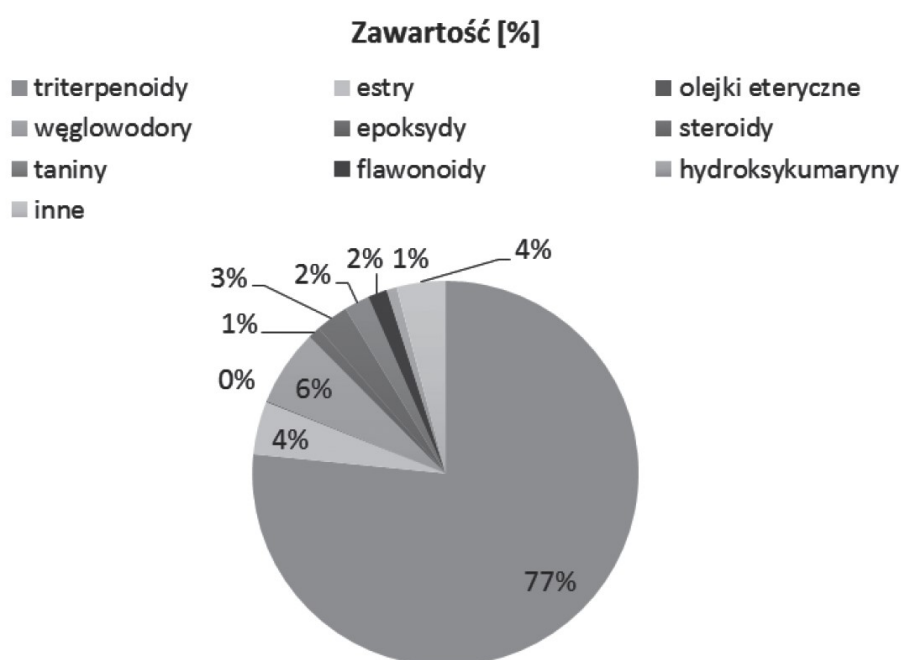
Ze względu na wysoką zawartość związków triterpenowych, ekstrakty z brzozy należą do popularnych składników preparatów stosowanych w leczeniu chorób skóry, zakażeń oraz stanów zapalnych. W pracy przedstawiono przegląd literaturowy dotyczący aktywności biologicznej ekstraktu brzożowego. Scharakteryzowano 4 główne składniki ekstraktu brzożowego (betulina, lupeol, kwas betulinowy, kwas oleanolowy). Związki te, ze względu na szerokie spektrum działania biologicznie czynnego, mogą znaleźć zastosowanie zarówno w produktach kosmetycznych, jak również w przemyśle farmaceutycznym. Celem niniejszej pracy jest krótka charakterystyka wybranych związków zawartych w ekstrakcie z kory brzozy brodawkowatej pod kątem ich aktywności biologicznej.

Związki triterpenowe zawarte w korze brzozy

Kora brzozy białej (*Betula Pendula Roth.*) charakteryzuje się wysoką zawartością związków triterpenowych, głównie pentacyklicznych, które wykazują

Ekstrakt z brzozy brodawkowatej *Cortex Betulae*, jako źródło...

charakter lipofilowy. Najbardziej rozpowszechnioną metodą wyodrębniania triterpenów z oczyszczonej i rozdrobnionej wcześniej kory brzozy jest klasyczna ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi, w tym alkoholami. Proces ekstrakcji może być wspomagany za pomocą ultradźwięków, impulsów elektrycznych, wibracji lub wytrząsania [1]. Ekstrakcji poddaje się zarówno zewnętrzną, jak i wewnętrzną warstwę kory brzozy. Najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami są alkohole metylowy i etylowy, a także chloroform i aceton, rzadziej roztwory wodno-acetonowe [2]. Zawartość poszczególnych grup związków w suchym ekstrakcie brzozowym przedstawiono na Rysunku 1.



Rysunek 1. Skład suchego ekstraktu z kory brzozy [3]
Figure 1. The composition of dry birch bark extract [3]

Końcowy skład suchego ekstraktu z kory brzozy zależy od warunków procesu ekstrakcji, a szczególnie jej czasu i rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika. Zawartość poszczególnych składników waha się od kilku do kilkuset mg związku na 1 g suchego ekstraktu [3].

Stężenie związków triterpenowych w suchym ekstrakcie przekracza 70%. Mogą to być cztero- lub pięciopierścieniowe cząsteczki mające w swojej budowie grupę hydroksylową, karboksylową lub grupy metylowe. Betulina to pięciopierścieniowy związek triterpenowy, który stanowi w suchym ekstrakcie

brzozowym główny składnik. Jej zawartość waha się bowiem, w zależności od warunków ekstrakcji, od 14,8 do 500,0 mg/g suchego ekstraktu. Inne związki triterpenowe obecne w tym ekstrakcie to lupeol, kwas betulinowy, kwas oleanolowy, lupenon, betulon, kwas taninowy oraz izobetulinol (zawartości odpowiednio: 7,0–105,0 mg/g; 1,4–35,0 mg/g; 5,0–30,2 mg/g; 4,5–50,0 mg/g; 25,1–41,0 mg/g; 20,0–30,0 mg/g oraz 0,1–0,3mg/g) [1, 4]. Od obecności wyżej wymienionych związków, a w szczególności betuliny, pochodzi białe zabarwienie kory brzozy.

Działanie składników ekstraktu brzozowego w kosmetyce

Brzoza należy do roślin o długiej tradycji zastosowań w medycynie ludowej różnych krajów i kultur. Ekstrakt z brzozy jest od lat stosowany jako środek leczący choroby skóry (wysypki, infekcje, stany zapalne). W wierzeniach plemion germańskich, słowiańskich i nadbałtyckich brzoza uważana była za drzewo święte, obdarzała pozytywną energią, była też symbolem wiosny i odradzającego się życia. W preparatach kosmetycznych składniki ekstraktu brzozowego znajdują zastosowanie jako substancje wspomagające naturalną odporność skóry, zmniejszające jej podrażnienia i odczyny zapalne, a także hamujące rozwój różnego rodzaju bakterii i grzybów chorobotwórczych [5–7]. Prowadzone w ostatnich latach badania *in vitro* potwierdzają także działanie bardziej ukierunkowane na syntezę podstawowych białek strukturalnych skóry oraz na szybką regenerację komórek uszkodzonych termicznie [8–10].

Aktywność antyoksydacyjna

Wolne rodniki powodują nieodwracalne niszczenie komórek. Przede wszystkim, pod ich wpływem naruszone zostają struktury białek, lipidów i kwasów nukleinowych, co jest przyczyną szybkiego starzenia się komórek oraz wielu chorób (w tym również chorób nowotworowych) [11]. Organizm ludzki może neutralizować wolne rodniki poprzez regulowanie ich poziomu z udziałem enzymów lub bez udziału enzymów. Enzymatyczny mechanizm unieszkodliwiania wolnych rodników realizowany jest z udziałem takich enzymów, jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) lub katalaza (CAT), które katalizują reakcje redoks. Nieenzymatyczny mechanizm wiąże się z występowaniem w organizmie naturalnych antyoksydantów. Jednym z nich jest glutation (GSH), występujący w formie monomerycznego tripeptydu. Po utlenieniu przybiera on formę dimeru GSSG. Enzymy, takie jak reduktaza glutationowa lub

oksyreduktaza glutationowa, są niezbędne do zachodzenia procesu utleniania i redukcji glutationu oraz jego aktywności przeciwutleniającej.

Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów brzozowych związana jest z obecnością w nich substancji o właściwościach przeciwrodnikowych [12]. Triterpeny, takie jak lupeol i betulina, są znane z ich szczególnej aktywności antyoksydacyjnej. Nie działają one jak klasyczne przeciwutleniacze, lecz aktywują system enzymatyczny organizmu [13, 14]. Działanie przeciwutleniające ekstraktu brzozowego udowodniono, stosując metody DPPH oraz Folina i Ciocalteu. Mechanizm ten zmienia się w zależności od warunków, szczególnie temperatury [4, 15]. Optymalne stężenie betuliny odpowiadające największej aktywności antyoksydacyjnej wynosi 2 mg/cm^3 [16]. Przy takim stężeniu betuliny skuteczność redukcji rodników DPPH wynosi 8,35%, natomiast rodników hydroksylowych 38,5%. Aktywność antyoksydacyjną wykazuje również kwas oleanolowy. Działanie przeciwutleniające kwasu oleanolowego polega na neutralizacji wolnych rodników poprzez chemiczną reakcję z reaktywnymi formami tlenu. Dodatkowo, kwas oleanolowy za pośrednictwem białka Nrf-2 koniecznego do aktywnego działania mechanizmów antyoksydacyjnych organizmu, zwiększa ekspresję enzymów antyoksydacyjnych, takich jak katalaza i tioredoksyna, a także stymuluje biosyntezę antyoksydacyjnego glutationu [17].

Działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze

Betulinę, kwas betulinowy i lupeol, jak wiele związków triterpenowych, cechuje aktywność przeciwdrobnoustrojowa. Betulina wykazuje działanie przeciwgrzybicze w stosunku do *Fusarium oxysporum* (grzyby pasożytnicze atakujące tkanki roślinne, zwierzęce oraz ludzkie, wytwarzające wtórne metabolity – mytotoksyny, substancje o działaniu toksycznym) [18]. Kwas betulinowy i lupeol hamują rozwój *Enterobacter aerogenes* (bakteria najczęściej powodująca infekcje, szybko uodparniająca się na działanie antybiotyków), *Escherichia coli* (bakteria powodująca schorzenia układu pokarmowego i moczowego), *Sporothrix schenckii* (grzyb wywołujący sporotrychozę), *Microsporium canis* (grzyb wywołujący grzybicę skóry owłosionej), *Aspergillus fumigatus* (kropidlak popielaty wywołujący grzybicę skóry), *Aspergillus flavus* (pasożytujący grzyb wywołujący grzybicę skóry), *Candida albicans* (grzyb, drożdżak wywołujący zakażenia oportunistyczne u chorych z obniżoną odpornością), *Cryptococcus neoformans* (grzyb wywołujący kryptokokozę,

rodzaj grzybicy) oraz *Candida guilliermondi* i *Candida spicata* (pasożytujące drożdżaki, wywołujące grzybicę pochwy i jamy ustnej) [19–21]. Kwasy oleanolowy i betulinowy wykazują aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do *Escherichia coli* (pałeczka okrężnicy), *Staphylococcus aureus* (gronkowiec złocisty), *Enterococcus faecalis* (paciorkowiec kałowy), *Enterococcus faecium* (bakteria wywołująca zakażenie układu moczowego, zapalenie wsierdza), *Pseudomonas aeruginosa* (pałeczka ropy błękitnej, będącą główną przyczyną zakażeń wewnątrzszpitalnych) oraz *Mycobacterium tuberculosis* (prątek gruźlicy). Spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego ekstraktu brzozonego jest szerokie, dlatego stanowi on chętnie stosowany surowiec w różnego rodzaju preparatach kosmetycznych chroniących skórę przed działaniem drobnoustrojów [19, 22].

Działanie immunostymulujące i przeciwzapalne

Działanie przeciwzapalne ekstraktu z kory brzozy wiąże się z obecnością w ekstrakcie betuliny i kwasu betulinowego i polega głównie na inhibitowaniu wydzielania prostaglandyn, hormonów będących mediatorami odczynu zapalnego. Substancje aktywne wyciągu z kory brzozy są również immunomodulatorami, regulują funkcje układu odpornościowego, wzmacniają odpowiedź immunologiczną i stymulują czynności samonaprawcze organizmu. Przy stosowaniu preparatu zawierającego ekstrakt z kory brzozy w atopowym zapaleniu skóry oraz łuszczycy można zaobserwować zmniejszenie zmian skórnych, obrzęków oraz objawów świądu [23, 24]. Ekstrakt brzozonego ogranicza stany zapalne skóry. Przeprowadzone badania wykazały również jego pozytywne działanie w stanach zapalnych ucha [25]. Doniesienia patentowe dotyczą z kolei przeciwzapalnego i regenerującego działania lupeolu w leczeniu chorób tkanki łącznej, chorób dziąseł, leczeniu i zapobieganiu degradacji tkanek, a także w leczeniu blizn [8, 26].

Wspomaganie procesu syntezy kolagenu i elastyny

Związki triterpenowe wpływają korzystnie na strukturę i kondycję skóry. Badania wykazują, że kwas betulinowy to związek inhibitujący działanie elastazy, enzymu z grupy hydrolaz, odpowiedzialnego za hydrolizę wiązania peptydowego i rozkład elastyny, jednego z białek strukturalnych skóry. Kwas betulinowy oraz lupeol wpływają korzystnie na tworzenie kolagenu, którego synteza jest ściśle uzależniona od obecności białka HSP 47 (ang. *Heat Shock Protein 47*) odpo-

wiedzialnego za tworzenie trójwymiarowej struktury tkanki łącznej w skórze. HSP 47 zapewnia tworzenie wysokiej jakości kolagenu typu I, który wpływa na mechaniczną odporność skóry, jej elastyczność i ogólną kondycję. Lupeol to związek stymulujący tworzenie kolagenu w obrębie fibroblastów. Produkty, w składzie których występuje lupeol i kwas betulinowy, zapobiegają wiotczeniu skóry, poprawiają jej elastyczność oraz wzmacniają jej strukturę [8, 9, 26].

Działanie antyalergiczne

Badania *in vitro* z udziałem suchego ekstraktu z kory brzozy, zawierającego nie mniej niż 70% betuliny, nie wykazały żadnych reakcji immunotoksycznych ani alergicznych na badanych komórkach. Co ciekawe, ekstrakt brzozowy w wysokich stężeniach może zahamować wstrząs anafilaktyczny, będący najbardziej groźną formą reakcji alergicznej organizmu. Ekstrakt z kory brzozy, zawierający wyizolowane substancje czynne, nie wywołuje reakcji alergicznych nawet u osób uczulonych na pyłki, ponieważ pozbawiony jest cząsteczek białek budujących ziarna pyłków roślin (np. brzozy) oraz niektórych grzybów pleśniowych. Preparaty zawierające ekstrakt brzozowy można więc bezpiecznie stosować u alergików. Interesujące badania antyalergiczne triterpenów poświęcono betulinie, która powoduje znaczną redukcję zmian skórnych i zmniejszenie objawów świądu [23]. Dodatkowo, zmniejsza stężenie immunoglobulin E, przeciwciał, które w obecności alergenów wywołują gwałtowne reakcje alergiczne. Podczas testów trwających 14 dni zbadano wpływ ekstraktu z kory brzozy na odpowiedź autoimmunologiczną organizmu myszy i świnek morskich, stosując dawkę 100 mg i 1000 mg na 1 kg masy ciała. Nie zaobserwowano ani reakcji alergicznych, ani spadku masy ciała, ani komórkowych zmian organów. Związki te zauważalnie zmniejszały natomiast wstrząs anafilaktyczny wywołany sztucznie przez podanie 0,6% roztworu białka jaja (gdzie głównym alergenem jest owalbumina), powodując obniżenie indeksu reakcji Weigla (*Weiglereaction index*) z 2,2 do 1,1 przy zastosowanej dawce 1,1 mg/kg masy ciała oraz z 2,2 do 1,3 w przypadku dawki 1000 mg/kg masy ciała [24].

Działanie promieniochronne oraz regulujące proces melanogenezy w skórze

Betulina to związek wpływający korzystnie na proces melanogenezy, a mechanizm jej działania polega na regulacji procesu wytwarzania i dystrybucji melaniny.

Betulina działa inhibitująco na tyrozynazę, enzym odpowiadający za przekształcenie tyrozyny w melaninę. Właściwość ta ma zastosowanie w profilaktyce i pielęgnacji skóry z zaburzoną syntezą melaniny (piegi, znamiona barwnikowe). Pojawianie się nieprawidłowych zmian barwnikowych, oprócz natury estetycznej, może prowadzić do powstania znacznie poważniejszych problemów, takich jak nowotwory skóry. Patogeneza tego typu nowotworów jest związana szczególnie z uszkodzeniem komórek naskórka wskutek chronicznego promieniowania ultrafioletowego. Badania kliniczne potwierdzają wysoką skuteczność betuliny w redukowaniu znamion dysplastycznych oraz zmian typu rogowacenia słonecznego [27]. Badania przeprowadzone na skórze ekspozowanej na działanie promieniowania UV potwierdzają aktywność biologiczną betuliny oraz kwasu betulinowego, jako związków zapobiegających występowaniu uszkodzeń skóry spowodowanych promieniowaniem słonecznym. Skórę, na którą zaaplikowano emulsję typu O/W zawierającą 1% SLS (laurylosiarczanu sodu) i 1% pentacyklicznych triterpenów (betuliny i kwasu betulinowego), naświetlano promieniowaniem o długości fali 300 nm i natężeniu 30 J/m² przez 30 min przez okres kolejnych 20 dni. Stwierdzono, że związki te pełnią ochronną rolę i są aktywne w leczeniu uszkodzeń skóry [28]. Preparaty z betuliną mają działanie profilaktyczne w powstawaniu czerniaka skóry, skutecznie zapobiegające pojawianiu się nieprawidłowych zmian barwnikowych w skórze [29, 30].

Działanie składników ekstraktu brzozonego w farmacji

Temat działania związków triterpenowych na funkcjonowanie organizmu ludzkiego stał się w ostatnich latach obiektem intensywnych badań naukowców. Szacuje się, że średnie spożycie triterpenów wchodzących w skład warzyw, owoców, olejów roślinnych w krajach zachodnich wynosi 250 mg na dobę. Działanie terapeutyczne związków triterpenowych na organizm człowieka jest obiektem licznych badań klinicznych, które potwierdzają ich szerokie spektrum działania, od aktywności antyoksydacyjnej po działanie hepatochronne [31].

Aktywność przeciwnowotworowa

Najnowsze badania dotyczące możliwości zastosowania związków triterpenowych w onkologii wskazują na skuteczność betuliny i lupeolu w hamowaniu rozwoju wielu linii komórek nowotworowych: raka piersi (również postaci z przerzutami), raka płuc, wątroby, skóry (czerniaka złośliwego), nerek, jajników, żołądka i trzustki, jamy ustnej, okrężnicy, prostaty, a także krwi

(białaczkę) [32–36]. Również kwas betulinowy okazał się być skutecznym związkiem w leczeniu nowotworów. Wykazuje on działanie cytotoksyczne w przypadku: czerniaka skóry [20], białaczki limfoblastycznej [37], raka jelita grubego [38], piersi, szyjki macicy, prostaty [39], nerwiaka niedojrzałego [40], raka jajników i tarczycy [41]. Mechanizm działania kwasu betulinowego na komórki nowotworu jest oparty na wywoływaniu procesu apoptozy, czyli ich samoistnej śmierci. Indukcja apoptozy za pośrednictwem związków proapoptotycznych stanowi ważny element terapii przeciwnowotworowej. Jednakże proces apoptozy w przypadku komórek rakowych jest osłabiony, a nawet zablokowany przez zmutowane geny odpowiedzialne za regulację cyklu życiowego komórki. Kwas betulinowy indukuje proces apoptozy, wpływając na potencjał membrany mitochondrialnej i inicjując generowanie aktywnych form tlenu związanych z aktywacją proapoptotycznych enzymów (kinazy p38 MAPK i SAP/JNK) [42–45]. Badania farmakokinetyczne kwasu betulinowego pokazały, że największe stężenie tego związku występuje właśnie w tkance objętej zmianami nowotworowymi [36, 46]. Proces apoptozy w stosunku do komórek rakowych płuc wywołuje również betulina [37], natomiast kwas oleanolowy w przypadku komórek nowotworu mózgu [42, 47]. Innym działaniem samej betuliny, odgrywającym szczególną rolę w profilaktyce chorób nowotworowych, jest zwiększenie produkcji cytokin we krwi, w szczególności czynnika martwiczego nowotworów (TNF-alfa) [48]. Ponadto, według przeprowadzonych dotychczas badań, lupeol jest skutecznym środkiem leczącym choroby genetyczne u myszy i zapobiegającym pęknięciom łańcucha DNA, co jest częstą przyczyną rozwoju nowotworów [49].

Kluczowym procesem w rozrastaniu się komórek rakowych i ich rozprzestrzenianiu do innych tkanek jest angiogeneza. Ograniczenie tego procesu stanowi jeden z filarów terapii przeciwrakowej. Wstępne badania potwierdzają, że kwas oleanolowy wykazuje właściwości hamujące proces angiogenezy oraz inhibituje podstawowy składnik wzrostu fibroblastów BFGF (ang. *Basic Fibroblast Growth Factor*). W badaniach *in vitro* stwierdzono, że kwas betulinowy hamuje aktywność enzymatyczną aminopeptydazy N (APN). APN to szeroko rozpowszechniony enzym, który odgrywa znaczącą rolę w procesie tworzenia nowotworów naczyniowych i formowaniu komórek śródbłonkowych. Nie stwierdzono aktywności enzymatycznej APN w komórkach śródbłonkowych będących pod wpływem kwasu betulinowego. Dowiedziono, że aktywności kwasu betulinowego hamującego angiogenezę towarzyszyła modulacja funkcji membrany mitochondrium przez zmniejszenie potencjału redoks mitochondrium [42, 50–53].

Działanie przeciwwirusowe

Działanie przeciwwirusowe betuliny i kwasu betulinowego zostało potwierdzone na wielu gatunkach wirusów. Betulina działa hamująco na rozwój wirusa opryszczki (HSV-1 i HSV-2), a także wirusa typu ECHO, który jest odpowiedzialny za choroby skóry (wysypki) i choroby przewodu pokarmowego. Betulina wykazuje również skuteczność w działaniu przeciw wirusowi grypy FPV [54, 55]. Triterpeny z brzozy są badane pod kątem działania antywirusowego na komórkach brodawczaka (wirus HPV, który może wywołać raka szyjki macicy i krtani). Prowadzono badania nad działaniem antywirusowym kwasu betulinowego oraz lupeolu pod kątem aktywności przeciwwirusowej w stosunku do HIV [56]. Lupeol oraz jego pochodne skutecznie hamują rozwój HIV poprzez inhibitowanie proteazy wirusa [57]. Badania nad antywirusowym działaniem kwasu betulinowego dały również pozytywne rezultaty w testach przeciwko wirusom EMCV (wirus wywołujący m.in. zapalenie mózgu i mięśnia sercowego), zapalenia wątroby typu A i C oraz VSV (wirus odpowiedzialny za pęcherzykowate zapalenie jamy ustnej) [58].

Hamowanie rozwoju malarii

Lupeol i jego pochodne oraz kwas betulinowy wykazują również aktywne działanie przeciw pierwotniakom z rodzaju *Plasmodium rotium*, drobnoustrojom, które wywołują malarię (nazywaną także zimnicą, dawniej febrą lub poludyzmem) [59]. Możliwość stosowania tych triterpenów w leczeniu malarii ma szczególne znaczenie w krajach biednych, nie dysponujących środkami na kosztowne terapie. Wyniki badań *in vitro* pokazują, że zarówno lupeol, jak i kwas betulinowy zauważalnie inhibitują aktywność *Plasmodium falciparum* w dawkach 1,02–18,53 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Ze względu na pozytywne wyniki prowadzono badania nad skutecznym zastosowaniem tych związków w walce z malarią [53, 60].

Działanie hepatochronne

Badania nad wpływem betuliny na komórki wątroby potwierdziły jej żółciotwórcze działanie. Dodatkowo, betulina wykazuje działanie lipotropowe, przez co obniża poziom lipidów we krwi, wątrobie i tkance tłuszczowej. Dzięki temu wspomaga proces metabolizmu produktów przemiany materii i ich wydalanie z organizmu. Kwas betulinowy skutecznie hamuje sekrecję kwasów żołądkowych, a zatem powoduje zmniejszenie zmian zapalnych

w przewodzie pokarmowym [51, 61]. Lupeol to również związek odgrywający ważną rolę w ochronie komórek wątroby i prawidłowym funkcjonowaniu tego narządu. Związek ten hamuje rozpad komórek wątroby poprzez odbudowę enzymów wątrobowych dehydrogenazy alaninowej (ALT), dehydrogenazy asparaginowej (AST) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Ponadto, redukuje on stan zapalny (pobudzając wydzielanie czynnika nekrozy nowotworów TNF- α , a także odnawia równowagę tlenową przez zmniejszenie poziomu malondialdehydu (MDA) w surowicy i wątrobie oraz powoduje równoczesne zwiększenie aktywności katalazy wątrobowej (CAT), peroksydazy glutationowej (GSHPx) oraz nieenzymatycznego antyutleniającego glutationu (GSH) [37]. Kolejnym triterpenem wykazującym działanie hepatochronne jest kwas oleanolowy. Działanie hepatochronne tego związku polega na zapobieganiu zwłóknieniom i marskości wątroby spowodowanym chronicznymi chorobami wątroby. Udowodniono, że kwas oleanolowy zmniejsza jądrową akumulację białka Nrf-2 odgrywającego kluczową rolę w procesach oksydacyjnych, powodując efekt ochronny komórek wątrobowych [62]. Badania *in vitro* potwierdzają także skuteczność betuliny i kwasu betulinowego w hamowaniu negatywnego wpływu alkoholu etylowego na komórki wątroby. Związki te wykazują cytoprotekcyjne działanie w stosunku do komórek wątroby poddanych procesowi inkubacji betuliną (10 μ M) i kwasem betulinowym (1 μ M) przez 24 h. Toksyczność oznaczana była metodą MTT. Betulina i kwas betulinowy przeciwdziałały skutkom działania utleniającego nadtlenku wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego O₂^{•-} (o 50%), hamując produkcję cytokinin, TGF i NFB/I oraz JNK [63].

Podsumowanie

Ekstrakt z kory brzozy stanowi bogate źródło składników aktywnych, w tym związków triterpenowych, takich jak: betulina, lupeol, kwas betulinowy i oleanolowy. Jako surowiec w recepturowaniu produktów kosmetycznych i farmaceutycznych znalazł zastosowanie zarówno ekstrakt, jak i izolowane z ekstraktu składniki aktywne. Wciąż udoskonalane techniki wyodrębniania, oczyszczania i identyfikacji składników aktywnych pozwalają na tworzenie skutecznych receptur kosmetycznych i preparatów o działaniu terapeutycznym. Kora brzozy jest równocześnie surowcem powszechnie dostępnym, jednocześnie stanowiącym dodatkowy atut tej rośliny. Warto więc zwrócić uwagę na ogromny potencjał, jaki niesie ze sobą zastosowanie tego surowca zarówno w przemyśle kosmetycznym, jak i farmaceutycznym.

Literatura

- [1] Zhao G., Yan W., Cao D., Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 43, s. 959–962.
- [2] Qi-he C., Ming-liang F., Jin L., Hai-feng Z., Guo-qing H., Hui R., Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of betulin from white birch bark using response surface methodology, *Ultrasonics Sonochem*, 2009, 16, s. 599–604.
- [3] Abyshev A.Z., Agaev E.M., Guseinov A.B., Studies of the chemical composition of birch bark extracts (*Cortex betula*) from the Betulaceae family, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2007, 41(8), s. 419–423.
- [4] Diouf P.N., Stevanovic T., Boutin Y., The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis Britton*) extracts, *Industrial Crops and Products*, 2009, 30(2), s. 297–303.
- [5] Başer K.H.C., Demirci B., Studies on *Betula* Essential Oils, *Arkivoc* 2007, 7, s. 335–348.
- [6] Ożarowski A., Jaroniewski W., *Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie*, IWZZ, Warszawa 1987.
- [7] Bednarczyk-Cwynar B., Zaprutko L., Trójterpenoidy w kosmetyce i kosmetologii, *Polish Journal Cosmetology*, 2003, 6(4), s. 218–240.
- [8] Pat. USA 216249 A1 (2006).
- [9] Sionkowska A., Skopinska J., Wisniewski M., Leznicki A., Spectroscopic studies into influence of UV radiation on elastin in the presence of collagen, *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology*, 2007, 86, s. 186–191.
- [10] Huyke C., Reuter J., Rödiger M., Kersten A., Laszczyk M., Scheffler A., Nashan D., Schempp C., Treatment of actinic keratoses with a novel betulin-based oleogel. A prospective, randomized, comparative pilot study, *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (JDDG)*, 2009, 7(2), s. 128–133.
- [11] Grajka W., *Przeciwutleniacze w żywności*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2000.
- [12] Cybul M., Nowak R., Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych, *Herba Polonica*, 2008, 54(1), s. 68–77.
- [13] Sultana S., Saleem M., Sharma S., Khan N., Lupeol, a triterpene, prevents free radical mediated macromolecular damage and alleviates benzoyl peroxide induced biochemical alterations in murine skin, *Indian Journal of Experimental Biology*, 2003, 41, s. 827–831.
- [14] Sudharsan P.T., Mythili Y., Selvakumar E., Varalakshmi P., Cardioprotective effect of pentacyclic triterpene, lupeol and its ester on cyclophosphamide-induced oxidative stress, *Human & Experimental Toxicology*, 2005, 24, s. 313–318.
- [15] Co C., Zettersten M., Nyholm L., Sjöberg P. J.R., Turner C., Degradation effects in the extraction of antioxidants from birch bark using water at elevated temperature and pressure, *Analytica Chimica Acta*, 2012, 716, s. 40–48.
- [16] Bai Y.-H., Feng Y.-Q., Mao D.-B., Xu C.-P., Optimization for botulin production from mycelial culture of *Inonotus obliquus* by orthogonal design and evaluation of its antioxidant activity, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2012, 45, s. 663–669.
- [17] Wang X., Ye X., Liu R., Chen H.L., Bai H., Liang X., Zhang X. D., Wang Z., Li W., Hai C.X., Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: possible role of Nrf2 and MAP kinases, *Chemico Biological Interactions*, 2010, 184, s. 328–337.
- [18] Steele J.C.P., Warhurst D.C., Kirby G.C., Simmonds M.S.J., *In vitro* and *in vivo* evaluation of betulinic acid as an antimalarial, *Phytotherapy Research*, 1999, 13(2), s. 115–119.
- [19] Copp B.R., Pearce A.N., Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*, *Natural Products Reports*, 2007, 24, s. 278–297.
- [20] Poumale H.M.P., Awoussong K.P., Simo C.C.F., Ngadjui B.T., Shiono Y., Randrianasolo R., Long-chain alkanolic acid esters of lupeol from *Dorstenia harmsiana* Engl. (Moraceae), *Natural Product Research*, 2012, 26(8), s. 749–755.
- [21] Jain S.C., Pancholi B., Jain R., Studies on Antimicrobial and Antioxidant Potentials of *Pergularia daemia* (Forsk.) Chiov, *Asian Journal Chemistry*, 2012, 24(8), s. 3513–3516.

- [22] Fontanay S., Grare M., Mayer J., Finance Ch., Duval R.E., Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes, *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, 120(2), s. 272–276.
- [23] Kovalenko L.P., Balakshin V.V., Presnova G.A., Chistyakov A.N., Shipaeva E.V., Alekseeva S.V., Durnev A.D., Immunotoxicity and allergenic properties of betulin-containing birch bark dry extract, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2007, 41, s. 17–19.
- [24] Kim E.C., Lee H.S., Kim S.K., Choi M.S., Lee S., Han J.B., An H.J., Um J.Y., Kim H.M., Lee N.Y., Bae H., Min B.I., The bark of *Betula platyphylla* var. *japonica* inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice, *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, 116, s. 270–278.
- [25] Dehelean C.A., Șoica C., Ledeti I., Aluș M., Zupko I., Gălușcan A., Cinta-Pinzaru S., Munteanu M., Study of the betulin enriched birch bark extracts effects on human carcinoma cells and ear inflammation, *Chemistry Central Journal*, 2012, 6, s. 137–146.
- [26] Naaime D., Baudouin C., Bredif S., Msika P., Lupeol stimulates the production of high-quality type I collagen in human skin through HSP47 induction, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2008, 58(2), 2, AB62.
- [27] Huyke C., Reuter J., Rödiger M., Kersten A., Laszczyk M., Scheffler A., Nashan D., Schempp C., Treatment of actinic keratoses with a novel betulin-based oleogel. A prospective, randomized, comparative pilot study, *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (JDDG)*, 2009, 7(2), s. 128–133.
- [28] Dehelean C.A., Peev C., Soica C., Ursica L., Coneac G., Toxicological assessment of complex chemical mixtures using the Threshold of Toxicological Concern concept, *Toxicol Letters*, 2008, 180, s. 32–46.
- [29] Muceniece R., Saleniece K., Riekstina U., Krigere L., Tirzitis G., Ancans J., Betulin binds to melanocortin receptors and antagonizes alpha-melanocyte stimulating hormone induced cAMP generation in mouse melanoma cells, *Cell Biochemistry and Function*, 2007, 25, s. 591–596.
- [30] Kim D.S.H.L., Pezzuto J.M., Pisha E., Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1998, 8(13), s. 1707–1712.
- [31] Saleem M., Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene, *Cancer Letters*, 2009, 285, s. 109–115.
- [32] Da Silva D.A., Alves V.G., Da Silva C.C., De Souza M.C., Franco D.M.M., Ribeiro L.C., Kato L., De Oliveira C.M.A., De Carvalho J.E., Kohn L.K., Antiproliferative activity of *Luehea candicans* Mart. et Zucc. (Tiliaceae), *Natural Product Research*, 2012, 26(4), s. 364–369.
- [33] Reiko R.T., Tomoko N., Chiharu Y., Wada S.I., Yamada T., Tokuda H., Potential Anti-Tumor-Promoting Activity of 3 α -Hydroxy-D: A-friedooleanan-2-one from the Stem Bark of *Mallotus philippensis*, *Planta Medica*, 2008, 74(4), s. 413–416.
- [34] Pyo J.S., Roh S.H., Kim D.K., Lee J.G., Lee Y.Y., Hong S.S., Kwon S.W., Park J.H., 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 Medica*, 2009, 75(2), s. 127–131.
- [35] Shintyapina A.B., Shults E.E., Petrenko N.I., Uzenkova N.V., Tolstikov G.A., Pronkina N.V., Kozhevnikov V.S., Pokrovsky A.G., Effect of nitrogen-containing derivatives of the plant triterpenes betulin and glycyrrhetic acid on the growth of MT-4, MOLT-4, CEM, and Hep G2 tumor cells, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2007, 33(6), s. 579–583.
- [36] Drag M., Surowiak P., Drag-Zalesinska M., Dietel M., Lage H., Oleksyszyn J., Comparison of the cytotoxic effects of birch bark extract, betulin and betulinic acid towards human gastric carcinoma and pancreatic carcinoma drug-sensitive and drug-resistant cell lines, *Molecules*, 2009, 14(4), s. 1639–1651.
- [37] Pokrovskii A.G., Shintyapina A.B., Pronkina N.V., Kozhevnikov V.S., Plyasunova O.A., Shults E.E., Tolstikov G.A., Activation of apoptosis by derivatives of betulinic acid in human tumor cells *in vitro*, *Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 407(5), s. 697–701.

- [38] Jung G.R., Kim K.-J., Choi C.-H., Lee T.-B., Han S. I., Han H.-K., Lim S.-C., Effect of betulinic acid on anticancer drug-resistant colon cancer cells, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2007, 101(4), s. 277–285.
- [39] Kessler J.H., Mullauer F.B., De Roo G.M., Medema J.P., Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types, *Cancer Letters*, 2007, 251(1), s. 132–145.
- [40] Schmidt M.L., Kuzmanoff K.L., Ling-Indeck L., Pezzuto J.M., Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines, *European Journal of Cancer*, 1997, 33(12), s. 2007–2010.
- [41] Fulda S., Betulinic Acid for Cancer Treatment and Prevention, *International Journal of Molecular Sciences*, 2008, 9(6), s. 1096–1107.
- [42] Laszczyk M.N., Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy, *Planta Medica*, 2009, 75, s. 1549–1560.
- [43] Fulda S., Scaffidi C., Susin S.A., Krammer P.H., Kroemer G., Peter M.E., Debatin K.M., Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid, *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273, s. 33942–33948.
- [44] Tan Y., Yu R., Pezzuto J.M., Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation, *Clinical Cancer Research*, 2003, 9, s. 2866–2875.
- [45] Mullauer F.B., Kessler J.H., Medema J.P., Betulinic acid induces cytochrome c release and apoptosis in a Bax/Bak-independent, permeability transition pore dependent fashion, *Apoptosis*, 2009, 14, s. 191–202.
- [46] Shin Y.G., Cho K.H., Chung S.M., Graham J., Das Gupta T.K., Pezzuto J.M., *Journal of Chromatography. B Biomedical Sciences Appl.*, 1999, 732(2), s. 331–336.
- [47] Martin R., Carvalho J., Ibeas E., Hernandez M., Ruiz-Gutierrez V., Nieto M.L., Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation, *Cancer Research*, 2007, 67, s. 3741–3751.
- [48] Zdzisińska B., Rzeski W., Paduch R., Szuster-Ciesielska A., Kaczor J., Wejksza K., Kandfer-Szerszeń M., Differential effect of betulin and betulinic acid on cytokine production in human whole blood cell cultures, *Polish Journal Pharmacology*, 2003, 55, s. 235–238.
- [49] Nigam N., Prasad S., Shukla Y., Preventive effects of lupeol on DMBA induced DNA alkylation damage in mouse skin, *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45, s. 2331–2335.
- [50] Melzig M.F., Bormann H., Betulinic acid inhibits aminopeptidase N activity, *Planta Medical*, 1998, 64, s. 655–657.
- [51] Ezzata S.M., Abdallahb H.M., Fawzyc G.A., El-Maraghyd S.A., Hepatoprotective constituents of *Torilis radiata* Moench (Apiaceae), *Natural Product Research*, 2012, 26, s. 282–285.
- [52] Bauvois B., Dauzonne D., Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) Inhibitors: Chemistry, Biological Evaluations, and Therapeutic Prospects, *Medical Research Reviews*, 2006, 26, s. 88–130.
- [53] Kwon H.J., Shim S.J., Kim J.H., Cho H.Y., Yum Y.N., Kim S.H., Yu J., Betulinic acid inhibits growth factor-induced in vitro angiogenesis via the modulation of mitochondrial function in endothelial cells, *Japanese Journal of Cancer Research*, 2002, 93, s. 417–425.
- [54] Gong Y., Raj K.M., Luscombe C.A., Gadawski I., Tam T., Chu J., Gibson D., Carlson R., Sacks S.L., The synergistic effect of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses, *Antiviral Research*, 2004, 64(2), s. 127–130.
- [55] Pavlova N.I., Savinova O.V., Nikolaeva S.N., Boreko E.I., Flekhter O.B., Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses, *Fitoterapia*, 2003, 74(5), s. 489–492.
- [56] Cichewicz R.H., Kouzi S.A., Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection, *Medicinal Research Reviews*, 2004, 24(1), s. 90–114.

Ekstrakt z brzozy brodawkowatej *Cortex Betulae*, jako źródło...

- [57] Wei Y., Ma C., Chen D., Hattori M., Anti-HIV-1 protease triterpenoids from *Stauntonia obovatifoliola* Hayata subsp. *Intermedia*, *Phytochemistry*, 2008, 69, s. 1875–1879.
- [58] Kamińska T., Kaczor J., Rzeski W., Większa K., Kandefer-Szerszeń M., Witek M., A comparison of the antiviral activity of the three triterpenoids isolated from *Betula alba* bark, *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin-Polonia*, 2004, 59, s. 1–7.
- [59] Clark I.A., Cowdenb W.B., The pathophysiology of falciparum malaria, *Pharmacol, Therapeutics*, 2003, 99, s. 221–260.
- [60] Fotie J., Scott Bohle D., Leimanis M.L., Georges E., Rukunga G., Nkengfack A. E., Lupeol Long-Chain Fatty Acid Esters with Antimalarial Activity from *Holarrhena floribunda*, *Journal of Natural Products*, 2006, 69(1), s. 62–67.
- [61] Adesanwo J.K., Ekundayo O., Oluwole F.S., Olajide O.A., Van Den Berge A.J.J., Findlay J.A., The Effect of *Tetracera Potatoria* and its Constituent Betulinic Acid on Gastric Acid Secretion and Environmentally – Induced Gastric Ulceration, *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 2003, 18(1–2), s. 21–26.
- [62] Pollier J., Goossens A., Oleanolic acid, *Phytochemistry*, 2012, 77, s. 10–15.
- [63] Szuster-Ciesielska A., Plewka K., Daniluk J., Kandefer-Szersze M., Betulin and betulinic acid attenuate ethanol-induced liver stellate cell activation by inhibiting reactive oxygen species (ROS), cytokine (TNF- α , TGF- β) production and by influencing intracellular signaling, *Toxicology*, 2011, 280, s. 152–163.

Do cytowania:

Malinowska M., Sikora E., Ogonowski J., Ekstrakt z brzozy brodawkowatej *Cortex Betulae*, jako źródło substancji aktywnych, *Herbalism*, 2019, 1(5), s. 17–31.