

KATEDRA FARMAKOGNOZJI
WYDZIAŁU FARMACEUTYCZNEGO
UNIwersYTETU Jagiellońskiego
COLLEGIUM MEDICUM

CYTOTOKSYCZNOŚĆ
PÓLSYNTETYCZNYCH POCHODNYCH
BETULINY

ROZPRAWA DOKTORSKA

Jacek Achrem-Achremowicz

Kraków 2007

PRAGNĘ WYRAZIĆ PODZIĘKOWANIA PROMOTOROWI,
PANU PROFESOROWI DR HAB. ZBIGNIEWOWI JANECZKO
ZA SKIEROWANIE MOJEGO ZAINTERESOWANIA
NA TEMATYKĘ DOTYCZĄCĄ BETULINY I TRITERPENÓW
ORAZ WSZELKĄ POMOC W REALIZACJI TEJ PRACY

Chciałbym wyrazić wdzięczność
Komitetowi Badań Naukowych,
za wsparcie finansowe w postaci
grantu promotorskiego nr:
0274/P01/2006/30-2P05F00130

Powstanie tej pracy byłoby
zapewne również niemożliwe
bez pomocy wielu osób,
spośród których
na wyrazy szczególnego uznania
zasługują:

Promotor — Prof. dr hab. Zbigniew Janeczko
Doc. dr hab. Józef Dulak
Mgr Agnieszka Galanty
Mgr Sławomir Gołda
Dr Elżbieta Kępczyńska
Dr Lidia Zapór
Dr Marek Żylewski
Mgr Anna Drabik
Mgr Grażyna Matysiuk
St. techn. Tomasz Knercer
Pan Tomasz Więcaszek
Mgr inż. Marek Zamecki
Dr Agnieszka Król-Otwinowska

Pragnę także podziękować
Koleżankom i Kolegom
z Katedry Farmakognozji
Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Jagiellońskiego
Collegium Medicum
za miłą, życzliwą atmosferę
i zawsze koleżeńską postawę

Spis treści

Wykaz ważniejszych stosowanych skrótów	v
Wybrane reguły nazewnictwa związków triterpenowych	vii
I Część teoretyczna	1
1 Wprowadzenie	3
2 Biogeneza triterpenów	5
3 Wybrane składniki kory brzozonej	11
4 Mechanizm działania apoptotycznego triterpenów typu lupanu	15
4.1 Określenie wzrostu odporności i tolerancji krzyżowej	24
4.2 Działanie chemoprewencyjne	29
4.3 Badania <i>in vivo</i>	29
4.4 Testy biologiczne	29
4.5 Farmakokinetyka	30
5 Modyfikacje chemiczne lupeolu, betuliny i kwasu betulinowego	33
5.1 Ogólna charakterystyka właściwości betuliny	33
5.2 Utlenianie	34
5.2.1 Utlenianie grup hydroksylowych	34
5.2.2 Utlenianie prowadzące do degradacji cząsteczki	38
5.2.3 Utlenianie wiązania podwójnego	42
5.3 Dehydrogenacja	47
5.4 Hydrogenacja	49
5.5 Estryfikacja	50
5.6 Eteryfikacja	53
5.7 Połączenia azotowe	55
5.8 Reakcje z fluorowcami — halogenopochodne	60
5.9 Izomeryzacja	61
5.10 Dehydratacja	65
5.11 Glikozylacja	67
5.12 Przekształcenia biotechnologiczne	69
6 Oznaczanie toksyczności podstawowej	73

7	Zarys metod wyznaczania lipofilności	75
8	Założenia i cel pracy	79
II	Część doświadczalna	81
9	Materiał i metody	83
9.1	Metody	83
9.1.1	Chromatografia cienkowarstwowa	83
9.2	Odczynniki	84
9.3	Izolacja i oczyszczanie betuliny (BET)	85
9.3.1	Izolacja i identyfikacja lupeolu (LUP)	86
9.4	Synteza pochodnych betuliny	88
9.4.1	Synteza allobetuliny (ALLO)	88
9.4.2	Synteza 3-octanu allobetuliny (ACALLO)	89
9.4.3	Synteza dioctanu betuliny (BC2)	89
9.4.4	Synteza 3-octanu betuliny (3MOB)	90
9.4.5	Synteza 28-octanu betuliny (28MOB)	91
9.4.6	Synteza dipropionianu betuliny (BC3)	91
9.4.7	Synteza dikapronianu betuliny (BC6)	92
9.4.8	Synteza dikaprylanu betuliny (BC8)	93
9.4.9	Synteza dikaprynianu betuliny (BC10)	93
9.4.10	Synteza dilaurynianu betuliny (BC12)	94
9.4.11	Synteza dipalmitynianu betuliny (BC16)	95
9.4.12	Synteza bis(hemifitalanu) betuliny (DFTB)	96
9.4.13	Synteza bis(hemiglutaranu) betuliny (DGB)	96
9.4.14	Synteza dibenzoesanu betuliny (DBB)	97
9.4.15	Synteza dioctanu dihydrobetuliny (DODHB)	98
9.4.16	Synteza dihydrobetuliny (DHB)	99
9.4.17	Synteza 30-bromo-dioctanu betuliny (BRDOB)	99
9.4.18	Synteza 30-metoksybetuliny (30MBET)	100
9.5	Linie komórkowe i ich hodowla	101
9.6	Oznaczenia cytotoksyczności	103
9.6.1	Oznaczanie cytotoksyczności w teście MTT	103
9.6.2	Oznaczanie cytotoksyczności w teście LDH	103
9.6.3	Oznaczanie cytotoksyczności w teście TB	103
9.7	Oznaczenia lipofilności	104
10	Wyniki i dyskusja	105
10.1	Izolacja betuliny i synteza jej pochodnych	105
10.1.1	Izolacja betuliny z kory brzozy	105
10.1.2	Synteza pochodnych betuliny	107
10.2	Lipofilność betuliny i jej pochodnych	109
10.3	Cytotoksyczność betuliny i jej pochodnych	115
10.3.1	Oznaczenia cytotoksyczności na komórkach ludzkich	115
10.3.2	Oznaczenia cytotoksyczności na komórkach zwierzęcych	139
10.4	Zależność cytotoksyczności betuliny i jej pochodnych od lipofilności	146

10.5 Rozważania końcowe	152
11 Podsumowanie i wnioski	157
Piśmiennictwo	163
Dodatek A. Zestawienie widm NMR ^1H i ^{13}C	181
Dodatek B. Przypisania sygnałów NMR ^1H i ^{13}C wybranych związków	209
Dodatek C. Wykaz wykorzystanych programów komputerowych	213

Wykaz ważniejszych stosowanych skrótów i nazw chemicznych

Ac	grupa acetylowa (CH_3COO^-)
Ac₂O	bezwodnik octowy
BCNU	N,N'-bis(2-chloroetylo)-N-nitrozomocznik
bezw.	bezwodny
DCC	1,3-dicykloheksylokarbodiimid
DHP	dihydropiran
DiOC₆(3)	jodek 3,3'-diheksyloksakarbocyanidu
DMSO	dimetylosulfotlenek
EC₅₀	stężenie związku powodujące śmierć 50% komórek
EtOAc	octan etylu
LDH	dehydrogenaza mleczanowa
MeOH	metanol
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylo-1,3-tiazol-2-ylo)-2,5-difenylo-2H-tetrazolowy
NBS	N-bromoimid kwasu bursztynowego
NMO	N-tlenek-N-metylomorfoliny
p. atm.	ciśnienie atmosferyczne
PCC	chlorochromian pirydyniowy
PDC	dichromian pirydyniowy
(Ph)₃P	trifenylfosfina
PI	jodek propidiowy
PIR	pirydyna bezwodna

PPTS	4-toluenosulfonian pirydyniowy
PVP	poliwinylopirolidon
rft	reaktywne formy tlenu
s.s.	sucha substancja
TBAB	bromek tetrabutylamoniowy
TBMIB	bromek 1-butylo-3-metyloimidazoliowy
TEA	trietyloamina
THF	tetrahydrofuran
temp.	temperatura
TRAIL	inaczej Apo-2L, TNF-related apoptosis inducing ligand
t.w.	temperatura wrzenia
VP16	etopozyd

Wybrane reguły nazewnictwa związków triterpenowych

Dotychczas brak jest wytycznych dotyczących nazewnictwa związków terpenowych w języku polskim. Nie jest na przykład określone, czy przedrostki lub przyrostki — oznaczające modyfikację struktury triterpenowej — powinny być pisane czcionką prostą, italikiem, w wersji spolszczonej, czy oryginalnej. Przedrostek oznaczający otwarcie pierścienia można by zatem zapisać na cztery sposoby: „seko-”, „seco-”, „seco-” lub „seko-”.

Dlatego zastosowano ogólne zalecenia IUPAC opracowane przez [159] w języku angielskim z zaadaptowaniem spolszczeń z „Nomenklatury steroidów” [133]. Ważniejsze konwencje przyjęte za [133] przedstawiono poniżej:

- 3S-2.5 Lokant wiązania podwójnego powinien bezpośrednio poprzedzać sylabę wskazującą nienasylenie.
- 3S-4.4 Aldehydy nazywa się przez użycie przyrostka „-al” lub „-aldehyd”. Przedrostek „-okso” wskazuje na zamianę grupy metylenowej ($-\text{CH}_2-$) na karbonylową lub metylowej ($-\text{CH}_3$) w aldehydową, bez zmiany liczby atomów węgla.
- 3S-4.4 Jeśli grupa aldehydowa jest utworzona przez podstawienie atomu wodoru (w metinie, metylenie lub metylu) przez $-\text{CHO}$, stosowany jest przedrostek „formylo-” lub przyrostek „-karboaldehyd”.
- 3S-4.7 Etery nazywa się jako alkoksy pochodne.
- 3S-6.1 Przedrostek „nor-” oznacza usunięcie grupy metylenowej z łańcucha (3S-6.1) lub pierścienia (3S-7.1). Uważa się, że traczone są grupy z najwyższymi numerami, a lokant bezpośrednio poprzedza przedrostek „nor-” w nor-związku. Pozostała część oryginalnej numeracji nie zmienia się.
- 3S-8.1 Rozerwanie pierścienia z dodaniem atomu wodoru przy każdej w ten sposób powstałej grupie końcowej wskazuje się przedrostkiem „seko-”, z zachowaniem oryginalnej numeracji atomów węgla cząsteczki. Gdy rozerwany jest więcej niż jeden pierścień, preferowana jest nazwa systematyczna.
- 3S-7.5 W związkach w których nastąpiła migracja wiązania można stosować przedrostek „abeo-” w formie $x(y \rightarrow z)abeo-$, gdzie: x wskazuje niezmienny koniec migrującego wiązania, y pozycję wyjściową od której drugi koniec tego wiązania przesunął się, z nową pozycją do której wiązanie przemigrowało. Niezbędne jest określenie powstałej stereochemii.

Część I
Teoretyczna

Rozdział 1

Wprowadzenie

Betulina jest jedną z pierwszych substancji naturalnych wyizolowanych z roślin. Wyosobnił ją przypadkowo w 1788 r. Lowitz z kory brzozy brodawkowej *Betula verrucosa* Ehrh.

W klasyfikacji chemicznej betulina należy do triterpenów — jednej z najliczniejszych grup substancji w przyrodzie. Skomplikowany szkielet węglowodorowy tej cząsteczki ma budowę zbliżoną do steroidów. Biogeneza tych dwóch grup jest zbieżna, aż do syntezy 2,3-epoksykwalenu, co dodatkowo podkreśla ich podobieństwo.

W XIX i na początku XX w. prowadzone były bardzo liczne prace nad budową i właściwościami chemicznymi betuliny, które zaowocowały szeregiem aktualnych do dziś publikacji. Ustalony został wzór strukturalny betuliny i zsyntetyzowanych kilkanaście pochodnych, które pomimo braku wówczas wysoce wyspecjalizowanych metod instrumentalnych, jak np. magnetyczny rezonans jądrowy czy spektrometria mas, szczegółowo scharakteryzowano pod względem fizykochemicznym.

Odkrycie w 1995 r. przez *E. Pisha i wsp.* zdolności selektywnego indukowania samobójczej śmierci komórek nowotworowych przez kwas betulinowy oraz niskiej toksyczności (lub jej braku) dla komórek prawidłowych, wywołało zwiększone zainteresowanie triterpenami typu lupanu.

Betulina różni się od kwasu betulinowego tylko jednym ugrupowaniem chemicznym, tj. grupą hydroksymetylenową występującą przy C17 zamiast karboksylowej.

Kwas betulinowy jest składnikiem kory platanów (*Platanus acerifolia*), gdzie występuje w ilości ok. 3%.

Dostępność betuliny jest większa, gdyż może stanowić do 25% zawartości zewnętrznej warstwy kory brzozy. Dlatego też opracowywane są stale metody półsyntezy kwasu betulinowego z betuliny.

W piśmiennictwie pojawia się coraz więcej publikacji prezentujących właściwości farmakologiczne pochodnych betuliny. Triterpen ten jak również jego półsyntetyczne pochodne, posiadają szereg specyficznych właściwości, wśród których najczęściej wymienia się działanie toksyczne na linie komórek nowotworowych, działanie przeciwzapalne, przeciwwirusowe i przeciwmalaryczne. W związku z tym, przemysł farmaceutyczny i kosmetyczny wykazuje coraz większe zainteresowanie betuliną.

Podjęcie badań opisywanych w niniejszej pracy, podyktowane było nie tylko przesłankami pragmatycznymi — potencjalnym zastosowaniem betuliny jako leku lub kosmetyku — ale również impulsem natury czysto poznawczej.

Niezwykła struktura cząsteczkowa tego triterpenu z jej nieco nietypowym zachowaniem w niektórych reakcjach chemicznych zachęciły do podjęcia wyzwania. . .

Rozdział 2

Biogeneza triterpenów

Triterpeny są grupą związków należącą do jednej z najliczniejszych klas substancji naturalnych — terpenoidów — związków, w których budowie można wyróżnić tzw. „jednostki izoprenowe”. Izopren, czyli 2-metylo-1,3-butadien, jest elementem wspólnym wszystkich terpenoidów. Może on pochodzić z dwu szlaków metabolicznych: mewalonianu lub 5-fosforanu 1-deoksy-D-ksylulozy [164].

Podział terpenoidów jest obecnie dokonywany ze względu na liczbę jednostek izoprenowych w cząsteczce. Jedna jednostka izoprenu jest prekursorem hemiterpenów (C_5). Kondensacja dwu cząsteczek aktywnego izoprenu — pirofosforanu izopentenylu — daje monoterpeny (C_{10}). Analogicznie powstają seskwiterypeny (C_{15}), diterpeny (C_{20}) i politerpeny (polipreny, np. kauczuk naturalny). Triterpeny i tetraterpeny tworzone są nieco inaczej. Redukcyjna kondensacja dwu jednostek FPP — pirofosforanu farnezyli (C_{15}) — prowadzi do powstania skwalenu, który jest prekursorem triterpenów. Tetraterpeny powstają natomiast z 16-*trans*-fitoenu, który syntetyzowany jest w reakcji kondensacji dwu cząsteczek pirofosforanu geranylogeranyli (GPP, C_{20}) [128].

Triterpenoidy stanowią obszerną i strukturalnie zróżnicowaną grupę substancji naturalnych wywodzących się ze skwalenu lub pokrewnych acyklicznych trzydziestowęglowych prekursorów — skwalenu i bis-epoksuskwalenu [148].

Triterpenoidami nazywa się sterole, steroidy¹ i saponiny. Triterpenoidy posiadają ponad 100 różnorodnych szkieletów węglowych.

Większość triterpenoidów to związki: 6–6–6–5 czteropierścieniowe (tetracykliczne), i 6–6–6–6–5 oraz 6–6–6–6–6 pięciopierścieniowe (pentacykliczne). Znane są ponadto triterpeny acykliczne, jedno-, dwu- i trójpierścieniowe [29].

Pierwsze badania biosyntezy terpenoidów przeprowadził w 1910 roku Wallach, formułując tzw. „regułę izoprenową” zakładającą, że większość terpenoidów może hipotetycznie powstawać przez dołączanie kolejnych jednostek izoprenowych [128]. W latach 50-tych *von Ružička i wsp.*, udoskonalili tę koncepcję, przedstawiając tzw. „biogenetyczną regułę izoprenową”, która umożliwiała wyjaśnienie biosyntezy każdego szkieletu terpenowego w oparciu o rozważania mechanistyczne: addycji elektrofilowej, cyklizacji i różnych przegrupowań [128]. Reguła ta jest ciągle udoskonalana, lecz jej główne założenia dotychczas nie uległy zmianie. Jako ogólny mechanizm przyjęto, że *all-trans* skwaleń lub epoksuskwaleń są aktywowane przez atak kationu. Kaskada cyklizacji kation–olefina generuje następnie

¹W 1936 r. Callow i Young zaproponowali, aby steroidami nazywać sterole chemicznie pokrewne cholesterolu.

cykliczny karbokation, który może ulec przegrupowaniu i dalszej cyklizacji. Przesunięcia antyperiplanarne zakończone przez utratę protonu dają obojętne² produkty [219].

Enzymy katalizujące te reakcje nazywane są syntazami triterpenowymi i dzieli się je na:

- cyklazy skwalenu (ang.: SC),
- cyklazy epoksuskwalenu (ang.: OSC),

wytwarzające odpowiednio triterpeny i alkohole triterpenowe³ [219].

Aktywność cyklazy epoksuskwalenu poprzedza działanie epoksydazy (monooksydazy) skwalenu (SQE). Rośliny posiadają liczne geny kodujące ten enzym jak i cyklazy [148].

Skwalen lub epoksuskwalen po protonacji ulegają reakcji cyklizacji katalizowanej przez odpowiedni enzym. Rozważania modelowania molekularnego przewidują, że reakcja cyklizacji skwalenu jest silnie egzotermiczna. Energia reakcji wynosi -200 kJ/mol. Ma to swoje potwierdzenie w budowie enzymu — w cyklazie skwalen-hopen (SHC) stwierdzono obecność charakterystycznych sekwencji QW, służących do odprowadzania energii termicznej reakcji. Ponadto liczba obrotów enzymu (ang.: turnover) jest niska, co pozwala na skuteczną dyssypację ciepła [213].

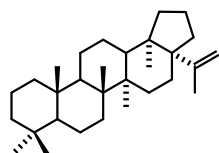
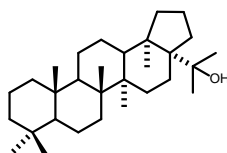
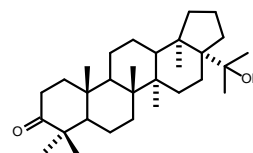
Epoksuskwalen jest stabilny w środowisku obojętnym, a w lodowatym kwasie octowym jest trwały przez ok. jeden dzień. Do rozpoczynającej cyklizację aktywacji mostka epoksydowego potrzebny jest silniejszy kwas Brønsteda — np. trifluorooctowy [212]. W cyklazie epoksuskwalenu wyizolowanej z *Saccharomyces cerevisiae* za prawidłowe funkcjonowanie enzymu odpowiedzialna jest tylko jedna reszta kwasu asparaginowego (D456), a w centrum aktywnym oczyszczonego funkcjonalnego enzymu nie ma metali będących kwasami Lewisa [212]. Przypuszcza się zatem, że za szybką reakcję cyklizacji odpowiada prefałdowanie substratu i bliskie ułożenie donora protonu do tlenu epoksydowego; proces protonacji i tworzenia pierścienia A są ze sobą sprzężone (jednoczesne)⁴ [212].

W biogenezie triterpenoidów wyróżnia się trzy podstawowe karbokationy, tworzone w różnych ścieżkach biosyntetycznych:

- kation deoksydammarenylu **1** powstający ze skwalenu,
- kation protosterylu **2** powstający z epoksuskwalenu oraz
- kation dammarenylu **3** powstający z epoksuskwalenu (schemat 1).

Karbokationy te ulegając później różnym przekształceniom dają całe bogactwo związków triterpenowych.

Hopanoidy występują w błonach lipidowych wszystkich bakterii, najczęściej z dobudowanym do szkieletu triterpenowego fragmentem hydrofilowym; pełnią rolę podobną do cholesterolu u innych organizmów. Najpowszechniej występujące hopanoidy to: diplopten (hopen) **9** i 22-diplopterol (22-hydroksyhopan) **10**. U roślin wyższych hopanoidy mają funkcję tlenową⁵ przy C-3, jak np. hopanon **11** z żywicy dammar z rodzaju *Hopea* [88].

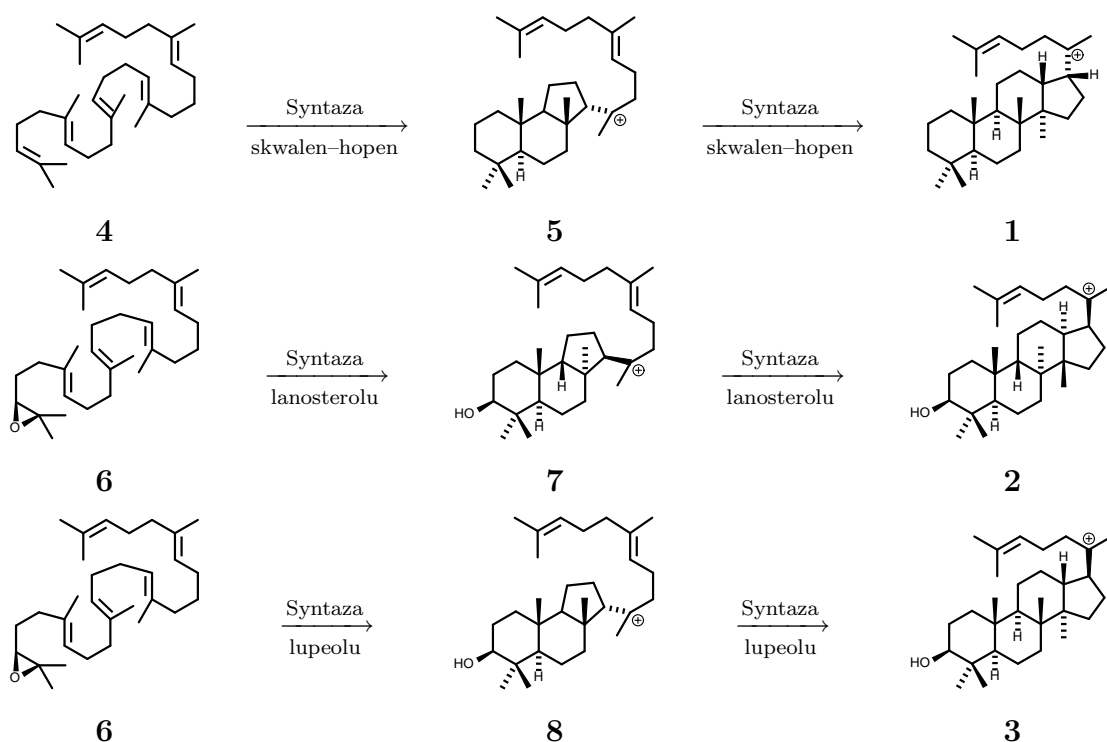
**9****10****11**

²W sensie ładunku elektrycznego.

³Nie można wykluczyć powstawania alkoholi triterpenowych w wyniku utleniania przy C-3 pochodnych cyklazy skwalenowej.

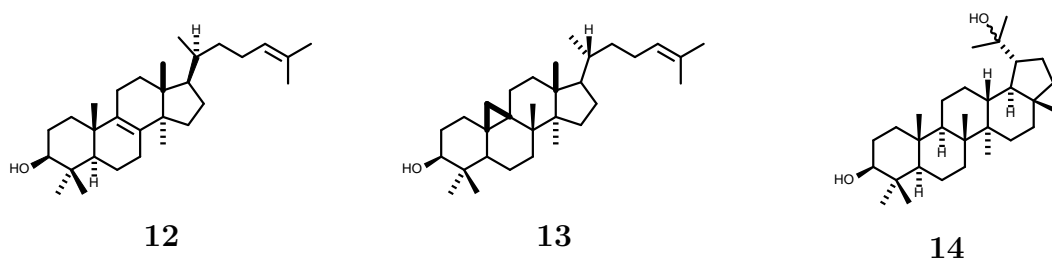
⁴Ang.: concerted.

⁵Prekursorem jest przypuszczalnie epoksuskwalen a nie skwalen.



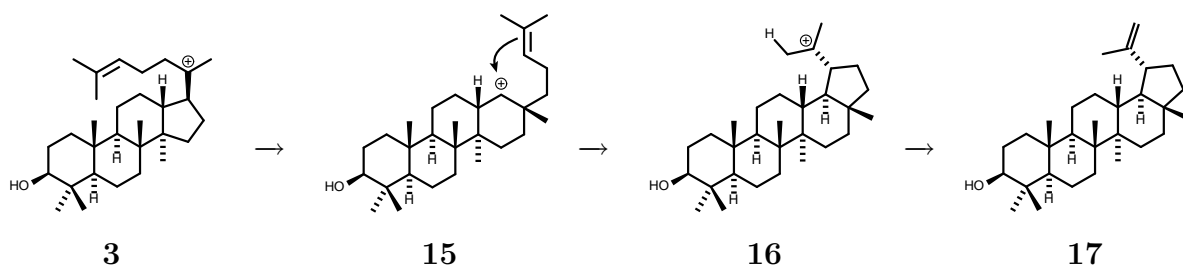
Schemat 1: Trzy podstawowe ścieżki biosyntezy triterpenoidów.

Z kationu protosterylu w przesunięciu 1,2 powstaje kation lanosterylu. Deprotonacja tego karbokationu przez odpowiednie cyklazy epoksykswalenu daje produkty będące prekursorami związków steroidowych. Syntaza lanosterylu (LAS) katalizuje cyklizację epoksykswalenu do lanosterolu **12** — prekursora steroli zwierzęcych; w Królestwie Roślin syntazy cykloartenyłu przeprowadzają syntezy cykloartenolu **13**, z którego później powstają inne sterole roślinne (tzw. fitosterole) i brassinoidy [219].



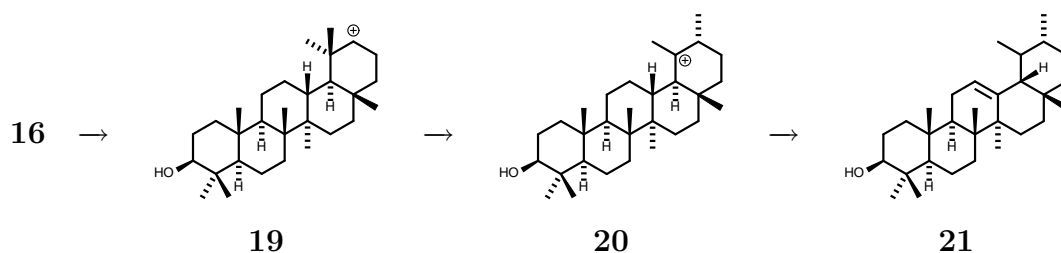
Większość z szeroko rozpowszechnionych alkoholi triterpenowych w roślinach, jak np. lupeol i β -amyryna, wywodzi się z kationu dammarenylu **3**. Migracja C16 powoduje powiększenie pierścienia D, generując kation bakkarenylu **15** (schemat: 2). Po 18 β -cyklizacji pierścienia E powstaje kation lupyłu (lupenyłu) **16**. Ostatecznie odszczepienie protonu od tego kationu — o ile nie zachodzi dalsze przegrupowanie — prowadzi do powstania lupeolu **17** [219].

Terminacja karbokationu zachodzi nie tylko w wyniku odszczepienia protonu, ale może również następować wskutek formalnego przyłączenia grupy hydroksylowej. Syntaza lupeolu z *Arabidopsis thaliana* wytwarza znaczne ilości 3,20-dihydroksylupanu **14** przez przyłączenie hydroksylu do kationu lupyłu **16** [37].

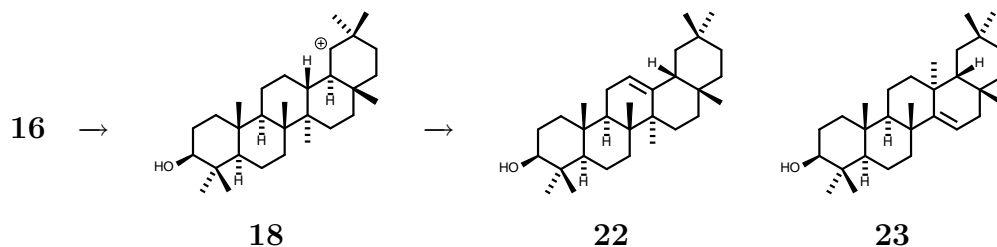


Schemat 2: Biosynteza lupeolu.

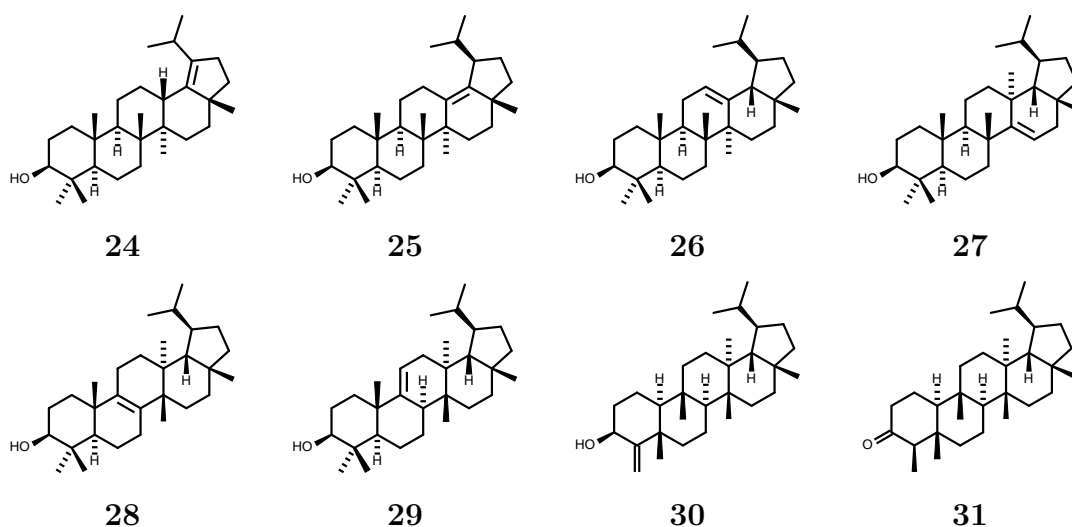
Przegrupowanie kationu lupylu **16** związane z powiększeniem pierścienia E może przebiegać poprzez migrację C21 dając kation germanicylu **18** lub C18 z utworzeniem drugorzędowego kationu **19** przegrupowującego się w przesunięciu 1,2 do kationu izoursylu **20**. Jest on prekursorem triterpenów typu α -amyryny **21**.

Schemat 3: Powstawanie α -amyryny **21**

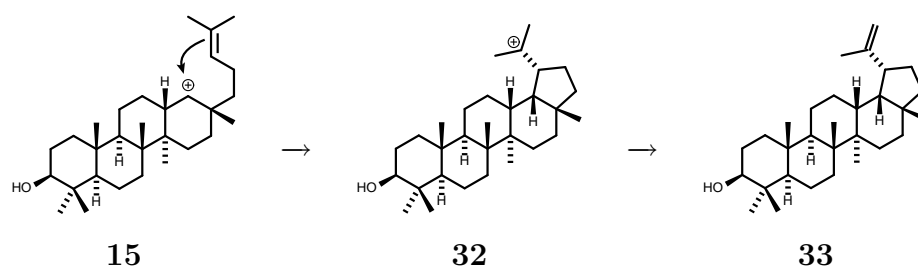
Powszechnie występujące w świecie roślin triterpeny typu oleananu jak: β -amyryna **22**, δ -amyryna, tarakserol **23** i in., powstają w wyniku przesunięć 1,2 i deprotonacji z kationu germanicylu (schemat 4) [219, 224].

Schemat 4: Powstawanie β -amyryny **22** i tarakserolu **23**

Znanych jest kilka izomerów lupeolu, powstających wskutek zachodzących przed deprotonacją przesunięć 1,2 w obrębie kationu lupylu — są to: 18-lupen-3-ol **24**, 13(18)-lupen-3-ol **25**, neolupenol **26**, tarolupeol **27**, tylolupenol A **28**, tylolupenol B **29**, cymbopogonol **30** i cymbopogonon **31** [219].

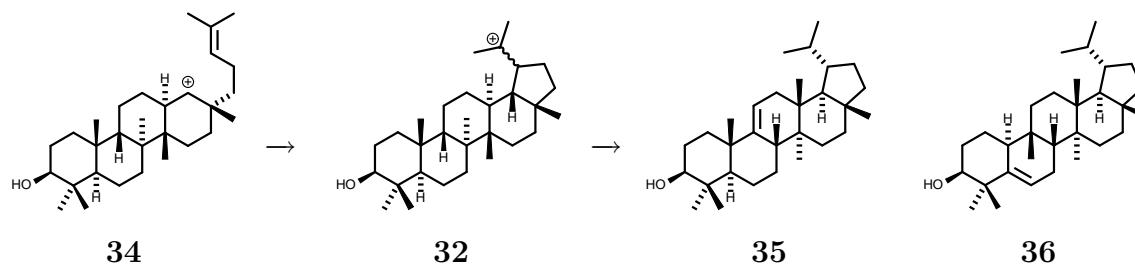


Jeszcze inne produkty powstają gdy cyklizacja pierścienia E kationu bakkarenylu **15** zajdzie od strony 18α (sch. 5). Powstaje wówczas kation **32**. Jego bezpośrednia deprotonacja daje nepehinol **33** o konfiguracji pierścieni C-C-C-B-C, który jest C18 epimerem lupeolu. Nepehinol występuje np. w kocimiętce [219].



Schemat 5: Powstawanie C-18 epimeru lupeolu — nepehinolu **33**

Inne izomery lupeolu z konfiguracją pierścieni C-B-C-C-C wywodzą się z kationu protostrylu (sch. 6). Kation ten po powiększeniu pierścienia D w wyniku migracji C16 tworzy kation **34** izomeryczny przy C-13 i C-14 do **15**. W trakcie tworzenia pierścienia E w cyklizacji 18α przechodzi w kation **32**. Przesunięcia 1,2 z następczą deprotonacją daje: hankolupenol **35** i hankokinol **36** (triterpeny te występują w *Cynanchum hancokianum*) [219].



Schemat 6: Powstawanie hankolupenolu i hankokinolu

Dotychczas wyizolowano i scharakteryzowano 32 roślinne cyklazy epoksyzkwalenu. Siędem z nich to enzymy wielofunkcyjne, tj. katalizujące syntezę różnych triterpenów [148].

Budowa i mechanizm działania tych enzymów mogą się różnić, aczkolwiek geny kodujące te białka są konserwatywne, co widoczne jest w dużym stopniu podobieństwa u różnych gatunków. Istnieją co najmniej dwa typy syntazy lupeolu, które różnią się nie tylko składem aminokwasów, ale i mechanizmem deprotonacji kationu lupenyli. Klonowanie i ekspresja wyizolowanych cDNA kodujących syntazy triterpenowe z: *Olea europaea* (OEW), *Taraxacum officinale* (TRW) i *Arabidopsis thaliana* (LUP1) pozwoliły na porównanie ich sekwencji aminokwasowych [110,176].

OEW i TRW wykazują 58% podobieństwa z LUP1, a ten gen 70,2% do syntazy β -amyryny PNY (z *Panax ginseng*). Jednocześnie OEW i TRW wykazują 63,7% i 63,6% podobieństwa do PNY [110,176].

W eksperymentach ze znakowanym izotopowo węglem⁶ wykazano, że syntaza LUP1 katalizuje odszczepienie protonu zarówno od grupy metylowej C-29 jak i C-30. Stosunek znakowanych izomerów wynosi 1 : 1, natomiast OEW i TRW odszczepiają wyłącznie proton od C-29 [109].

Większy stopień podobieństwa LUP1 do syntazy β -amyryny i obecność pośród produktów tego enzymu obok lupeolu niewielkich ilości m.in. β -amyryny sugeruje, że enzym ten ewolucyjnie znajduje się pomiędzy typami syntaz OEW i TRW a syntazą β -amyryny [109].

Dotychczas nie wyizolowano enzymów odpowiedzialnych za syntezę betuliny. Ten diol typu lupanu powstaje najprawdopodobniej w wyniku utleniania grupy metylowej lupeolu przy węglu C-17 przez cytochrom P450 [110]. Co ciekawe w młodych gałązkach brzozy występują inne triterpeny, a nie ma pochodnych typu lupanu [194].

Nie przeprowadzono dotychczas syntezy totalnej kwasu betulinowego ani betuliny. Na podstawie analizy retrosyntetycznej podjęto próby wytworzenia układu pierścieni typu lupanu. Ze względu na silne oddziaływania grup metylowych na olefiny i liczne oddziaływania 1,3-diaksjalne, nie zakończyły się one powodzeniem, prowadząc najczęściej do utworzenia pentacyklicznego szkieletu złożonego z sześciu pierścieni cykloheksanowych [84].

⁶Dodatek [1,2-¹³C₂] octanu do pożywki drożdży z wbudowanym odpowiednim cDNA.

Rozdział 3

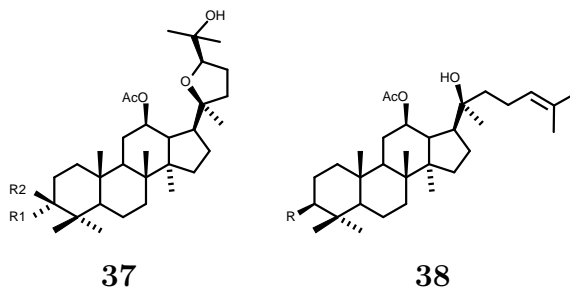
Wybrane składniki kory brzozej

Brzoza od wieków była wykorzystywana jako źródło różnych surowców medycznych, z których dzisiaj w Polsce¹ wykorzystuje się liście, sok. Do niedawna jeszcze stosowany był dziegieć brzozowy (*Betulae oleum*) jako *desinficiens* [104].

W czasach prehistorycznych jednym z zastosowań dziegiu było sporządzanie trwałego kleju [113, 175].

Analiza lepiszcza z Grand Aunay (Francja) datowanego na III–I w.p.n.e, którego głównym składnikiem był również dziegieć brzozowy, wykazała obecność: betuliny, lupeolu, produktu dehydratacji betuliny — lupa-2,20(29)-dien-28-olu, oraz niewielkich ilości innych triterpenów: węglowodoru C₃₀H₄₈, allobetul-2-enu, lupenonu, betulonu, i allobetuliny [12].

Eterowy (eter dietylowy) ekstrakt żywicy z kory młodych brzoź *Betula pendula* zawiera kilka związków triterpenowych typu dammaranu: kwas papyriferyowy (3 α -O-malonylo-12 β -O-acetylo-25-hydroksy-(20S,24R)-epoksydammaran **37**, R1=OCOCH₂COOH, R2=H) i występujący w podobnych ilościach jego 3 β -epimer: kwas 3-epi-papyriferyowy (**37** R1=H, R2=OCOCH₂COOH), oraz związek z otwartym pierścieniem heterocyklicznym i zredukowanym łańcuchem bocznym — kwas pendulowy (3 β -O-malonylo-12 β -O-acetylo-20(S)-hydroksydammar-24-en **38** R=OCOCH₂COOH) [195]. Nie są wymieniane triterpeny innych typów w tym lupanu jako składniki kory młodych drzewek. Prawdopodobnie betulina jest wytwarzana w późniejszych etapach wzrostu brzozy, co uzewnętrznia się zmianą zabarwienia kory z koloru brązowego na biały.



Huba stosowana w medycynie ludowej do leczenia nowotworów — porek brzozowy *Piptoporus betulinus* (rodzina żagwiowate) — jest jednorocznym grzybem, występującym

¹W krajach skandynawskich i niektórych regionach Rosji stosuje się pączki brzozy karelskiej w schorzeniach górnych dróg oddechowych, jak np. przeziębienia.

pospolicie w Polsce. Pojawia się szczególnie jesienią na martwych pniach i gałęziach brzoź. Zawiera m. in. związki triterpenowe — kwasy poliporenowe A, B i C.

Ekstrakt eterowy tej huby wykazuje działanie hamujące na linie komórkowe ludzkich nowotworów FTC238 (rak tarczycy), SK-N-AS (nerwiak niedojrzały), T47D (rak piersi), Hep-2 (rak krtani) i HeLa (rak szyjki macicy) z EC50 1–10 $\mu\text{g/ml}$ [86].

Fracja triterpenowa ekstraktu kory brzozy brodawkowatej *Betula verrucosa* stanowi 21–40% masy suchej kory. Głównym triterpenem ekstraktu obok betuliny stanowiącej 167–340 g/kg suchej kory jest lupeol — 20 g/kg. Aldehyd i kwas betulinowy oraz jego ester metylowy stanowią łącznie 17 g/kg. Skład frakcji triterpenowej po hydrolizie alkalicznej (0,5 M KOH w etanolu) przedstawia tabela 3.1 [40].

Tabela 3.1: Przeciętny skład hydrolizatu alkalicznego frakcji triterpenowej ekstraktu kory brzozy brodawkowatej *Betula verrucosa*

triterpen	zakres stężeń [%]	przeciętnie [%]
betulina	55,5–84,1	78,1
lupeol	2,6–14,2	7,9
kwas betulinowy i jego ester metylowy	2,0–13,4	4,3
aldehyd betulinowy	0–2,2	1,2
kwas oleanolowy i jego ester metylowy	0,5–9,7	2,0
erytrodiol	0,5–21,4	2,8
inne	1,9–4,9	3,7

W skład innych triterpenów wchodzi: lupan-3- β ,20-diol (monogynol A), lupan-3 β ,20,28-triol, β -amyryna, lup-20(29)-en-3-on i ślady aldehydu oleanolowego [40].

W korze, obok frakcji triterpenowej, obecna jest duża ilość długołańcuchowych kwasów jedno- i dwu-karboksylowych, tzw. suberyny stanowiącej 29,9–36,3% masy ekstraktu. Skład frakcji suberynowej po hydrolizie alkalicznej (0,5 M KOH w etanolu) przedstawia tabela 3.2.

Tabela 3.2: Przeciętny skład suberyny kory brzozy brodawkowatej *Betula verrucosa*, po hydrolizie alkalicznej

kwas	zakres stężeń [%]	przeciętnie [%]
9,10-epoksy-18-hydroksyoktadekanowy	29,2–43,2	37,9
18-hydroksyoktadeka-9-enowy	6,0–17,1	10,8
9,10,18-trihydroksyoktadekanowy	6,3–11,4	7,8
22-hydroksydokozaowy	11,7–17,4	14,7
dokoza-1,22-diowy	3,6–7,4	6,5
20-hydroksyeikozanowy	2,3–4,4	2,5
9,16 i 10,16-dihydroksyheksadekanowy	2,3–6,2	3,1
oktadeka-1,18-diowy	0,5–1,5	0,9
oktadeka-9-en-1,18-diowy	2,1–3,9	3,7
inne	9,5–14,7	12,1

Betulina jest również głównym składnikiem ekstraktu zewnętrznej warstwy kory brzoź rosnących w Ameryce Północnej jak: *Betula papyrifera*, *B. populifolia* Marsh. (brzoza szara), *B. cordifolia* Regel. (górska brzoza biała) i *B. caerulea* Blanch. (brzoza niebieska). W gatunkach tych kora zawiera 8–25% triterpenoidów. Betulina stanowi 6–22% masy zewnętrznej warstwy kory; 75–80% frakcji triterpenowej, natomiast lupeol 8–10% — 0,2–2% kory [28].

Fracja triterpenowa brzozy czarnej (*B. lenta*) zawiera głównie lupeol (ok. 60%), betulinę (35%), lupenon (1%) oraz niewielkie ilości lup-20(29)-en-3-on-28-olu (betulonu), kwasu betulinowego, 3-kawoilo-betuliny (estru z kwasem kawowym), lup-20(29)-en-3 β ,30-diolu, lup-20(29)-en-3 β -ol-30-alu, lup-20(29)-en-3 β ,28-diol-30-alu, lupan-3 β ,20-diolu. Nie są obecne żadne pochodne oleananu [28].

Triterpeny kory brzozy *Betula papyrifera* obok betuliny i lupeolu to: lupenon, erytrodiol, β -amyryna, sitosterol i betulinian metylu [145].

Rzadko występująca w Polsce *Betula maximowicziana* Regal, w zewnętrznej warstwie kory zawiera: betulinę, 3-O-kawoilo-betulinę, lupeol, lupan-3 β ,20,28-triol i jego 3-O-kawoilo-pochodną oraz octan kwasu oleanolowego. Wewnętrzna warstwa kory zawiera m.in. acerogeninę E, 16-hydroksy-17-O-metyloacerogeninę E, β -D-glukopiranozyd alnusdiolu, 7-O- β -D-ksylopiranozyd(+)-katechiny, monogynol A, i inne. W korze korzeni nie występują pochodne typu lupanu ale pochodne dammaranu (estry z kwasem kawowym) i kwas 3-O-kawoilo-oleanolowy [51].

Zewnętrzna warstwa kory brzoź, bardzo bogata w betulinę, w nieznanym stopniu podlega przemianom dopiero po długim czasie [49].

Rozdział 4

Mechanizm działania apoptotycznego triterpenów typu lupanu

Spośród triterpenów pentacyklicznych kwas betulinowy, jako jeden z pierwszych, został uznany za czynnik indukujący apoptozę w komórkach nowotworowych [150].

Początkowo udowodniono, że działa specyficznie na czerniaka [150], jednak dalsze badania wykazały jego aktywność proapoptotyczną na innych liniach komórkowych neuroektodermalnych jak: nerwiak niedojrzały, rdzeniak, mięsak Ewinga [55, 56, 58], czy liniach białaczek [39].

Obok komórek czerniaka (A-378) w komórkach nowotworowych pochodzenia neuroektodermalnego: nerwiaka niedojrzałego (SHEP), rdzeniaka (Daoy) i mięsaka Ewinga (A17/95), kwas betulinowy w dawce 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, po 72 h indukuje apoptozę niezależną od receptora CD95 (APO-1/Fas), co wykazano w badaniu FACS jąder komórkowych wybarwionych jodkiem propidiovym. Jednocześnie przy tej samej dawce i czasie, nie wywołuje apoptozy w komórkach nabłonkowych: nowotwora piersi (MCF-7), jelita grubego (HT-29), drobno-komórkowego nowotwora płuc (H-146), raka nerki (KCTCL-26) i białaczki T-komórkowej T (CEM). Wartości EC_{50} wynoszą w tych liniach ponad 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [55].

W przypadku linii białaczki komórek T JURKAT, kwas betulinowy indukuje szybką apoptozę, zależną od dawki i czasu. Przy stężeniu 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ po 6 h uśmierca 75% komórek. Uruchamia również *program śmierci* w liniach białaczek SKW6, HUT 78, CEM, komórek B: BJAB, NALM6 i BOE, i komórek mielocytów HL-60. Pod wpływem triterpenu eksponują one na zewnętrznej powierzchni fosfatydyloserynę, po czym następuje wzrost piku sub-G1 sfragmentowanego DNA [39].

Translokacja fosfatydyloseryny z wewnętrznej do zewnętrznej części błony komórkowej stanowi jedną z cech charakterystycznych apoptozy. Komórki eksponujące ten fosfolipid rozpoznawane i usuwane są przez cytotoksyczne komórki T [161]. W komórkach linii raka okrężnicy Colo-205 i raka piersi SKBR3, 50 μM lub 40 μM kwas betulinowy powoduje translokację już po 6 h od podania, co stwierdzono za pomocą barwnika PSS-380, a inne cechy zaawansowanej apoptozy — uszkodzenie błony jądrowej (wiązananie PI) i fragmentacja DNA — widoczne są dopiero po upływie 24 h [15].

W zawiesinie komórek nerwiaka niedojrzałego pobranych *ex vivo* po resekcji od pacjenta przed chemioterapią, kwas betulinowy w dawce 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, po 18 h wywołuje odpowiedź apoptotyczną w 40%. Przy dawce 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 70% oraz 100% przy 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [55].

Podobnie następuje indukowanie apoptozy w pierwotnych liniach nowotworowych rdzeniaka ludzkiego z EC_{50} 3–13.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4 linie), i w 20 z 24 badanych pierwotnych liniach

glejaków z EC_{50} 5–10 $\mu\text{g/ml}$ [56].

Uruchomienie programu śmierci w komórce przez kwas betulinowy jest zależne od aktywacji kaspaz. Dodanie inhibitora aktywacji kaspaz zVAD-fmk (60 μM), blokuje ich rozszczepianie i praktycznie całkowicie znosi apoptotyczne działanie kwasu betulinowego (10 $\mu\text{g/ml}$) na linii nerwiaka niedojrzałego (SHEP) [55]. Kwas betulinowy indukuje aktywację kaspazy-8 (FLICE/MACH) przez rozszczepienie jej do aktywnych podjednostek p18, a ponadto proteolityczną aktywację kaspazy-3 (CPP32/YAMA/Apopain) i PARP (PARP do p85) [55]. Podobnie dodanie 50 μM zVAD-fmk blokuje apoptozę w liniach rdzeniaków ludzkich: Daoy, D283 i MEB1 oraz glejaków: A172, U118, U138, indukowaną 10 $\mu\text{g/ml}$ kwasu betulinowego [56]. Badanie za pomocą Western-blot ze specyficznymi przeciwciałami, potwierdza, że triterpen, pod nieobecność inhibitora, powoduje w tych liniach aktywację kaspazy-8 (wzrost poziomu p18), kaspazy-3 (wzrost p17) i PARP (wzrost p85) oraz zwiększenie poziomu białek p43 i p41 [56].

Aktywacja kaspazy-3 wydaje się warunkiem koniecznym dla toksyczności kwasu betulinowego, gdyż podanie inhibitora enzymów kaspazo-3-podobnych — DEVD-CHO (pseudosubstratu) — znacząco znosi jego działanie apoptogenne w komórkach linii glejaków LN-18 i LN-229 [216].

W trakcie inkubacji komórek nerwiaka niedojrzałego (SHEP) z kwasem betulinowym w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$, już po 12 h od podania zwiększona jest 4-krotnie aktywność kaspaz z maksimum po 18 h i 4,5-krotnym wzrostem aktywności. Jednak triterpen podany w małych stężeniach nie wywołuje aktywacji kaspaz — przy 1 $\mu\text{g/ml}$ zachowany jest poziom podstawowy kaspaz, a przy dawce 5 $\mu\text{g/ml}$ — minimalnie podniesiony) [55].

Proces apoptozy indukowanej kwasem betulinowym (8 $\mu\text{g/ml}$) w komórkach linii ludzkiego czerniaka UISO-Mel-1, pochodzącej z węzła chłonnego nowotwora metastatycznego, przebiega bez aktywacji kaspaz: 3, 8 i 9. Świadczą o tym eksperymenty Western blot oraz brak wpływu z-VAD na proces apoptozy. Aktywność kaspazy-3, oznaczana dodatkowo w eksperymencie z substratem tego enzymu: acetylo-Asp-Glu-Val-Asp-amino-4-metylokumaryną (200 μM). Brak uwolnionej amino-4-metylokumaryny świadczy o nieobecności kaspazy-3 [197]. Inaczej dla komórek pierwotnej linii komórkowej ludzkiej białaczki komórki T JURKAT oprócz aktywacji kaspaz: 3, 8 i 9, rozszczepieniu ulega Bid (nie XIAP). Nieodwracalny inhibitor kaspaz — z-VAD-fmk oraz odwracalny kaspazy-9 zLEHD — redukują odpowiedź apoptotyczną wywołaną kwasem betulinowym o ponad 65%. Natomiast mutacja powodująca brak aktywności kaspazy-8 nie ma żadnego wpływu na apoptozę w tej linii [39].

Kwas betulinowy wywołuje dawkozależną apoptozę komórek linii nowotwora języka¹ SCC25 i SCC9, z ok. pięciokrotnym spadkiem liczności komórek po 72 h, przy stężeniu 8 $\mu\text{g/ml}$. Typowym morfologicznie dla apoptozy zjawiskom — obkurczaniu komórek z tworzeniem ciałek apoptotycznych i fragmentacji jądra (barwienie fluorochromem Hoechst 33258) — towarzyszy aktywacja kaspaz, odpowiednio 6- i 3-krotna. Widoczne jest to we wzroście poziomu proteolitycznie uwalnianych białek filamentu pośredniego. W komórkach epitelialnych jednym z takich białek jest cytokeratyna filamentowa CK 18 (ang.: filament cytokeratine). Domena C-końcowa tego białka eksponuje neo-epitop, który jest rozpoznawany przez odpowiednie przeciwciała (M30-Apoptosense; ozn. fluorescencyjne ELISA). Obecność białka CK 18 po 48 h w obu liniach komórkowych traktowanych kwasem betulinowym (8 $\mu\text{g/ml}$) świadczy o obecności w cytosolu aktywnych kaspaz [200]

¹Należy on do tzw. nowotworów nabłonkowych głowy i szyi — HNSCC (ang. head and neck squamous carcinoma).

W komórkach nerwiaka niedojrzałego (SHEP) aktywacja kaspazy-8 (FLICE) jest w przypadku kwasu betulinowego niezależna od uruchomienia receptora CD95 — w odróżnieniu od doksorubicyny, nie nasila on ekspresji receptora CD95 ani jego liganda CD95-L, co wykazano za pomocą RT-PCR [58]. Również zablokowanie tego receptora przeciwciałami F(ab)₂ anty-APO-1 (anty-CD-95), blokującymi autokrynną/parakrynną śmierć komórek T oraz apoptozę indukowaną lekami, nie ma hamującego wpływu na działanie kwasu betulinowego. Zatem apoptoza indukowana przez ten triterpen, w odróżnieniu od typowych chemioterapeutyków doksorubicyny, cisplatyny i VP-16, pomija szlak aktywacji systemu CD95 [55].

Niezależność od receptora śmierci CD95 stwierdzono także na sublinii komórek glejaka ludzkiego (LN-18), które nabyły odporność na CD95L, APO2L i TNF — identycznie jak komórki macierzyste — pozostają wrażliwe na działanie kwasu betulinowego z EC₅₀=70 μM (ozn. fioletem krystalicznym) [216].

Pod wpływem doksorubicyny nasiloną ekspresja CD95/CD95-L² i aktywacja kaspazy 8, w komórkach nerwiaka niedojrzałego (SHEP), nie jest hamowana przez antyapoptotyczne białka Bcl-2 ani Bcl-X_L, a w komórkach tych międzymembranowy potencjał mitochondriów ($\Delta\Psi_m$) jest wysoki (w normie). Inaczej w komórkach traktowanych kwasem betulinowym, aktywacja kaspazy-8 jest zależna od poziomu Bcl-2 lub Bcl-X_L i występuje tylko w komórkach, których potencjał mitochondrialny jest niski. Wynika z tego, że aktywacja kaspazy-8 zachodzi jako zdarzenie późniejsze w stosunku do aktywacji mitochondriów — na ścieżce apoptotycznej jest poniżej mitochondriów [55, 58].

Zmutowane komórki ludzkiej białaczki T-komórkowej JURKAT, bez ekspresji RIP, jak i komórki z nadekspresją niefunkcjonalnego FADD, podlegają indukowanej przez kwas betulinowy apoptozie tak jak linia pierwotna [39].

Inny mechanizm działania ma lupeol, który w zakresie stężeń 1–30 μM indukuje apoptozę w linii wrażliwego na androgeny, ludzkiego nowotwora prostaty LNCaP (EC₅₀ *vide* tab. 4.1), poprzez nasilanie ekspresji receptora Fas i jego białka adaptorowego FADD (białko związane z Fas), przy czym poziom innych receptorów : DR-3, DR-5, TRADD i ligandów śmierci: Fas-L, Tweak, TRAIL, pozostaje stały. W połączeniu z anti-Fas mAb, działającym jak Fas-l — agonistycznie na receptory śmierci Fas — lupeol wykazuje superaddytywne hamowanie rozwoju komórek nowotworowych Fas-pozytywnych linii LNCaP, z superaddytywną w porównaniu do samego przeciwciała i samego tritepenu, nadekspresją receptora Fas. Toksyczne działanie lupeolu poprzez receptor Fas potwierdzony jest w badaniu, w którym wrażliwość komórek linii z wyciszoną (ang.: silenced) ekspresją Fas na triterpen jest mniejsza. Również komórki linii PC-3 i DU-145, wykazujące niską ekspresją Fas, są niewrażliwe na lupeol (1–30 μM, 48 h) [167].

Lupeol nie wpływa na poziom ekspresji Bcl-2 i Bax. Wykazano natomiast, że aktywuje kaspazy: 6, 8 i 9, nie zmniejszając poziomu prokaspazy-3 (brak aktywacji), oraz białka biorące udział w kondensacji i degradacji chromatyny jądrowej: PARP — poli(ADP-rybozo) polimerazę — i białko acinus — apoptotyczny czynnik indukcji kondensacji chromatyny w jądrze [167]. Co ciekawe białko acinus jest aktywowane przez kaspazę-3 i inną nieznaną proteazę [173] — a ten pierwszy enzym nie jest aktywowany w linii LNCaP przez lupeol [167].

Lupeol w sposób zależny od dawki zmniejsza ekspresję PSA i poziom receptora androgenów [167].

²Fas/Fas-l

Lupeol (wyzolowany z kory *Gossampinus malabarica* L. Merr) indukuje apoptozę w linii komórek ludzkich białaczki promielocytarnej HL-60, zależną od dawki i czasu. W stężeniach 50, 75, 100, 125 i 150 μM powoduje wzrost ilości komórek hipodiploidalnych (ozn. PI+FACS) odpowiednio: 13,3, 28,5, 42,0, 61,8 i 70,9%. Jednocześnie w zakresie stężeń 50–200 μM nie powoduje apoptozy normalnych komórek limfocytów, pobranych od zdrowych ochotników [10].

W tej samej linii (HL-60), kwas betulinowy nasila różnicujące działanie $1\alpha,25$ -dihydroksywitaminy D3 (DHD3). W stężeniu 12 μM powoduje po 72 h zmniejszenie populacji do 40% (ozn. MTT) z ok. 10% komórek w fazie sub-G1 (ozn. cytometryczne). Dodanie 1 nM DHD3 wraz z triterpenem zmniejsza liczbę komórek sub-G1 do 2% nie wpływając na przeżywalność komórek [153]. Dodatni wpływ kwasu betulinowego w zakresie stężeń 1–12 μM na różnicujące działanie 1 nM DHD3 potwierdzony został dodatkowo w 72 h teście NBT (nitroblue tetrazolium), z efektem podobnym do wywołanego przez 5 nM DHD3. Jednocześnie w cytometrii przepływowej komórek traktowanych 1 nM DHD3, widoczny jest proporcjonalny do dawki triterpenu wzrost populacji komórek w fazie G1 50–70% i spadek S 25–10% dla stężeń 0–12 μM . W tym zakresie kwas betulinowy indukuje ekspresję CD11b i CD14 — markerów różnicowania monocytów z maksimum 6 μM . Już dla 1 μM ok 10% komórek wykazuje wzrost poziomu tych białek co jest porównywalne z działaniem 1 nM DHD3. Jednak połączenie aktywności 1 nM DHD3 z kwasem betulinowym daje efekt superaddytywny, z maksimum 3–6 μM dla triterpenu. PD 98059 całkowicie hamuje ekspresję CD11b i CD14 indukowaną zarówno przez kwas betulinowy 6 μM lub 1 nM DHD3. Zablokowanie nie jest całkowite w przypadku synergicznego działania obu tych czynników [153]. Świadczyć to może, że indukowane kwasem betulinowym i DHD3 różnicowanie komórek HL-60 może być związane w znaczącym stopniu (ale nie wyłącznie) z MEK1.

W komórkach nerwiaka niedojrzałego (SHEP), kwas betulinowy w dawce 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ już 30 min od podania wywołuje gwałtowny spadek potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$) z maksimum po 1 h, co można stwierdzić za pomocą zaniku fluorescencji kationowego lipofilowego fluorochromu DiOC₆(3). Jednocześnie następuje uwalnianie reaktywnych form tlenu (rft) utleniających wskaźnik HE (hydroetydynę ang.: dihydroethidium) [55]. W komórkach mięsaka Ewinga ESFT dawka 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wywołuje spadek $\Delta\Psi_m$ po 1 h (DiOC₆(3)), skorelowany ze wzrostem rft (HE). Procesy te hamowane są całkowicie przez równoczesne podanie przeciwutleniacza α -DL-tokoferolu (10 mM) [64].

W linii czerniaka ludzkiego UIISO-Mel-1, w dawce 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ powoduje maksimum generowania rft w komórkach po 0,25–1 h od podania. Manifestuje się to nasileniem fluorescencji barwnika DCFH-DA³. Po 4 h poziom reaktywnych form tlenu zaczyna opadać [197].

Dodatek α -DL-tokoferolu, na godzinę przed kwasem betulinowym, powoduje wzrost przeżywalności komórek linii mięsaka Ewing'a (ESFT) SK-N-MC⁴. Traktowane samym triterpenem w stężeniu 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ po 48h wykazują 37 \pm 2.1% przeżywalności. Podanie wit. E 1 h po kwasie betulinowym nie chroni komórek przed jego toksycznym działaniem. Cytoprotekcyjne działanie jest proporcjonalne do stężenia tokoferolu, z plateau przy 10mM i 80,1 \pm 3,4% przeżywalności. Przy tej dawce antyoksydantu nie zaobserwowano spadku potencjału błonowego mitochondriów. Bez tokoferolu kwas betulinowy powoduje znaczny

³Barwnik ten łatwo wnika do komórki, gdzie pod wpływem esteraz ulega przekształceniu do formy „uwięzionej” w komórce. Pod wpływem rft przekształcony zostaje do fluoryzującej formy — 2',7'-dichlorofluoresceiny.

⁴Początkowo klasyfikowane jako nerwiak niedojrzały.

spadek tego potencjału już po jednej godzinie, i coraz bardziej z upływem czasu. Inaczej antyoksydanty hydrofilowe — wit C. i L-NAC — nie przeciwdziałają w istotny sposób indukcji apoptozy przez kwas betulinowy, nawet w stężeniach do 25 mM, a w większych koncentracjach same są cytotoksyczne [64].

Uszkodzenie mitochondriów objawia się w zaniku fluorescencji wskaźnika NAO⁵ pod wpływem utlenionej kardiolipiny⁶, będącej składnikiem wewnętrznej błony mitochondrialnej [55]. Znajdujący się w przestrzeni międzybłonowej cytochrom c jest silnie związany z tym fosfolipidem [137]. Przy obecności kardiolipiny na zewnątrz tej organelli, można się spodziewać, że podobnie jak inne białka mitochondrialne, cytochrom został już uwolniony.

W podobnym eksperymencie kwas betulinowy w dawce 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ powoduje spadek $\Delta\Psi_m$ we wszystkich badanych liniach rdzeniaków: Daoy, D283 i MEB1 oraz glejaków: A172, U118, U138, niewielki już po 6 h, znaczny po 12, z maksimum po 18 h dla wszystkich linii oprócz U118 i U138, gdzie maksimum występuje po 24 h. O specyficznym działaniu kwasu betulinowego na mitochondria świadczy eksperyment w którym dodanie inhibitora wzrostu przepuszczalności mitochondriów (ang. mitochondrial permeability transition) — kwasu bongkrekinowego (50 μM) — prawie całkowicie blokuje spadek potencjału mitochondriów (DiOC₆(3) wysoki) i indukowanie apoptozy oznaczane metodą FACS z jodkiem propidiiowym, we wszystkich tych liniach [56]. Podobnie, mitochondria izolowane z komórek linii białaczek ludzkich: JURKAT, CEM lub SKW6, pod wpływem kwasu betulinowego wydzielają do medium cytochrom c i Smac, już po 30 min a kwas bongkrekinowy hamuje całkowicie ten proces [39].

W komórkach nerwiaka niedojrzałego (SHEP) z nadekspresją antyapoptotycznych białek Bcl-2 lub Bcl-x_L nie następuje indukowana triterpenem aktywacja kaspaz, ani uwalnianie rft z następczymi procesami oksydacyjnymi [55,58]. Fakt ten zdaje się potwierdzać bezpośrednio działanie kwasu betulinowego na mitochondria. W komórkach tych pod wpływem kwasu betulinowego (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) po 12 h znacząco podnosi się poziom proapoptotycznych białek Bax i Bcl-x_L (Bax częściowo już po 6 h). Poziom Bax regulowany jest przez białko p53, którego ekspresja pod wpływem doksorubicyny (w dawce 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), jak i innych środków cytotoksycznych ulega podwyższeniu. Jednak ilość p53 nie zwiększa się w czasie inkubacji komórek z 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kwasu betulinowego, nawet po 36 h. Zatem Bax regulowany jest jeszcze innym mechanizmem; apoptozę powodowaną przez Bax w odpowiedzi na działanie deksametazonu obserwowano również pod nieobecność p53 [55].

Za pomocą analizy Western-blot, wykazano, że poziom ekspresji antyapoptotycznego białka Mcl-1 (homologu Bcl-2), które jest indukowane w komórkach czerniaka ludzkiego, jako odpowiedź na kwas betulinowy (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 48 h), nie zmienia się w liniach komórek linii nowotwora języka (epitelialnych) SCC25 i SCC9. Również poziom Bcl-2 pozostaje niezmienny po 48 h, podczas gdy białko proapoptotycznego Bax zostaje obniżony, proporcjonalnie do dawki triterpenu [200]. Może to być spowodowane odpowiedzią obronną komórek na zastosowanie czynnika proapoptotycznego jakim jest kwas betulinowy — apoptoza jest częściowo hamowana przez komórki. Inaczej w komórkach czerniaka ludzkiego M20, kwas betulinowy (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) silnie indukuje ekspresję Mcl-1 z maksimum po 6–8 h. Efekt ten stwierdza się jeszcze po upływie 48 h. Ekspresja innych białek z rodziny Bcl-2: Bax, Bak, Bad i Bcl-X oraz ich RNA, po 24 h od dodania triterpenu pozostaje niezmienną [175]. Stopień indukcji białka Mcl-1 zależny jest od gęstości komórek: w linii niekonfluentnej

⁵NAO — nonyl acridine orange.

⁶Kardiolipina — bisfosfatydyloglicerol — stanowi ok. 20% lipidów wewnętrznej (wyłącznie) błony mitochondriów.

kwasy betulinowy silniej indukuje ekspresję tego białka niż w linii konfluentnej. Dodatkowo głodzenie komórek zmniejsza poziom Mcl-1, nawet bez podania triterpenu [175].

Dotychczas nie jest znany mechanizm ścieżki transdukcji sygnału, kontrolującej ekspresję Mcl-1 w normalnych ludzkich melanocytach, ani w liniach komórek czerniaka. Wymuszone obniżenie ekspresji Mcl-1 zmniejsza przeżywalność komórek; dodatkowo kwas betulinowy w połączeniu z podaniem antysensownych wobec Mcl-1 oligodeoksynukleotydów w linii czerniaka daje efekt superaddytywny [175].

Dodatek specyficznego inhibitora kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3) — LY294002 — na 1 h przed kwasem betulinowym, przynajmniej częściowo zmniejsza indukcję ekspresji Mcl-1 w 5 różnych liniach czerniaka. Podobnie wortmannina hamuje indukowaną kwasem betulinowym ekspresję Mcl-1. Fosforylacja Akt zachodząca 10–30 min od dodania triterpenu jest również hamowana przez dodatek LY294002. Prawdopodobnie zatem, kwas betulinowy aktywuje kinazę PI3, ta zaś kinazę białkową B (Akt) — protoonkogenną kinazę białkową. Ufosforylowanie Akt, jest dodatkowo pośrednio potwierdzone nasiloną fosforylacją jednego z jego specyficznych substratów — GSK-3 β — kinazy syntetazy glikogenu (ang.: glycogen synthetase kinase). Białko to jest odpowiedzialne za fosforylację dwu białek odgrywających ważną rolę w biologii melanocytów: β -kateniny i czynnika transkrypcji mikroftalmii (ang.: microphthalmia transcription factor MITF). Fosforylacja GSK, jak i indukcja Mcl-1, pod wpływem ufosforylowanego Akt są hamowane przez LY294002. Dodatek kwasu betulinowego częściowo znosi ten efekt [175].

Kwas betulinowy nie powoduje zmiany poziomu ufosforylowania MAPK ani fosfo-MEK w czasie 6 h, podczas których ma fosforylacja Akt i dodatnia regulacja Mcl-1. Wprawdzie PD 98059 (2'-amino-3'-metoksyflawon) selektywny inhibitor kinazy MAPK⁷, blokujący jej fosforylację, zmniejsza ekspresję genu Mcl-1, ale nie zmienia ilości białek ERK1/2 p44 i p42, ani ich ufosforylowanych form p-p44 i p-p42 w linii czerniaka ludzkiego MEL20. Dodatkowo kwas betulinowy nie zwiększa poziomu p-MEK (fosfo-MEK), p-p44 i p-p42 w transfekowanej N-ras linii komórek czerniaka 518L1, po 6 h [175].

Po 15 min od podania 8 μ g/ml kwasu betulinowego, w komórkach linii ludzkiego czerniaka UISO-Mel-1, następuje fosforylacja proapoptotycznych białek z rodziny MAPK: p38 i SAP/JNK. W oznaczeniu cytometrycznym (FITC) z aneksyną V, subpopulacja komórek apoptotycznych ujawnia się po 18 h inkubacji. Stopień estryfikacji wzrasta z upływem czasu, osiągając maksimum po 2 h. Wówczas ilość ufosforylowanego p38 osiąga *plateau*, natomiast p-SAP/JNK po ok. 4 h zaczyna ulegać defosforylacji. Poziom ekspresji tych białek jak i antyapoptotycznego ERK nie zmienia się pod wpływem triterpenu, a ERK nie ulega fosforylacyjnej aktywacji (Western-blot z użyciem przeciwciał). Dodanie specyficznych inhibitorów białka p38 — SB203580 — i JNK/SAP — SP600125 — tylko częściowo ogranicza indukowaną kwasem betulinowym apoptozę (bardziej dla p38). Świadczy to o tym, że w uruchomieniu programu śmierci obok tych MAP-kinaz, biorą udział inne czynniki [197]. Preinkubacja komórek z antyoksydantami wit. E (1mM), GSH (30 mM) lub NAC (30 mM), chroni je prawie całkowicie przed proapoptotycznym działaniem triterpenu. Sugeruje to istotną rolę rft w procesie indukowanej kwasem betulinowym apoptozy. Jednocześnie przeciwutleniacze, zwłaszcza wit. E i GSH, znacząco zmniejszają indukowaną triterpenem fosforylację p-38 i SAP/JNK, zwiększając w tym samym czasie poziom ufosforylowanego ERK [197].

W liniach glejaków ludzkich LN-18 i LN-229 obserwuje się pod wpływem 50 μ g/ml

⁷Znanej również jako MEK1 — kinaza MAPK/ERK.

kwasy betulinowe indukowanie ekspresji białka p21 i brak wzrostu poziomu p53. Białko p21 jest inhibitorem cyklinozależnej kinazy (cdk), i pośredniczy w p53-zależnym i p53-niezależnym zatrzymaniu cyklu komórkowego w fazie G0-G1 i G2-M. Analiza cyklu komórkowego tych linii po 4 i 24 h nie wykazuje jednak zatrzymania w którejś z tych faz, pomimo akumulacji p21 [216].

Nieco inaczej przebiega ekspresja białek regulujących potencjał mitochondrialny w komórkach ludzkich glejaków LN-18 i LN-229. Równocześnie wzrasta poziom białek proapoptotycznego Bax i antyapoptotycznego Bcl-2, natomiast ilości Bcl-x_S i Bcl-x_L pozostają niezmienione. Podobnie jak w nerwiaku niedojrzałym [55], ektopowa ekspresja genu Bcl-2 w tych liniach, chroni je przed apoptozą [216]. Natomiast w linii ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej K-562, odpornej m.in. na etopozyd i cisplatynę, kwas betulinowy w stężeniu 20 µg/ml, powoduje spadek potencjału błonowego mitochondriów, w znacznym stopniu już po 1 h i całkowicie po 18 h, co zapoczątkowuje proces apoptozy tych komórek. Białaczka ta charakteryzuje się obecnością chromosomu Philadelphia (Ph¹), zawierającego chimeryczny gen bcr-abl, powstały z translokacji genu abl z chromosomu 9 do bcr chromosomu 22. Chimera bcr-abl koduje kinazę tyrozynową, fosforylującą czynnik transkrypcyjny stat 5 bezpośrednio aktywujący gen BclX_L⁸, co zapewnia komórkom przewagę wzrostu i przeżywalności poprzez niepodleganie cytokinom. W badaniu RT-PCR wykazano, że kwas betulinowy indukuje apoptozę w komórkach linii tej białaczki bez wpływu na poziom ekspresji zmutowanego genu bcr-abl [65]. Zatem mechanizm działania kwasu betulinowego umożliwia pominięcie bariery oporności lekowej tego nowotwora.

Linie komórkowe glejaka ludzkiego o różnym statusie genów kodujących p53: U-87MG (dzikie), LN-229 (heterozygotyczne, funkcjonalnie transkrybujące p53), T98G (zmutowane), LN-18 (zmutowane), LN-308 (nie wykazujące ekspresji p53) wszystkie podlegają indukowanej kwasem betulinowym apoptozie, co widoczne jest w zmianach morfotycznych komórek pod mikroskopem. Wartości EC₅₀ rosną jednak, wraz ze spadkiem funkcjonalności genów kodujących p53 (*vide* tab. 4.1) [216].

Dla wykazania działania proapoptotycznego, kwas betulinowy wymaga prawdopodobnie syntezy białka, którego m-RNA jest obecne w komórce. Stwierdzono to działając triterpenem w stężeniu 50 µM przez 24 h na komórki linii glejaków ludzkich LN-229 i T98G, poddanych 2 h preinkubacji z blokerem syntezy m-RNA aktynomycyną D (0,5 µg/ml), oraz osobno z inhibitorem syntezy białek cykloheksimidem (10 µg/ml). Tylko w tym ostatnim wypadku następowało zniesienie toksyczności kwasu betulinowego [216]. Podobnie w linii czerniaka ludzkiego Mel-2, cykloheksimid 0,5 µg/ml całkowicie niweluje proapoptotyczne działanie dawki 2 µg/ml triterpenu, która stanowi jego EC₅₀ na tej linii [150]. Podanie cykloheksimidu przed kwasem betulinowym, blokuje również generowanie rft i zmniejsza aktywność kaspazy 3 [216].

Wymiatacz wolnych rodników PBN, podany przed lub równocześnie z kwasem betulinowym, hamuje apoptozę komórek glejaków linii LN-229 i T98G indukowaną kwasem betulinowym; podobnie NAC ma działanie protekcyjne, co wykazano w teście fluorescencji DCF (dioctanu dichlorofluoresceiny) [216]. Działanie antyapoptotyczne przeciwutleniaczy: wit. E (1mM), GSH (30 mM) i NAC (30 mM), wobec indukowanej przez kwas betulinowy (8 µg/ml) samobójczej śmierci komórek, wykazano także na linii czerniaka ludzkiego UISO-Mel-1 (anneksyna V, FITC) [197].

Kwas betulinowy w koncentracji 10 µg/ml w 72 h teście (ozn. FACS, PI) nie jest

⁸Jest to jeden z genów supresji apoptozy.

toksyczny na mózdkowe komórki granulkowate (ang.: cerebellar granule cells) w przeciwieństwie do 0,1 mM staurosporyny (inhibitora PKC) [56]. Dla nietransformowanych ludzkich astrocytów jest nietoksyczny w stężeniu do 250 μM [216].

Istotne znaczenie dla cytotoxyczności ma wpływ rozpuszczalnika, a właściwie odpowiednia solubilizacja hydrofobowego związku i/lub jego biodostępność. W badaniach Pisha et.al. kwas betulinowy rozpuszczony w DMSO wykazał wysoką toksyczność wobec czerniaków MEL-1, -2, -3 lecz małą toksyczność wobec linii A431, BC-1, COL-2, HT-1080, KB, LNCaP, LU-1 i U373 z wartościami $\text{EC}_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$ (tabela: 4.1). Traktowanie komórek kwasem betulinowym w postaci kompleksu z PVP nie zmniejszyło wartości EC_{50} dla tych linii, ale dwukrotnie wzrosły (spadek aktywności) one dla czerniaków. Rozpuszczenie kwasu betulinowego w 1% BSA zaowocowało pięciokrotnym wzrostem aktywności — zmniejszeniem tych wartości do ok 4 $\mu\text{g/ml}$, jednocześnie dla czerniaków aktywność triterpenu wzrosła — EC_{50} spadło do przedziału 0,5–1,6 $\mu\text{g/ml}$ [150]. Można zatem przypuszczać, że niższa aktywność kwasu betulinowego w liniach nie-czerniaków jest spowodowana mniejszą jego dostępnością dla tych komórek.

Izolowane mitochondria z linii rdzeniaków ludzkich: Daoy, D283 i MEB1 oraz glejaków: A172, U118, U138, poddanych 24 h preinkubacji z 10 $\mu\text{g/ml}$ kwasu betulinowego, indukują apoptotyczną fragmentację izolowanych jąder komórkowych. Jednocześnie obserwuje się uwalnianie z mitochondriów cytochromu c [56]. Nie jest on uwalniany z komórek linii SHEP z nadekspresją Bcl-2 lub Bcl-x_L inkubowanych z kwasem betulinowym (10 $\mu\text{g/ml}$) [58].

Dodatek cytochromu c do ekstraktów cytozolowych komórek SHEP powoduje aktywację kaspazy-3 (wzrost p17) i PARP (wzrost p85), ale nie kaspazy-3. AIF powoduje natomiast aktywację wszystkich tych kaspaz, włącznie z -8 (wzrost p18) [57, 58]. Świadczy to o uruchomieniu pełnego programu apoptozy przez kwas betulinowy [57].

Inaczej niż w liniach glejaków ludzkich LN-18 i LN-229 [216], w linii czerniaka mysiego B16F10, kwas betulinowy powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 w sposób zależny od dawki. Przy 1 μM 78,8% po 24 h i 93,3 po 36 h, a przy 5 μM 95,5% po 24 h i 93,4 po 36 h, natomiast 1 nM winkrystyna zatrzymuje te komórki w fazie G2/M 79,8% po 36 h [170]. Podobnie działa kwas 23-hydroksybetulinowy (izolowany z korzeni *Pulsatilla chinensis* /Bunge/ Regel *Ranunculaceae*) w dawce 10 μM , zwiększa po 24 h populację komórek w fazie G0/G1 z 26,7 do 36,3 i zmniejszając populację G2/M z 12,7 do 0% [81].

Kwas 23-hydroksybetulinowy (10 μM) po 24 h całkowicie hamuje aktywność telomerazy (ozn. TRAP) w komórkach białaczki ludzkiej HL-60. W tej dawce hamuje także ekspresję genu bcl-2, jednocześnie indukując apoptozę komórek; poziom bcl-2 jest odwrotnie proporcjonalny do liczby komórek apoptycznych [81].

Kwas betulinowy zmniejsza indukowaną przez TNF aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w komórkach linii nowotworowych: jelita (HCT 116), okrężnicy (Caco 2) i ludzkiego nowotwora płuc (H 1299). Siła tego działania zależy od stężenia i czasu preinkubacji komórek z triterpenem, wykazując maksimum 91,5±4,9% inhibicji NF- κ B po 24 h inkubacji z 30 μM kb (ozn. za pomocą EMSA po 30 min od podania 0,1 nM TNF). Sam kwas betulinowy nie powoduje aktywacji NF κ B. Wskutek 24 h preinkubacji komórek z 30 μM kwasem betulinowym apoptoza indukowana przez TNF jest nasiloną do ok. 35% (po 16 h od podania TNF); sam TNF indukuje ok. 5%, a sam KB — ok. 8% apoptozy.

Przeniesienie NF- κ B do jądra poprzedzone jest szeregiem zmian białka regulatorowego (inhibitora aktywacji) — podjednostki I κ B α ⁹. Aktywacja NF- κ B wymaga fosforylacji I κ B α

⁹NF- κ B obecny w cytoplazmie w nieaktywnej formie, zbudowany jest z podjednostek p50, p65 i I κ B α .

(przy resztach seryny 32 i 36), ubikwitynacji (przy resztach lizyny 21 i 22) i proteolitycznej degradacji. Fosforylacja ta przeprowadzana jest przez kinazę $I\kappa B\alpha$ (IKK). Enzym ten składa się z trzech podjednostek: $IKK-\alpha$, $IKK-\beta$ — tzw. niezbędnego modulatora (ang.:NF- κB essential modulator)¹⁰ i $IKK-\gamma$. Wskutek degradacji proteolitycznej $I\kappa B\alpha$, odsłonięciu ulegają sygnały lokalizacji jądrowej (ang.:nuclear localization signals) na pozostałym heterodimerze p50-p65. Fosforylacja białka p65 poprzedza translokację do jądra i połączenie ze specyficzną sekwencją DNA. Nie wiadomo który enzym odpowiedzialny jest za fosforylację p65. Przypuszcza się, że mogą to być: $IKK-\beta$, PKC lub PKA [196].

W komórkach linii HCT 116 preinkubowanych przez 24h z 30 μM kwasu betulinowego, prawie całkowicie zahamowana jest indukowana przez TNF (0,1 nM) fosforylacja i degradacja $I\kappa B\alpha$. W kontroli, TNF już po 5 min aktywuje kinazę IKK, lecz kwas betulinowy całkowicie hamuje ten proces, bez bezpośredniego oddziaływania z tym białkiem, jak również fosforylację p65 i translokację do jądra [196].

W komórkach linii HCT 116 1 nM TNF indukuje ponad 5-krotny wzrost ekspresji NF- κB -zależnego genu reporterowego wydzielniczej alkalicznej fosfatazy (SEAP — secretory alkaline phosphatase). W komórkach transfekowanych TNFR 1, TRADD, TRAF 2, NIK, IKK oraz p65, pod wpływem 1 nM TNF indukcja SEAP jest podobna. Kwas betulinowy hamuje ją we wszystkich komórkach, oprócz transfekowanych p65. Sugeruje to, że kwas betulinowy hamuje fosforylację $I\kappa B\alpha$ działając poniżej NIK i powyżej p65 [196].

W komórkach linii HCT 116 kwas betulinowy (30 μM , 24 h) hamuje również aktywację NF- κB indukowaną przez inne znane jego stymulatory : ester forbolu (PMA; 10ng/ml) 90.3 ± 5.9 , H_2O_2 (250 μM) 93.1 ± 2 , IL-1 β 78.7 ± 3.7 , kwas okadowy (0.5 μM) 80.4 ± 7.6 , dym tytoniowy (1 $\mu g/ml$) $74.8\pm 4.2\%$ [196].

Niezależność programu apoptotycznego indukowanego kwasem betulinowym od NF- κB stwierdzono w liniach wtórnych ludzkiej białaczki komórek T JURKAT, gdzie mutanty z zahamowaną aktywacją przez brak $I\kappa B\gamma$ oraz z nadekspresją niefunkcjonalnej formy $I\kappa B\alpha$, ulegają apoptozie w takim samym stopniu jak linia pierwotna [39].

Za pomocą analizy Western-blot, stwierdzono, że kwas betulinowy hamuje indukowaną przez 1nM TNF ekspresję COX-2 i MMP-9 — białek, które mają w odcinkach promotorowych (promotor binding sites), domeny wiążące NF- κB [196].

Kwas betulinowy w stężeniu 10 $\mu g/ml$ indukuje w 75–100% specyficzną apoptozę w 9 z 21 pierwotnych linii ustalonych pochodzących od pacjentów z glejakiem wielopostaciowym (GBM), i w ponad 50% w 19 z tych linii. Wartości te są lepsze niż dla klasycznych środków stosowanych w terapii tych nowotworów użytych w maksymalnych stężeniach osiągniętych w osoczu (peak plasma concentrations). Ponad 75% specyficzną apoptozę, kwas betulinowy indukuje w 43% badanych linii pierwotnych, ceramid (60 nM) w 38%, TRAIL (Apo-2L; 60ng/ml) w 19%, promieniowanie γ (60Gy) w 5%, natomiast BCNU (2 $\mu g/ml$), cisplatyna (2 $\mu g/ml$), doksorubicyna (0.3 $\mu g/ml$) i winkrystyna (0,1 $\mu g/ml$) w żadnej z 21 linii pierwotnych [80].

Średnia aktywność apoptotyczna kwasu betulinowego to ok. 60%. Doxorubicyna w stężeniu 0.3 $\mu g/ml$ wykazuje podobną aktywność, lecz jej zastosowanie ogranicza słaba przenikalność przez barierę krew-mózg i powstawanie oporności wielolekowej. Słabiej dla winkrystyny (0,1 $\mu g/ml$), BCNU (2 $\mu g/ml$), cisplatyny (2 $\mu g/ml$) czy promieniowania gamma (60Gy) wynosi ona tylko ok. 20% [80].

¹⁰Badania z delecją wykazały jego niezbędność przy aktywacji NF- κB przez większość czynników.

4.1 Określenie wzrostu odporności i tolerancji krzyżowej

Kwas betulinowy indukuje apoptozę zarówno w liniach pierwotnych komórek białaczek JURKAT i CEM jak i we wtórnych. Linie wtórne uzyskane w ciągu 12 miesięcy, przez inkubację komórek ze wzrastającymi stężeniami deksametazonu, doksorubicyny, metotreksatu lub winkrystyny, o ponad 100-krotnie większej odporności na te cytostatyki w porównaniu do linii pierwotnych, pozostają wrażliwe na kwas betulinowy. Wyjątkiem są komórki linii JURKAT odporne na metotreksat, których wrażliwość na kwas betulinowy wzrasta. Również linia pierwotna komórek T ostrej białaczki limfatycznej T-ALL, pochodząca od pacjentki z nawrotem po terapii deksametazonem i doksorubicyną, pozostaje wrażliwa na kwas betulinowy [39].

Tabela 4.1: Cytotoksyczność naturalnych triterpenów typu lupanu na komórki linii nowotworowych

związek	linia komórkowa	EC ₅₀	ozn., czas [h]	piśm.	
kwas betulinowy	glejaki ludzkie	[μ M]	fiol. kryst., 22	[216]	
	LN-229	20		[216]	
	U-87MG	25		[216]	
	T98G	25		[216]	
	LN-18	70		[216]	
	LN-308	100		[216]	
	rdzeniaki ludzkie	[μ g/ml]		FACS, PI, 72	[56]
	Daoy	3	[56]		
	D283	3	[56]		
	D341	7.5	[56]		
	MHH1	9	[56]		
	MHH3	10	[56]		
	MHH4	4	[56]		
	MEB1	15	[56]		
	glejaki ludzkie				[56]
	A172	8	[56]		
	U118	5	[56]		
	U138	9.5	[56]		
	U251	5	[56]		
	U343	5	[56]		
	U373	6	[56]		
	SK14	12	[56]		
	SK17	11	[56]		
	SK19	16	[56]		
	SK22	8	[56]		
	SK37	12	[56]		
	SK49	9	[56]		
SK51	7	[56]			

kontynuacja na następnej stronie

Tabela 4.1 – kont. z poprzedniej strony

związek	linia komórkowa	EC ₅₀	ozn., czas [h]	piśm.
kwas betulinowy	SK55	6		[56]
	SK60	10		[56]
	mięsak Ewinga ESFT	10 $\mu\text{g/ml}$	MTT, 48	[64]
	czerniak ludzki	[$\mu\text{g/ml}$]	sulforodamina B, 72	[150]
	MEL-1	1.1		[150]
	MEL-2	2,0		[150]
	MEL-4	4.8		[150]
	MEL-3	3,3		[150]
	kom. łuskowate A341	>20		[150]
	piersi BC-1	>20		[150]
	okrężnicy COL-2	>20		[150]
	mięsa HT-1080	>20		[150]
	KB	>20		[150]
	prostaty LNCaP	>20		[150]
	płuca LU-1	>20		[150]
	glejak U373	>20		[150]
	białaczka szpikowa K-562	12.5 $\mu\text{g/ml}$	MTT, 48	[65]
	czerniak mysi B16	[μM]	MTT, 48	[118]
	lupeol	>234.7		[118]
	betulina	226.		[118]
kwas betulinowy		166.6		[118]
		17.5	po 72 h	[118]
kwas 23-hydroksybetulinowy		67.8		[118]
kwas 3-okso-23-hydroksybetulinowy		47.9		[118]
		2.1	po 72 h	[118]
kwas betulinowy	czerniak mysi B16F10	7.5 μM	MTS, 24	[170]
lupeol ¹¹	prostaty LNCaP	21 μM	MTT, 48	[167]
	prostaty CWR22R ν 1	18,5 μM		[167]

kontynuacja na następnej stronie

¹¹rozp.: DMSO—EtOH 1 : 1

Tabela 4.1 – kont. z poprzedniej strony

związek	linia komórkowa	EC ₅₀	ozn., czas [h]	piśm.
lupeol	białaczka leukocytarna HL-60	ok. 75 μM	Tryp Blue, 72	[10]
kwask betulinowy	HL-60	5.7 μM	MTT, 72	[153]
	ludzki rak płuc A-549	[μM]	RTT ¹² , 48	[60, 199]
lupeol		165±8		[60, 199]
betulina		3.80±0.09		[60, 199]
kwask betulinowy		10.3±0.4		[60, 199]
	ludzki gruczolakorak okrężnicy DLD-1			
lupeol		125±6		
betulina		6.6±0.3		
kwask betulinowy		15.0±0.3		
	czerniak mysi B16-F1			
lupeol		104±6		
betulina		13.8±0.5		
kwask betulinowy		16.1±0.5		
	ludzkie prawidłowe fibroblasty skóry			
lupeol		63 ±3		
betulina		3.58 ±0.07		
kwask betulinowy		12 ±1		[60, 199]
(20R)-28-hydroksy-3-okso-lupan-30- al	niedrobnokomórkowy rak oskrzelowo-płucny NSCLC-N6	39.5±1.2 μM	MTT	[136]
kwask pulsatilowy	P-388	4.8 μg/ml		[222]
	rak płuc (Lewisa)	5.9 μg/ml		[222]
	ludzki niedrobnokomórkowy rak płuc	1.9 μg/ml		[222]
kwask betulinowy	H9	12.9 μM		[92]
kwask betulinowy	CEM	27.5 ±2,7 μM	MTT, 72	[111]
	K562 mesenchymal	54.8±5.6 μM	MTT, 72	
	HT-29 (kom. nabłonkowe)	84.5±6.6 μM	MTT, 72	
	PC-3 (kom. nabłonkowe)	94.1±8.7 μM	MTT, 72	
	czerniak ludzki SK MEL 2 (linia neuroektodermalna)	23.2±1.5 μM	MTT, 72	

kontynuacja na następnej stronie

¹²RTT — test fluorescencyjny redukcji resazuryiny

Tabela 4.1 – kont. z poprzedniej strony

związek	linia komórkowa	EC ₅₀	ozn., czas [h]	piśm.
betulina	CEM (kom. mezenchymalne)	>250 μ M	MTT, 72h	[111]
	K562 (kom. mezenchymalne)	>250 μ M	MTT, 72	
	HT-29 (nabłonk.)	>250 μ M	MTT, 72	
	PC-3 (nabłonk.)	>250 μ M	MTT, 72h	
	czerniak ludzki SK MEL 2 (neuroektodermalna)	>250 μ M	MTT, 72h	

4.2 Działanie chemoprewencyjne

Znany induktor nowotworów — TPA (13-octan-12-O-tetradekanoiloforbolu) — podany na skórę myszom w dawce 5 μg powoduje szybkie gromadzenie dekarboksylazy ornitynowej. Lupeol hamuje epidermalne gromadzenie tego enzymu, uczestniczącego w biosyntezie poliamin, o 96%, betulina 79%, kwas betulinowy 89% a sitosterol 65%. Dodatkowo w dwustopniowym modelu tworzenia nowotworów, podawany 0.5 h, przed TPA, na skórę 5 μM kwas betulinowy hamuje indukowaną przez TPA (2,5 μg , 2 x tygodniowo) promocję nowotworów u myszy potraktowanych 50 μM DMBA (7,12-dimetylobenz[a]antracen). Liczba myszy z nowotworami oraz liczba brodawczaków przypadających na mysz jest znacząco mniejsza po 18 tygodniach u zwierząt traktowanych kwasem betulinowym (65% myszy ze średnio 8,8 brodawczakami) lub sitosterolem (80% myszy ze 11,2 guzami) w porównaniu do kontroli (wszystkie myszy mają średnio 21,1 guzów) [221].

4.3 Badania *in vivo*

Lupeol podawany dootrzewnowo w dawce 1 mg (rozp. w oleju kukurydzianym) ksenograftom atymicznych myszy z wszczepionymi komórkami ludzkiego nowotwora prostaty CWR22Rv1 zmniejsza szybkość narastania nowotworów ($\Delta V=3.9\text{mm}^3/\text{dobę}$ zamiast $39\text{mm}^3/\text{dobę}$) z widocznym jednocześnie obniżeniem PSA (prostate-specific antigen) [167].

W serii naturalnych pochodnych lupanu, wyizolowanych z *Pulsatilla chinensis* (Bge) Regel, lupeol, betulina, kwas betulinowy, kwas 23-hydroksybetulinowy, kwas 3-keto-23-hydroksybetulinowy, cytotoksyczność rośnie wraz ze wzrostem polarności podstawników w pierścieniu A; wartości EC_{50} w tabeli 4.1. Jednocześnie dwa ostatnie triterpeny oraz kwas betulinowy przy stężeniach 26,6, 52 μM i $>109\ \mu\text{M}$, indukują fragmentację DNA. Towarzyszy to spadkowi populacji G1 i wzrostowi sub-G1. Powodują ponadto generowanie rft (pomiar $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ z maksimum 52 μM — kwas 23-hydroksybetulinowy i 104 μM — kwas 3-keto-23-hydroksybetulinowy. W badanym zakresie stężeń 0–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pochodne kwasu betulinowego powodują początkowo wzrost (0–20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), a następnie spadek potencjału mitochondrialnego w teście cytometrycznym z CMXROS (chlorometylo-X-rozaminy). Spadek jest najmniejszy dla obojętnych triterpenów: betuliny i lupeolu [118]. Kwas betulinowy i 3-okso-23-hydroksybetulinowy, w 72 h teście MTT, wykazują większą cytotoksyczną specyficzność wobec komórek czerniaka mysiego niż wobec mysich fibroblastów tkanki łącznej L929 ($\text{EC}_{50} > 100\ \mu\text{g}/\text{ml}$) [118].

Kwas betulinowy wykazuje synergistyczne działanie z winkrystyną, zmniejszając metastazę linii czerniaka mysiego B16F10 u myszy (C57BL/6). W podaniu dootrzewnowym w dawce 10 mg/kg/dobę zmniejsza liczbę guzków z 71,7 do 47, 2% , winkrystyna 0,065 mg/kg/dobę do 50,0%, natomiast podane łącznie do 29,0%. Nasilone działanie może wynikać z faktu, że oba środki zatrzymują cykl komórkowy (str. 22) w różnych fazach: triterpen w G0/G1, a winkrystyna w G2/M [170].

4.4 Testy biologiczne

Pomimo ewidentnych zmian apoptotycznych, generowania RFT, fragmentacji DNA i spadkowi potencjału mitochondrialnego, aktywność oksydazy NADPH (lucygenino-zależna chemiluminescencja) w linii czerniaka mysiego B16 jest niska, tj. poniżej 10%, niezależnie

od podania kwasu betulinowego lub jego pochodnych. Wskazuje to, że to mitochondria a nie oksydaza NADPH są źródłem wolnych rodników [118]. Test ten zatem nie jest odpowiedni do oznaczania aktywności triterpenów pochodnych lupanu.

Ważny jest odpowiedni dobór czasu trwania eksperymentu i barwników do oznaczania apoptozy/nekrozy. Komórki UISO-Mel-1 w teście z aneksyną V (cytometria FITC) nie wykazują cech apoptozy w trakcie inkubacji z $4 \mu\text{g/ml}$ KB przez 36 h. Natomiast przy dawce $8 \mu\text{g/ml}$, po 18 h inkubacji pojawia się subpopulacja apoptotyczna (apoptotic-like), jednak po 24 h, i bardziej po 42 h wykazują cechy nekrotyczne¹³ [197].

W komórkach linii czerniaka mysiego B16F10 pod wpływem $5 \mu\text{M}$ kwasu betulinowego obserwuje się 19.5% komórek apoptotycznych w teście barwienia PI i aneksyną V, jednocześnie w teście MTS przy tej dawce wykazują one 62% przeżywalności [170]. Może to świadczyć o tym, że kwas betulinowy wykazuje toksyczność nie tylko poprzez indukowanie apoptozy, albo że testy nie są relewantne.

Oznaczenie toksyczności kilku środków przeciwnowotworowych: doksorubicyny, kw. betulinowego, cisplatyny, ceramidu, TRAIL, winkrystyny i promieniowania γ na liniach komórkowych glejaków wielopostaciowych (GBM), wyniki uzyskiwane w oznaczeniu błękitem Trypan Blue, są podobne do uzyskiwanych z wybarwianiem PI. Natomiast test MTT charakteryzuje się dużymi odchyleniami wewnątrz- i między-eksperymentalnymi [80].

4.5 Farmakokinetyka

Ze względu na znikomą rozpuszczalność kwasu betulinowego w wodzie, jego farmakokinetykę badano po sporządzeniu kompleksu z poliwinylpirolidonem (PVP), który podawano dootrzewnowo myszom CD-1. Do modelowania przyjęto założenie, że farmakokinetyka jest pierwszego rzędu w układzie dwukompartamentowym. Przy dawkach 250 i 500 mg/kg m.c. maksymalne stężenie kwasu betulinowego w osoczu, obserwowano po czasie 0,15 h dla mniejszej i 0,23 h dla większej. Objętości dystrybucji wynoszą odpowiednio 106 i $108 \text{ dm}^3/\text{kg}$, okres półtrwania 11,5 h i 11,8 h, a klirens całkowity odpowiednio 13,6 i $13,5 \text{ dm}^3/\text{kg/h}$. Stwierdzono, że dystrybucja kwasu betulinowego podanego w dawce 500 mg/kg m.c. jest znacznie zróżnicowana w obrębie tkanek po upływie 24 h. Wysokie stężenie obserwuje się w tkance tłuszczowej z maksimum $2260 \pm 850 \mu\text{g/g}$.

Dystrybucja w innych tkankach przedstawiona jest w tabeli 4.2.

Tabela 4.2: Dystrybucja kwasu betulinowego u myszy po 24 h, po podaniu dootrzewnowym z PVP

	c max [$\mu\text{g/g}$]
pęcherz moczowy	3523 ± 744
węzły chłonne	4218 ± 2809 (po 4 h)
gruczoły sutkowe	1184 ± 904
jajniki	3055 ± 1421 (po 4 h)
śledziona	1287 ± 162
macica	908 ± 165

¹³Komórki apoptotyczne są zabarwione z aneksyną V i słabo wybarwione PI, natomiast nekrotyczne zabarwione są przez obydwie wskaźniki.

Oznaczeń dokonano metodą chromatografii HPLC/MS po ekstrakcji chlorkiem metylenu. Wzorcami wewnętrznymi były: kwas oleanolowy i kwas madekassowy (6-hydroksyazjatykowy)¹⁴ [27, 204].

W dostępnym piśmiennictwie nie ma doniesień dotyczących metabolizmu kwasu betulowego i betuliny *in vitro* u ludzi. W kilku modelowych układach badano przekształcenia niektórych triterpenów typu lupanu przez mikroorganizmy, które opisano w Rozdziale 5.12.

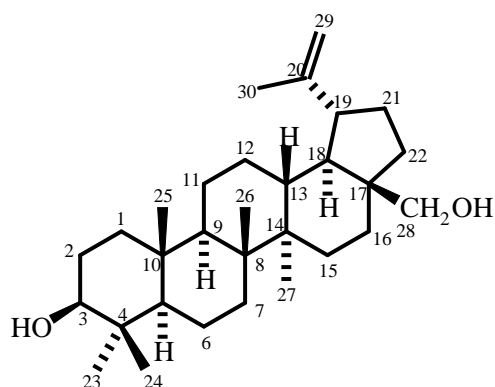
¹⁴Jest to jeden z aglikonów saponin występujących w wąkrotce azjatyckiej (*Centella asiatica*).

Rozdział 5

Modyfikacje chemiczne lupeolu, betuliny i kwasu betulinowego

5.1 Ogólna charakterystyka właściwości betuliny

Cząsteczka betuliny **39** posiada tylko trzy względnie reaktywne funkcje chemiczne. Są to: grupa izopropenyłowa przy C-19 i dwie grupy hydroksylowe — pierwszorzędowa przy C-28 oraz drugorzędowa przy C-3.



39

Reaktywność grup funkcyjnych betuliny nie jest typowa dla tych grup chemicznych, co wynika z ich otoczenia chemicznego. Izopropenyl przyłączony jest do naprężonego pierścienia cyklopentanowego, hydroksyl C-28 przesłaniany jest przez szkielet węglowodorowy, natomiast grupa hydroksylowa przy C-3 sąsiaduje z czwartorzędowym atomem węgla, połączonym z dwoma grupami metylowymi i atomem mostkowym pierścieni A-B. Takie położenie tych trzech grup powoduje, że betulina podlega trudniej przekształceniom chemicznym niż inne analogi strukturalne, np. steroidy, w których nie występują grupy metylowe przy C-4, dzięki czemu dostępność, a co za tym idzie reaktywność hydroksylu przy C-3 jest większa u steroidów. Z drugiej strony grupa izopropenyłowa betuliny, połączona z naprężonym szkieletem węglowym ma zwiększoną reaktywność w niektórych przekształceniach chemicznych¹.

¹Prace przeglądowe dotyczące chemicznych modyfikacji betuliny i kwasu betulinowego — *vide*: [3, 12, 27, 168, 201, 202].

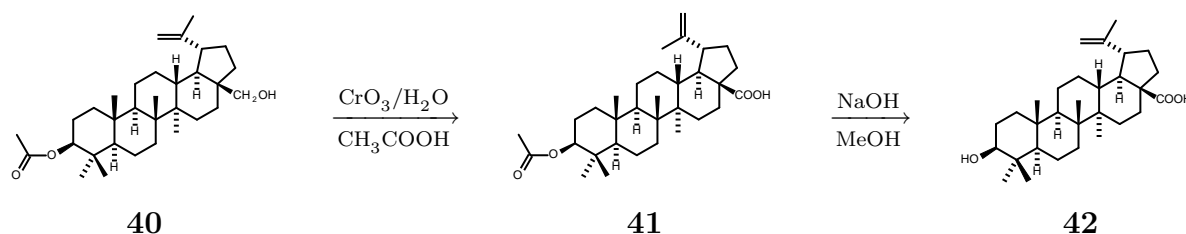
5.2 Utlenianie

5.2.1 Utlenianie grup hydroksylowych

Utlenianie grup hydroksylowych pochodnych typu lupanu, jest jednym z najczęściej stosowanych przekształceń przeprowadzanych na tych związkach a tworzone oksypochodne są niejednokrotnie produktami pośrednimi do dalszych modyfikacji chemicznych. Wprowadzanie grup hydroksylowych do cząsteczki jest prawdopodobnie także etapem przekształceń metabolicznych betuliny.

Po raz pierwszy utlenianie betuliny do kwasu betulinowego opisał w 1938 r. von L. Ružička. Proces jest stosunkowo prosty i polega na działaniu wodno—kwasowym roztworem CrO_3 na 3-octan betuliny **40** w kwasie octowym w temperaturze pokojowej (sch. 7).

Powstający kwas 3-acetylo-betulinowy **41** pod działaniem metanolowego roztworu NaOH hydrolizuje do kwasu betulinowego **42** [210]. Jeśli grupa hydroksylowa przy C-3 betuliny nie jest zabezpieczona, to ulega utlenieniu do ketonowej **43** (R=H). Energiczne utlenianie



Schemat 7: Synteza kwasu betulinowego

w krótkim czasie, ale w miarę niskiej temperaturze zwiększa wydajność reakcji, gdyż nie powstają produkty uboczne, m.in. bliżej niezidentyfikowane kwasy dikarboksyłowe [210].

Przeprowadzenie oksydacji w łagodniejszych warunkach (np. w środowisku acetonu) pozwala na utlenienie odczynnikiem Jonesa grupy C-28 hydroksylowej 3-octanu betuliny do aldehydowej [99, 218]. Zastosowanie większej ilości odczynnika utleniającego i przedłużenie czasu reakcji powoduje dalsze przekształcenie grupy aldehydowej w karboksylową [46, 97].

Zabezpieczenie drugorzędowej grupy hydroksylowej betuliny wymaga uprzedniej całkowitej estryfikacji cząsteczki i następczej selektywnej hydrolizy estru przy C-28, co możliwe jest przy zastosowaniu stechiometrycznej ilości zasady i niskiej temperatury reakcji. Metoda ta zastosowana przez *von Ružičkę* doczekała się wielu modyfikacji. Ciekawy sposób przedstawił *Kim i wsp.* — utleniając za pomocą odczynnika Jonesa 3-octanu betuliny, otrzymanego pośrednio z eteru 28-tetrahydropiranylowego betuliny (*vide* str.54) [97]. Nie wielkim mankamentem tej syntezy jest jej wieloetapowość powodująca, że łączna wydajność wynosi ok. 54–61%.

Opisano także utlenianie surowego ekstraktu z kory brzozej² w acetonie za pomocą odczynnika Jonesa. Kwas betulinowy w postaci soli potasowej oddziela się łatwo od nietworzącego soli 3-okso-lup-20(29)-enu (lupenonu) [46].

W przypadku użycia innych łagodnych utleniaczy jak np. chlorochromian pirydyniowy (PCC) lub dichromian pirydyniowy (PDC) w 1,5–2-krotnym nadmiarze molowym do

²500g kory brzozej ogrzewano z 3 litrami wodnego 2-propanolu przez 2 h w 80 °C, w autoklawie, po czym przesączono na gorąco. Po schłodzeniu w 5 °C przez 12 h, odsączono 117 g osadu (23,4%) składającego się w 90% z betuliny i ok.5% lupeolu.

betuliny, w dichlorometanie, chloroformie lub benzenie, reakcję oksydacji można zatrzymać na etapie aldehydu (1–3 h w temp. ok. 20 °C). Jednocześnie w tych przypadkach, nie jest konieczna protekcja grupy C-3 hydroksylowej, gdyż preferencyjnie utleniany jest hydroksyl pierwszorzędowy. Regioselektywność tych reakcji jest w pewnym stopniu zależna od stosunku molowego reagentów i rodzaju rozpuszczalnika, a stopień konwersji betuliny nie przekracza 58% [105]. Istotną rolę odgrywa czas reakcji, gdyż drugorzędowa grupa hydroksylowa również podlega oksydacji. Kwas betulinowy utleniany PCC przy stosunku reagentów ok. 1 : 1 (w/w) w samym chloroformie w 20 °C ulega w ciągu 2 h 93% konwersji do kwasu 3-keto-betulinowego [124].

W układzie dwufazowym rozpuszczalnik organiczny—roztwór $K_2Cr_2O_7$ w 9 M H_2SO_4 z bromkiem tetrabutylamoniowym (TBAB) jako przenośnikiem fazowym, również preferencyjnie utleniana jest do aldehydu pierwszorzędowa grupa C-28-OH. Stosunek powstających produktów: 3-hydroksy-28-aldehydu do 3-keto-28-aldehydu betulinowego, oraz szybkość reakcji i jej wydajność zależą od rodzaju rozpuszczalnika organicznego. W benzenie produktami utleniania są aldehyd (37%), ketoaldehyd (8%) i 3-oksopochodna (12%), przy konwersji betuliny 70%. Najwyższą konwersję — 100% — przy jednocześnie wysokiej regioselektywności osiągnięto stosując jako fazę organiczną układ dwufazowy chlorek metylenu gdzie głównym produktem jest 3-ketoaldehyd 85%. Stosunek utleniacza do betuliny 6:1, 20 °C, 45 min [105].

Selektywne utlenienie betuliny do aldehydu betulinowego przeprowadzono również za pomocą CrO_3 zaadsorbowanego na podłożu stałym. Zoptymalizowano szereg parametrów pod kątem uzyskania najwyższej selektywności i wydajności tej reakcji. Najlepszym nośnikiem CrO_3 spośród czterech badanych okazał się żel krzemionkowy w porównaniu do Al_2O_3 , celitu i montmorylonitu K10. Największą selektywność utleniania hydroksylu pierwszorzędowego względem drugorzędowego osiągnięto rozpuszczając tlenek chromu (VI) w acetonie i odparowując rozpuszczalnik po zmieszaniu z krzemionką, bez dalszej aktywacji termicznej żelu. Zwiększenie aktywności podłoża przez ogrzewanie mieszaniny żelu krzemionkowego rozartego w moździerzu z CrO_3 przez 4 h w 200 °C, lub krzemionki z CrO_3 naniesionym w postaci roztworu acetonowego w 100 °C przez 4 h, skutkowało zmniejszeniem regioselektywności reakcji i stopnia konwersji betuliny. Inne parametry reakcji, tj. czas 0,5–1 h (min 0,25 h) w 20 °C i dwukrotny nadmiar utleniacza (w przeliczeniu na tlenek chromu VI) w stosunku do betuliny, zapewniają wysoką regioselektywność oksydacji z zachowaniem wysokiej wydajności. Najlepsza proporcja $CrO_3:SiO_2$ wynosi 1 : 10, a optymalnym rozpuszczalnikiem jest toluen (toluen > chlorek metylenu > aceton > THF). W czasie 1 h w 20 °C przy stosunku utleniacza (CrO_3) do betuliny 2:1 selektywność oksydacji hydroksylu pierwszorzędowego do drugorzędowego wynosi 13,09 : 1, a wydajność uzyskanego aldehydu betulinowego 84% [149].

Grupa aldehydowa powstającego związku (3-hydroksy-lup-20(29)-en-28-alu) łatwo ulega dalszemu utlenieniu do kwasu, tak że aldehyd betulinowy jest niestabilny w trakcie oczyszczania na żelu krzemionkowym³, utleniając się pod wpływem powietrza [149]. Utleniaczami funkcji aldehydowej mogą być również H_2O_2 lub acetonowy roztwór $KMnO_4$ [149, 171].

Dwuetapowe utlenianie betuliny najpierw do aldehydu 3-keto-betulinowego za pomocą PCC i dalej 30% H_2O_2 , pozwala otrzymać kwas 3-ketobetulinowy z większą łączną wydajnością (88%) i czystością (99%), niż w bezpośrednim utlenianiu betuliny za pomocą

³Stosuje się tlenek glinowy.

odczynnika Jonesa [171].

Odczynnik Swerna⁴, utlenia zarówno pierwszo- jak i drugorzędową grupę hydroksylową betuliny. Przy prawidłowo przeprowadzonym procesie, konwersja pierwszorzędowej funkcji hydroksylowej betuliny z drugorzędową grupą zabezpieczoną (np. w postaci eteru dimetylo-*tert*-butylosililowego), do aldehydowej jest ilościowa [44]. Reakcję tą przeprowadzono również na 3-octanie- i 28-octanie betuliny **44** z użyciem DMSO aktywowanego chlorkiem oksalilu [11].

Aktywacja DMSO bezwodnikiem octowym powoduje, że produktami utleniania betuliny w temperaturze pokojowej są tioetery, w których jedna funkcja hydroksylowa ulega oksydacji a druga eteryfikacji (strona 51). Natomiast aktywacja DMSO za pomocą bezwodnika kwasu trifluorooctowego prowadzi głównie do tworzenia trifluoroestrów betuliny (p. str. 51). Dopiero użycie czterech równoważników DMSO aktywowanego bezwodnikiem kwasu trifluorooctowego pozwala na uzyskanie 3-okso-28-trifluorooctanu betuliny (49%) i aldehydu betulonowego (20%), obok 28-trifluorooctanu betuliny (21%) [11].

Kwas betulinowy można otrzymać w wyniku redukcji kwasu 3-ketobetulonowego (betulonowego). Pod działaniem NaBH₄ ugrupowanie 3-karbonylowe ulega selektywnej redukcji wobec grupy karboksylowej (lub estrowej). W reakcji tej powstają jednak izomery 3 α ⁵ i 3 β [97]. Ich wzajemny stosunek zależy częściowo od rodzaju rozpuszczalnika. W THF proporcja β : α wynosi 95 : 5 [97], metanolu 75 : 15 [180], 2-propanolu 97 : 3 [46], a w dioksanie 93 : 7 [46]. Obniżenie temperatury z 20 °C do 0 °C powoduje niewielki wzrost selektywności i tworzenie mniejszych ilości izomeru α (ok. 1%). Na selektywność redukcji kwasu betulonowego większy wpływ ma efekt kationowy. Zastosowanie LiBH₄ zamiast NaBH₄ powoduje wzrost ilości izomeru α do 20% (przy wydajności reakcji 97%) [46].

Uzyskanie w przewodzie izomeru α możliwe jest prawdopodobnie przy zastosowaniu do redukcji odczynnika Meerweina-Verleya-Pondorffa (izopropanolan glinu/alkohol izopropylowy). Reakcja tego typu nie została jednak opisana dla pochodnych lupanu, lecz dla triterpenów tetracyklicznych typu kukurbitanu [144](strona 26).

Utlenianie 3-ketopochodnych tlenem atmosferycznym w środowisku t-BuOK/t-BuOH⁶, pozwala na wprowadzenie dodatkowej funkcji ketonowej w pozycji 2 cząsteczki triterpenu [41, 44, 106, 114, 205]. Zastosowanie czystego tlenu powoduje powstawanie większej ilości produktów ubocznych [106]. Z kwasu betulonowego **43** (R=H) lub jego estru metylowego **43** (R=CH₃) powstają odpowiednie diosfenole **45**, z wydajnościami odpowiednio 75% i 85% (schemat 8) [205].

Dalsze utlenianie diosfenoli **45** w tym samym układzie przez dłuższy czas (48 h) przebiega głównie w obrębie pierścienia A i tworzą się laktole (schemat 9) [205].

Pierścień A diosfenolu **45** (R=H lub R=CH₃) może być otwarty za pomocą 30% H₂O₂ we wrzącym, metanolowym roztworze KOH (schemat 10). Wydajność reakcji dla pochodnej kwasu betulinowego ze zmetylowaną grupą karboksylową **43** (R=CH₃) jest większa niż dla pochodnej wolnego kwasu betulinowego **43** (R=H) — odpowiednio 85% i 30% [205].

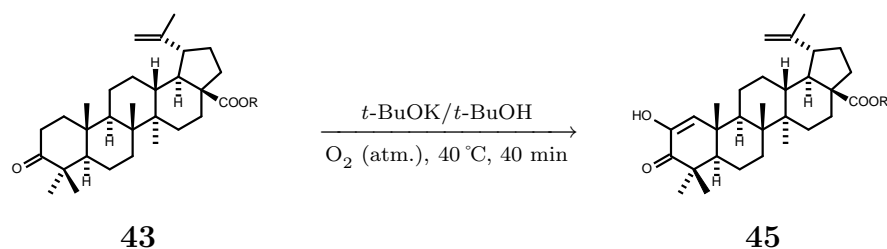
Podobnie w przypadku diosfenolu 28-acetylo-betuliny **48** w trakcie otwarcia pierścienia A tworzone są: kwas 2,3-seko-2,3-dikarboksylowy **49** (R1=R2=H) (74%) i niewielkie ilości jego monoestrów metylowych **49a** (R1=H, R2=CH₃, 8%), **49b** (R1=CH₃, R2=H, 4%) (schemat 11) [41].

⁴DMSO aktywowany chlorkiem oksalilu, bezwodnikiem octowym itp.

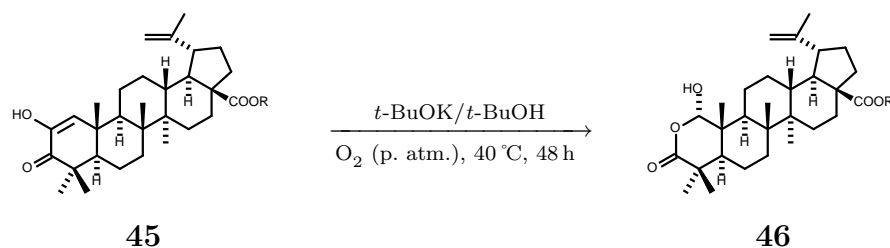
⁵Kwas z grupą 3 α -hydroksylową to kwas epibetulinowy.

⁶Właściwie powstającym *in situ* nadtlaniem alkoholu *tert*-butylowego.

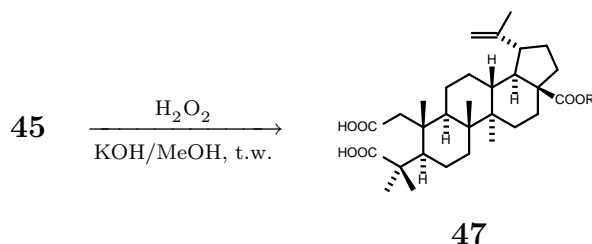
5.2. Utlenianie



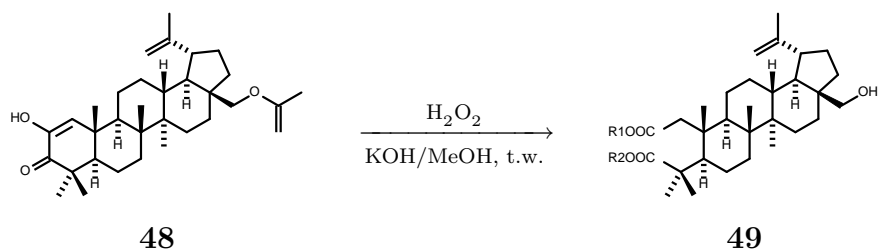
Schemat 8: Wprowadzenie dodatkowej funkcji ketonowej



Schemat 9: Utlenianie diosfenoli



Schemat 10: Otwarcie pierścienia A diosfenolu

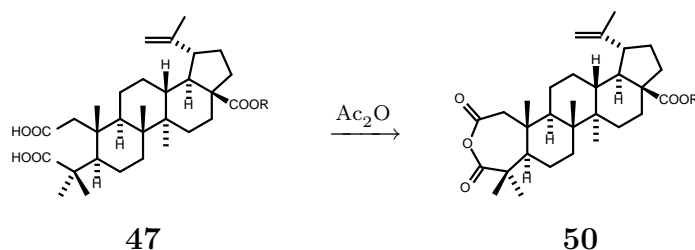


Schemat 11: Otwarcie pierścienia A diosfenolu 28-acetylobetuliny

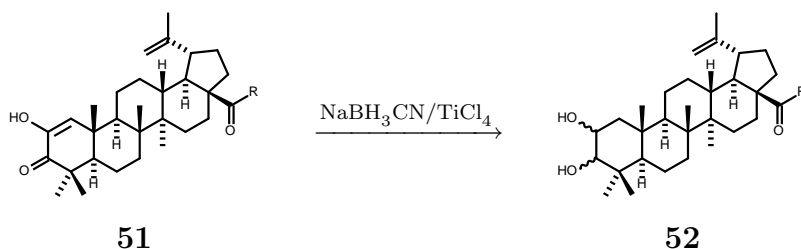
Seko-kwasy dikarboksylowe (R=H) łatwo ulegają laktonizacji pod wpływem bezwodnika octowego w pirydynie (4 h, 20 °C, 52%, schemat 12) [41, 205].

Redukcja diosfenolu **51** (R=NH(CH₂)₁₀COOH) mieszaniną NaBH₃CN—TiCl₄ w metanolu (48 h, 20 °C) daje izomeryczne 2,3-diole **52** (48 h, 20 °C, 32.3%) [44].

Ciekawy sposób utleniania kwasu 23-hydroksybetulinowego **53** do pulsatilowego **54** przedstawili *Ye i wsp.* Drugorzędowa grupa hydroksylowa przy C-3 może być selektywnie

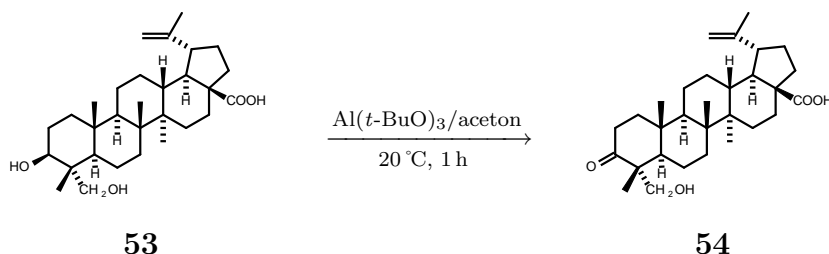


Schemat 12: Laktonizacja kwasu 2,3-seko-2,3-dikarboksylowego (R=H)



Schemat 13: Redukcja amidopochodnej diosfenolu (R=NH(CH₂)₁₀COOCH₃).

utleniona metodą Oppenauera⁷ w czasie 1 h w 20 °C z wydajnością ok. 30% (schemat 14) [222].



Schemat 14: Utlenianie Oppenauera kwasu 23-hydroksybetulinowego

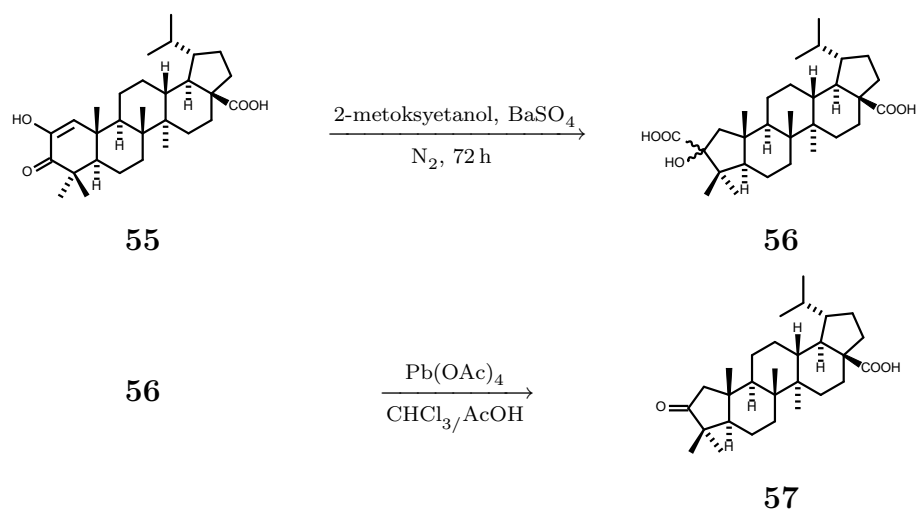
5.2.2 Utlenianie prowadzące do degradacji cząsteczki

Pochodna diosfenolu **45** z uwodornionym wiązaniem podwójnym grupy izopropenylowej, tj. **55**, wskutek ogrzewania pod chłodnicą zwrotną we wrzącym 2-metoksyetanolu z dodatkiem barytu (BaSO₄) izomeryzuje do hydroksykwasu z pięcioczłonowym pierścieniem A **56**, który można dalej utlenić za pomocą Pb(OAc)₄ w mieszaninie chloroform—kwas octowy do kwasu 1-nor-lupan-3-on-28-karboksylowego **57** (3 h w temp. 60 °C, wyd. ok. 30% schemat 15) [114].

Pierścień A można otworzyć w pozycji 3,4 również przy pomocy odczynnika Suáreza. 28-octan betuliny podczas naświetlania światłem z zakresu widzialnego, w obecności jodu

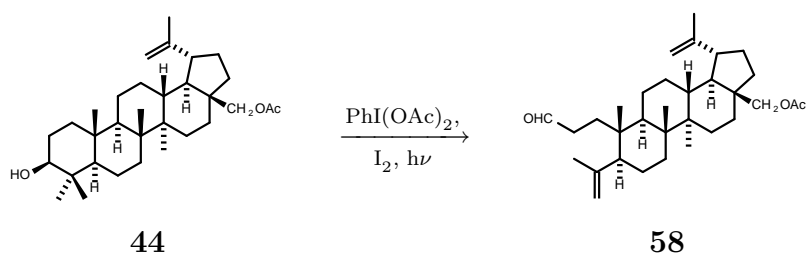
⁷Utleniaczem jest aceton w obecności *t*-butanolanu glinu.

5.2. Utlenianie



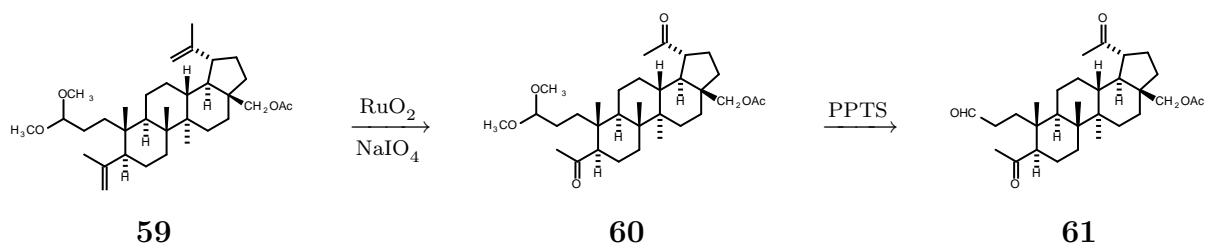
Schemat 15: Przekształcenia 20,29-dihydrodiosfenolu

i diacetoksyjodobenzenu w heksanie tworzy 3,4-seko-2-aldehyd z nowym wiązaniem podwójnym 4,23 **58** (sch. 16) [32].



Schemat 16: Utlenianie metodą Suáreza.

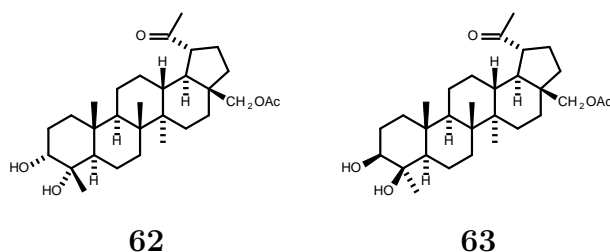
Po zabezpieczeniu grupy aldehydowej za pomocą ortomrówczanu trimetylu do postaci acetalu⁸ **59** wiązania podwójne pod wpływem przygotowanego *ex tempore* RuO₄, łatwo ulegają funkcjonalizacji do grup ketonowych **60** (75%). Hydroliza acetalu **60** zachodzi w łagodnych warunkach — ogrzewanie do wrzenia w mieszaninie aceton—woda 10 : 1 z dodatkiem PPTS przez 1 h — następuje uwolnienie grupy aldehydowej przy C-2 **61** (92%) [32].



Schemat 17: Utlenianie wiązań podwójnych tetratlenkiem rutenu

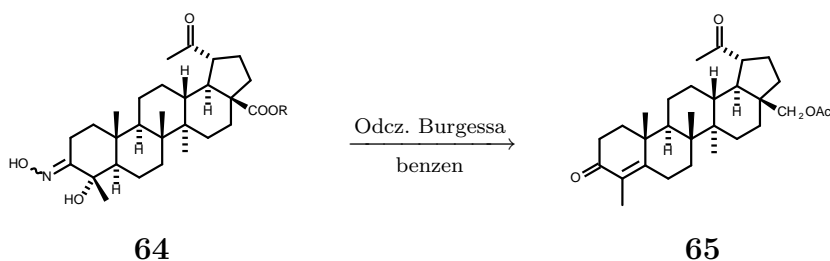
⁸Autorzy donoszą o dużej trudności odblokowania grupy aldehydowej z glikoloacetalu.

Sąsiadujące ze sobą grupy karbonylowe związku **61**, łącząc się w reakcji reduktywnego sprzężenia katalizowanego SmI_2 , odtwarzają pierścień A, bez jednej grupy metylowej przy C-3. Reakcja zachodzi w środowisku bezwodnego THF z dodatkiem diiodoetanu i *t*-BuOH, jako źródłem protonów. W powstającej mieszaninie izomerów, obydwie powstające grupy hydroksylowe mają taką samą orientację: $3\alpha,4\alpha$ **62** (70.4%) lub $3\beta,4\beta$ **63** (6.6%) [32].



Utlenienie 28-acetylo- $3\alpha,4\alpha$ -dihydroksy-23,29-dinor-lupan-20-onu **62** odczynnikami Swern umożliwia selektywne przekształcenie hydroksylu drugorzędowego (przy C-3) wobec trzeciorzędowego (przy C-4) do **64** (73%)⁹.

Hydroksyketon **64** (28-acetylo- 3α -hydroksy-23,29-dinor-lupan-3,20-dion) ulega dehydratacji odczynnikami Burgessa¹⁰ w trakcie reakcji *syn*-eliminacji do **65** (t.w., 48 h, 73%, sch. 18) [32].



Schemat 18: Dehydratacja odczynnikami Burgessa

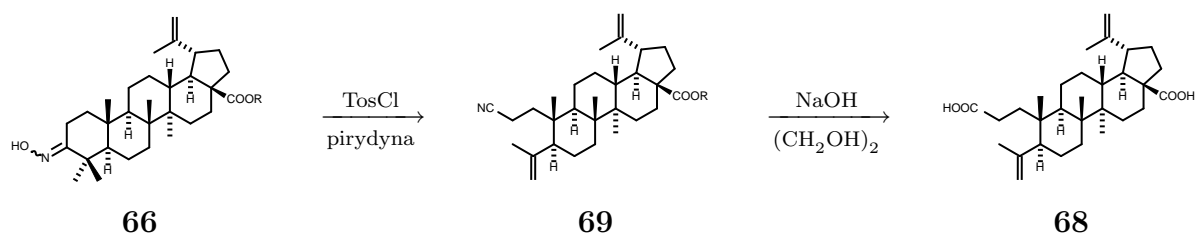
Innym sposobem otwarcia pierścienia A w pozycji 3,4 jest reakcja przegrupowania Beckmana odpowiedniego oksymu 3-ketopochodnej triterpenowej. Reakcja polega na ogrzewaniu w t.w., 3-oksymu **66** ($\text{R}=\text{H}$ lub CH_3) z chlorkiem tosyłu w bezwodnej pirydynie. W tych warunkach powstaje głównie nitryl z jednoczesnym rozszczepieniem pierścienia. Podczas reakcji pochodnej z wolną grupą karboksylową ($\text{R}=\text{H}$) **66** powstaje niewielka ilość (ok. 15%) dimerycznego bezwodnika **67** [101].

Grupa nitrylowa w trakcie ogrzewania do wrzenia z 10% roztworem NaOH w glikolu etylenowym ulega przekształceniu do karboksylowej a jednocześnie ulega hydrolizie grupa metoksylova. Przykład syntezy kwasu 3,4-seko-lupa-4(23),20(29)-dien-3,28-diowego **68** ($\text{R}=\text{H}$) przedstawia schemat 19 [101].

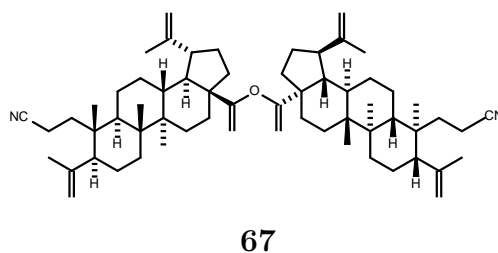
⁹Zastosowanie odczynnika Dessa-Martina lub PCC prowadzi w dużym stopniu do otwarcia pierścienia A.

¹⁰N-(trietyloamino-sulfonylo)-karbaminian metylu (sól wewnętrzna).

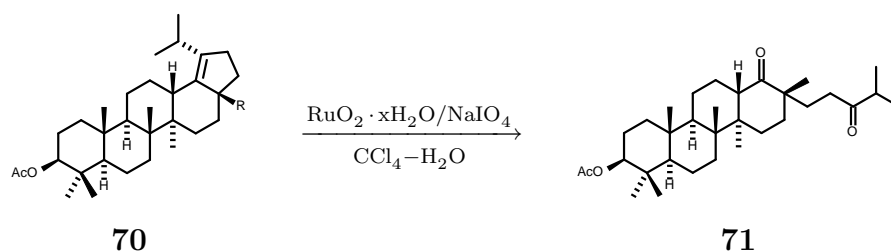
5.2. Utlenianie



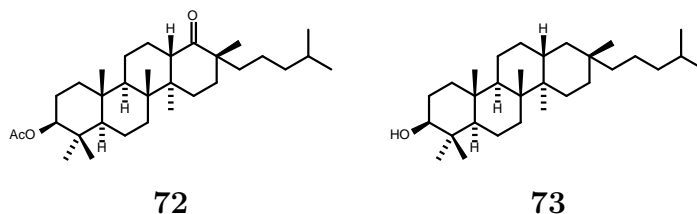
Schemat 19: Synteza kwasu 3,4-seko-lupa-4(23),20(29)-dien-3,28-diowego (R=H lub CH₃)



W 1971 r Suokas i Hase zaproponowali syntezę pochodnych bakaranu z izomeru 3-octanu lupenyli **70** (R=CH₃). Podczas dwufazowego utleniania, w mieszaninie CCl₄—woda, za pomocą RuO₄ tworzonego *in situ* w reakcji RuO₂ · xH₂O z NaIO₄, pierścień E **70** ulega rozerwaniu. W reakcji tej powstaje **71**, który później w trakcie redukcji Huang-Minlona¹¹ daje jako główny produkt **72**¹² i w ok. 10% 3β-bakaranol **73** [186].



Schemat 20: Otwarcie pierścienia E



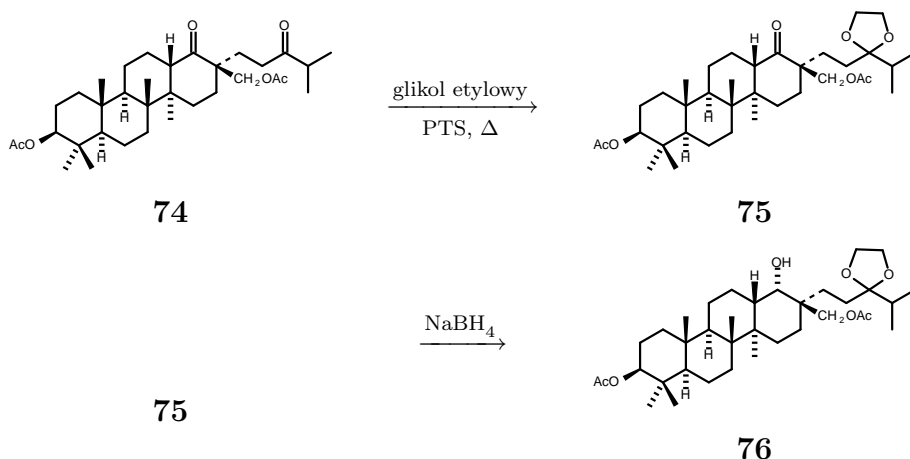
Analogicznie została zsyntetyzowana pochodna **74**, przez utlenienie izomeru dioctanu betuliny **70** (R=CH₂OCOCH₃). 3β,28-diacetoksy-18,19-sekolupan-18,19-dion **74**, po upochodnieniu do acetalu **75** przez ogrzewanie z glikolem etylenowym w benzenie z PTS (4 h), zredukowano za pomocą NaBH₄ do 18α-acetalu **76**. Dehydroksylacja tego związku przez

¹¹Ogrzewanie hydrazynu w glikolowym roztworze KOH.

¹²Grupa karbonylowa przy C-18 jest trudna do redukcji tą metodą.

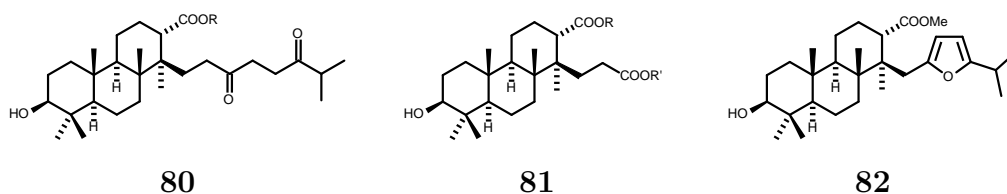
ogrzewanie w heksametylofosforoamidzie w 240 °C i rozszczępienie acetału, prowadzi do powstania **77** (str. 64).

Związek ten jest identyczny z produktami rozszczępienia 18,19-epoksydów **78** i **79** za pomocą eteratu BF_3 w benzenie (str. 64) [189].



Schemat 21: Selektywna redukcja karbonylu w pierścieniu D układu bakkaranu

Utlenianie za pomocą $\text{RuO}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}/\text{NaIO}_4$ przebiega odmiennie w układzie dwufazowym: octan etylu—woda z dodatkiem CF_3COOH . Izomer 3-octanu betuliny z wiązaniem podwójnym w pierścieniu E **70** ($\text{R}=\text{CH}_2\text{OH}$) ulega utlenieniu do **80** ($\text{R}=\text{H}$), tj. kwasu 3 β -acetoksy-28-nor-17,18;18,19-diseko-lupan-17,19-dion-18-owego (53,6%) i **81** ($\text{R}=\text{H}$), tj. kwasu 3 β -acetoksy-19,20,21,22,28,29,30-heptanor-17,18-seko-lupan-17,18-dioowego (16,9%).

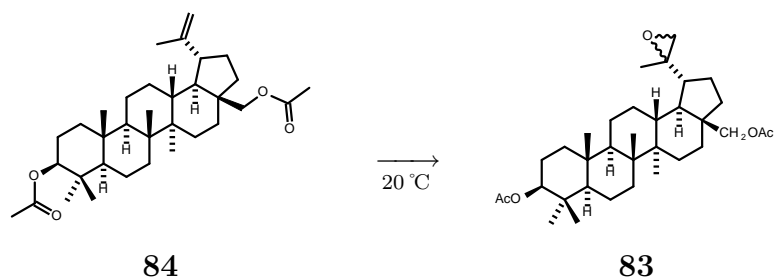


Obydwa związki: **80** ($\text{R}=\text{H}$) i **81** ($\text{R}=\text{H}$) w reakcji z diazometanem dają odpowiednie estry metylowe: **80** ($\text{R}=\text{CH}_3$) i **81** ($\text{R}=\text{R}'=\text{CH}_3$). Pod wpływem kwasu *p*-TsOH we wrzącym benzenie, łańcuch boczny estru metylowego **80** ($\text{R}=\text{CH}_3$) cyklizuje i tworzy się związek z pierścieniem furanowym **82**. Furanopochodna degradowana RuO_4 tworzy związek **81** ($\text{R}=\text{H}$), który po estryfikacji za pomocą diazometanu jest tożsamy z estrem metylowym związku **81** ($\text{R}=\text{CH}_3$) [33].

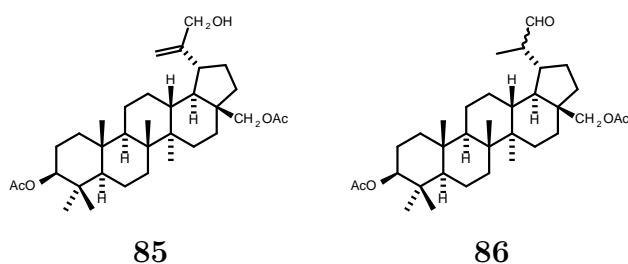
5.2.3 Utlenianie wiązania podwójnego

Wiązanie podwójne grupy izopropenylowej, jest dość reaktywne i łatwo może być utlenione lub zredukowane.

Kwas 3-chloronadbenzoesowy użyty w 2-krotnym nadmiarze molarnym do dioctanu betuliny w chloroformie (z dodatkiem wodnego nasyconego roztworu NaHCO_3) utlenia wiązanie podwójne izopropenyłu, tworząc mostek epoksydowy pomiędzy C20–C29 **83** (85%, 2 h, t. pok.) (sch. 22 [142]).



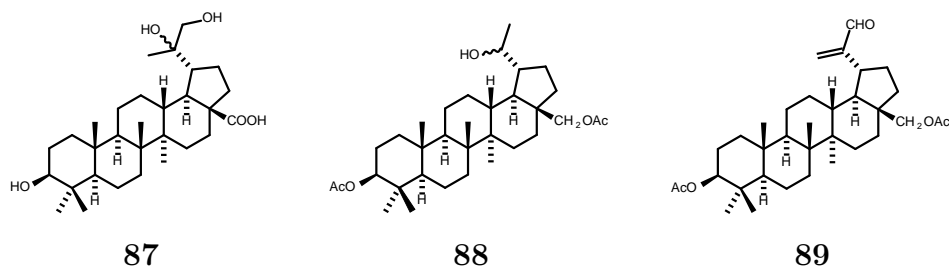
Schemat 22: Utlenianie dioctanu betuliny kwasem 3-chloronadbenzoesowym



Również w przypadku utleniania kwasu 23-hydroksybetulinowego głównym produktem jest związek z grupą 1,2-epoksyizopropylową (82%) [34].

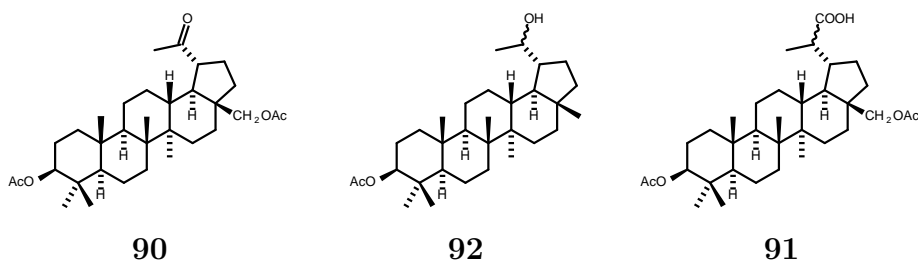
W wyniku utleniania dioctanu betuliny kwasem 3-chloronadbenzoesowym w CH_2Cl_2 (0–5 °C, 4 h) i rozszczepienia powstałego epoksydu 2M H_2SO_4 (0–5 °C, 2 h), powstaje mieszanina izomerów 3,28-diacetoksy-29-okso-lupanu **86** i 3,28-diacetoksy-30-hydroksy-lup-20(29)-en **85** [154].

Inaczej przebiega utlenianie kwasu betulinowego tym samym nadtlaniem kwasowym przy dłuższym czasie (5 h) w chlorku metylenu w temp. 20 °C. Obok nasyconych aldehydów analogicznych do **86** (50%), powstają typowe dla reakcji nadkwasu z wiązaniem podwójnym związki z dwoma dodatkowymi grupami hydroksylowymi **87** (40%) [34].



Dwufazowe utlenianie dioctanu betuliny mieszaniną kwas mrówkowy—woda utleniona 30% prowadzi do powstania mieszaniny izomerycznych noralkoholi (razem 47%)¹³ **88**, α - β -nienasyconego aldehydu **89** (2,5%), norketonu **90** (3%) i dwu izomerycznych dihydrokwasy **91** (wydajność niepodana) [100].

¹³Powstają one jako estry kwasu mrówkowego, który ulega selektywnemu wobec reszty octanowej odszczepieniu na żelu glinowym w trakcie izolacji.



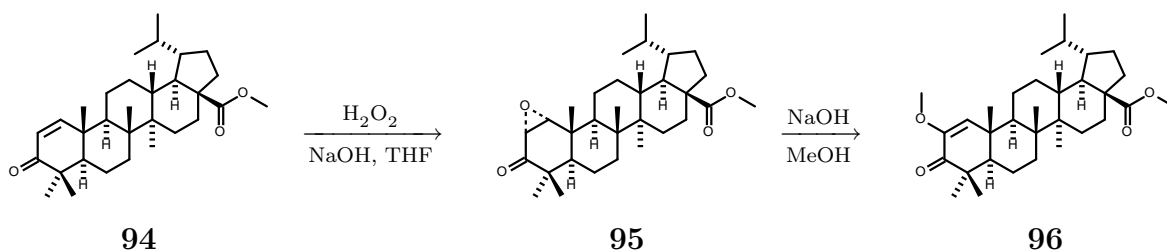
Podobne produkty powstają również, gdy substratami są lupeol lub octan lupenyli [100].

W obecności kwasu nadoctowego dioctan betuliny ulega utlenieniu do izomerycznych noralkoholi **88** i norketonu **90**. Analogicznie 3-octan lupenyli daje noralkohole (52%) **92** i norketon (8%) **93** [100].

Inne produkty powstają w wyniku jednofazowego utleniania kwasem nadbenzoesowym w chloroformie. Z dioctanu betuliny tworzą się: 30-hydroksy-dioctan betuliny, jako główny produkt **85**, norketon **90** oraz izomeryczne nasycone aldehydy **86RiS** [100].

Najprawdopodobniej utlenianie wiązania izopropenylowego w opisywanych związkach zachodzi poprzez izomeryczne bardzo nietrwałe epoksydy **83**, które można wyizolować jako produkty reakcji utleniania dioctanu betuliny kwasem mononadftalowym lub nadbenzoesowym w benzenie z szybkim usunięciem kwasu ze środowiska reakcji [100].

1-en-3-on estru metylowego kwasu dihydrobetulinowego **94** pod wpływem alkalicznego roztworu 30% H_2O_2 w THF, ulega enancjoselektywnej epoksydacji do $1\alpha,2\alpha$ -epoksydu estru metylowego kwasu dihydrobetulonowego **95** (95%), który w metanolowym roztworze NaOH ulega rozszczepieniu do **96** (schemat: 23) [223].



Schemat 23: Synteza i rozszczepienie $1\alpha,2\alpha$ -epoksydu estru metylowego kwasu dihydrobetulonowego

Katalizowane kwasem rozszczepienie mostka tlenowego epoksydu **83** prowadzi głównie do powstania nasyconych aldehydów **86** (R i S) i w mniejszym stopniu nienasyconego alkoholu **85**, który utlenia się następnie do nienasyconego aldehydu **89**. W dalszym etapie, zachodzą dwie konkurencyjne reakcje — utlenianie w reakcji Baera-Villigera do norketonu **90** i dihydrokwasu **91**.

Utlenianie produktów rozszczepienia epoksydu — mieszaniny noraldehidów **86RiS** — prowadzi do powstania mieszaniny noralkoholi **88** i dihydrokwasu (nasycony z grupą karboksylową przy C20) **91** [100].

Model oksygenazy — kompleks $[Fe(PA)_3]$ z 30% H_2O_2 w acetonitrylu (układ A) — jest dogodnym czynnikiem utleniającym pozycję allilową.

Dioctan betuliny pod działaniem tego układu ulega przekształceniu w nasycone aldehydy: R **86R** (15%) i S **86S** (29.8%), a w 41.4% pozostaje nieprzereagowany. Wśród produktów reakcji nie stwierdza się obecności epoksydów **83** [142].

5.2. Utlenianie

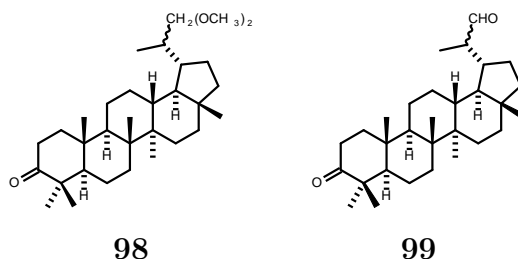
Zastąpienie kompleksu $[\text{Fe}(\text{PA})_3]$ mieszaniną $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ z dodatkiem kwasu pikolinowego, pirydyny i bezwodnika octowego (układ B) pozwala na wyizolowanie mieszaniny epoksydów **83** (37.8%) i niewielkich ilości izomerycznych aldehydów (odpowiednio: 5.3% i 4.1%) **86** (R i S) [142].

30% woda utleniona nie powoduje rozszczepienia epoksydu; konieczna jest obecność katalizatora — kwasu Brønsteda lub Lewisa.

Jak można przypuszczać, wyizolowana mieszanina epoksydów **83** pod działaniem układu A¹⁴, ulega dalej utlenieniu do aldehydów **97RiS** (z wydajnością 60%) [142].

W układzie, gdzie pikolinianowy kompleks żelaza jest tworzony *in situ*¹⁵ — układ B — praktycznie nie zachodzi żadna przemiana epoksydów (95% nieprzereagowanego substratu + ślady aldehydów R i S).

W wyniku rozszczepienia podobnego epoksydu — racematu 3-keto-20,29(RS)-epoksydylpanu — za pomocą stęż. kwasu mrówkowego w chloroformie w czasie 5 h, w atm. azotu, tworzy się prawie ilościowo mieszanina analogicznych do **86R** i **S** epimerów aldehydu. W środowisku reakcji powstają jako acetale **98**, które łatwo hydrolizują na żelu glinowym (przy oczyszczaniu) **99** [100].



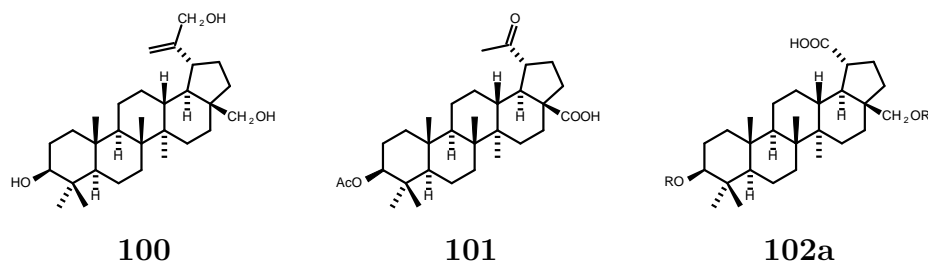
Kwas nadmrówkowy utlenia epoksydy **83** do mieszaniny noralkoholi **86** R i S (55%), α,β -nienasyconego aldehydu (4,5%) **89** i norketonu **90** (2.5%) [100].

Wymienione alkohole powstają jako estry kwasu mrówkowego, który ulega selektywnemu wobec reszty octanowej odszczepieniu na żelu glinowym w trakcie izolacji związków [100]

Izomeryczne noralkohole **86** pod działaniem CrO_3 w kwasie octowym utleniają się dalej do norketonu **90** z dobrą wydajnością (ok. 70%) [100].

Niektóre z opisanych pochodnych powstają również w wyniku ozonolizy grupy izopropenylowej.

W trakcie ozonolizy betuliny z następczą redukcją pozostałych po reakcji nadtlenuków siarczkiem dimetylu, tworzy się głównie norketon **90b** (70%) i triol **100** (10%) [123].

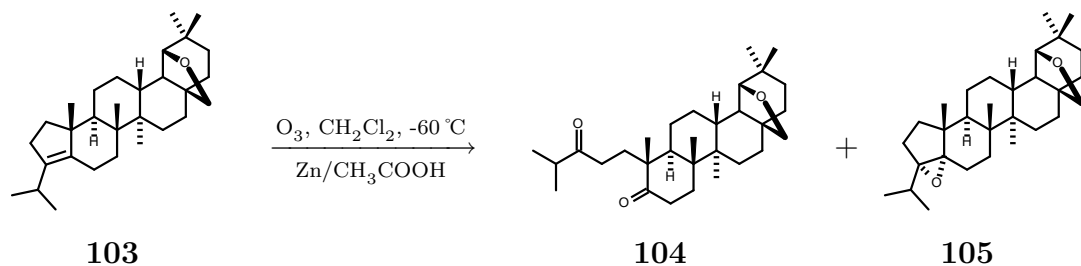


¹⁴ $[\text{Fe}(\text{PA})_3]$ jest kwasem Lewisa.

¹⁵Nie wiadomo do końca jaki kompleks żelaza jest tu tworzony.

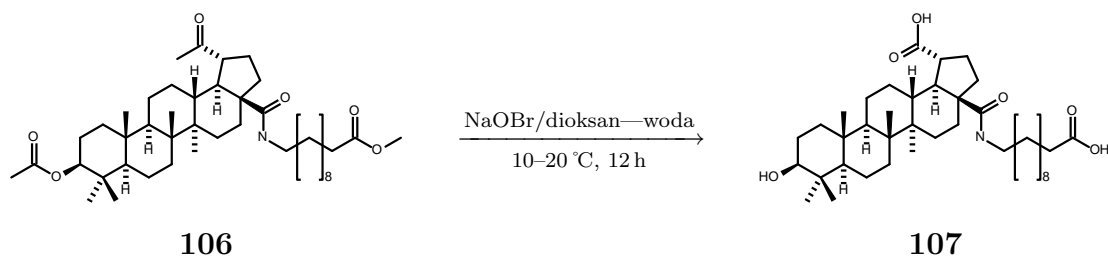
Kwas 3-acetoksy-betulinowy **41** utlenia się analogicznie dając norketokwas **101** (66%) [44].

Jeżeli wiązanie podwójne znajduje się wewnątrz pierścienia to ozonoliza może prowadzić do jego otwarcia lub/i utworzenia epoksydu. Przykładowo jeden z produktów izomeryzacji betuliny (str. 62) 19 β ,28-epoksy-A-neo-18 α -olean-3(5)-en **103** ulega przekształceniu do 4,5-seko-pochodnej allobetuliny **104** (56%) oraz 3 α ,5 α :19 β ,28-diepoksy-A-neo-18 α -oleanu **105** (14%) (schem. 24) [129].



Schemat 24: Ozonoliza 19 β ,28-epoksy-A-neo-18 α -olean-3(5)-enu

Norketon **90** pod działaniem CrO_3 łatwo przechodzi w 29,30-di-norkwas **102a** [211]. Podobnie grupa acetylowa przy C-19 w związku N-(3 β -acetoksy-30-nor-20-okso-lupan-28-oilo)-11-amino-undekanianu metylu **106**, ulega degradacji do karboksylowej pod wpływem brominu sodowego NaOBr i powstaje **107** (10–20 $^\circ C$, 12 h, 38%) schemat 25 [44].



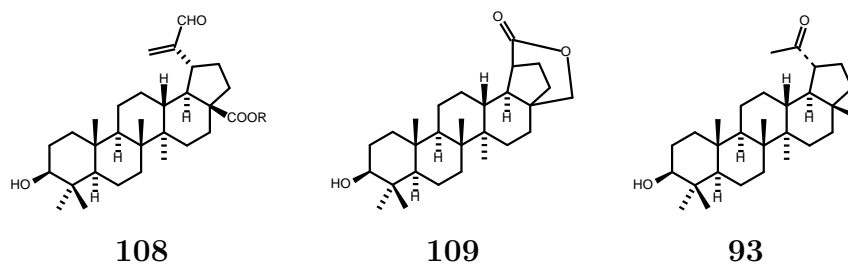
Schemat 25: Utlenianie grupy ketonowej za pomocą NaOBr

Ditlenek selenu w sąsiedztwie wiązania podwójnego wprowadza grupę hydroksylową lub/i aldehydową. Z dioctanu betuliny w etanolu (SeO_2 : dioctan betuliny 1 : 1 (mol), 48 h w t.w., w atm. argonu) powstają: 3,28-diacetylo-lup-20(29)-en-30-al **89** (10.5%) [63, 211] i 3,28-diacetylo-30-hydroksy-lup-20(29)-en **85** (9.5%) [63].

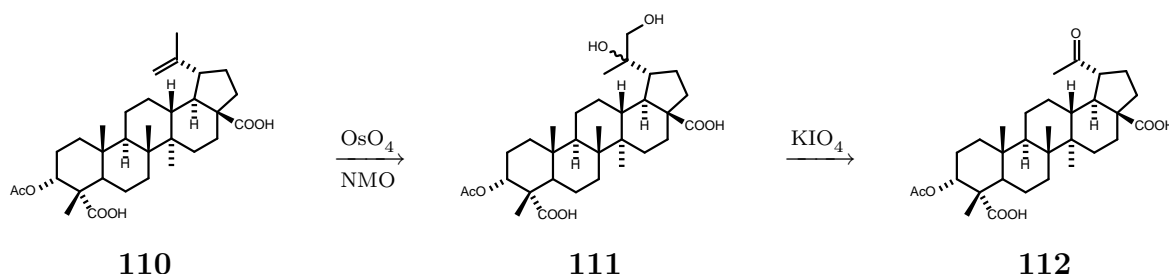
W bardziej polarnym rozpuszczalniku — mieszaninie woda—dioksan—kwas octowy 2:2:1 — wydajność reakcji jest większa. Z kwasu betulinowego lub betulinianu metylu powstają odpowiednio α,β -nienasycone aldehydy (ok. 50%) **108 a** (R=H) i (ok. 70%) **108 b** (R=CH₃) [34].

30-okso pochodna dioctanu betuliny **89** utleniana CrO_3 , z dobrą wydajnością (ok. 50%) daje dinor-pochodną — kwas 3,28-diacetylo-20,29-dinor-19-karboksylowy **102a** (R=Ac) [211]. Związek ten po hydrolizie alkalicznej daje **102b** (R=H), który pod wpływem kwasu 4-toluenosulfonowego w bezwodniku octowym epimeryzuje i ulega laktonizacji **109** [211].

5.3. Dehydrogenacja

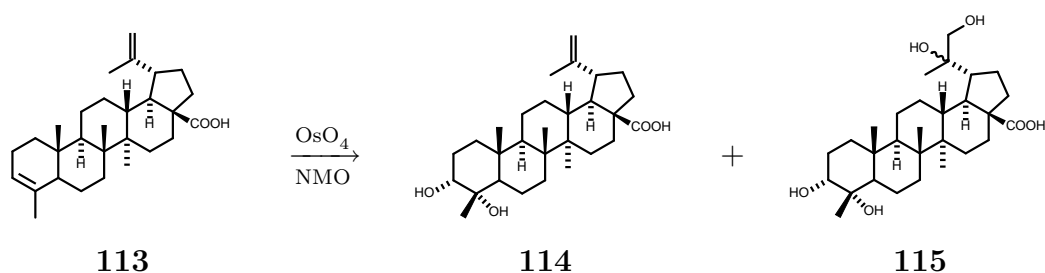


Układ OsO_4/NMO w mieszaninie aceton—woda 8:2 w czasie 48 h w temp. 20 °C utlenia wiązanie podwójne izopropenyłu, wprowadzając dwie grupy hydroksylowe. Pochodna kwasu 3-epibetulinowego **110** utlenia się do mieszaniny diastereoizomerycznych dioli (20RS) **111** (75%) [77, 120]. Alkohole **111** ulegają ilościowo utlenieniu do nor-pochodnej **112** pod wpływem KIO_4 w $\text{MeOH—H}_2\text{O}$ 8:2 w czasie 20 h, w 20 °C (sch. 26) [120].



Schemat 26: Hydroksylacja funkcji izopropenyłowej kwasu 3-epi-23-karboksybetulinowego

W związku **113** pod działaniem OsO_4/NMO utleniane jest z większą selektywnością wiązanie podwójne wewnątrz pierścienia — powstają: **114** (30%) i **115** (15%) (schemat 27) [120].

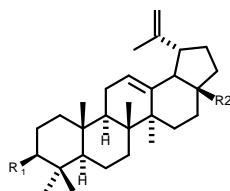


Schemat 27: Hydroksylacja kwasu 23-nor-lupa-3,20(29)-dien-28-owego

5.3 Dehydrogenacja

Dehydrogenację betuliny i lupeolu octanem rtęci(II) opisano już w 1942 r. [7]. Na jej przebieg nie ma wpływu rodzaj grupy funkcyjnej w pozycji C-17. Zachodzi ona jednakowo w przypadku: lupeolu, betuliny i dioctanu betuliny. Warunkiem koniecznym zajścia tej reakcji jest obecność wiązania podwójnego w cząsteczce; pochodne uwodornione (20,29-dihydro) nie podlegają utlenieniu octanem rtęci(II) [7].

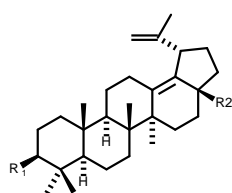
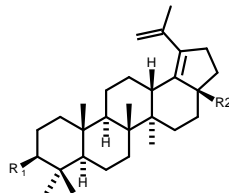
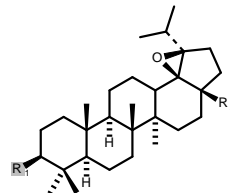
Reakcję dehydrogenacji powtórzyli w 1961 r. *Allison i wsp.* i na podstawie widm UV, IR oraz przekształceń chemicznych zaproponowali, że nowe wiązanie podwójne wprowadzane jest pomiędzy C-12 a C-13 **116** [7].

**116**

Dodatkowo stwierdzili, iż jeśli grupa hydroksymetylowa betuliny ($R_2=CH_2OH$) lub karboksylowa kwasu betulinowego ($R_1=CH_2OH$) nie są zabezpieczone, to w warunkach kwaśnego środowiska reakcji odwodornieniu towarzyszy reakcja eteryfikacji i powstają cykliczne etery [7]. Dioctan betuliny, tworzy w reakcji dehydrogenacji niesprzężony dien. Podobnie jest w przypadku: lupeolu, α -lupenu, lup-20(29)-en-3-onu, 3-octanu- i 3-benzoesanu lupenyłu [6, 7]. Do zajścia reakcji konieczne jest użycie nadmiaru octanu rtęci — na 1 g BET 17 g soli w mieszaninie chloroform—kwas octowy (30 ml+370 ml) i ogrzewane przez 5 h w 100 °C lub trzymanie przez 14 dni w 20 °C [6].

Zaproponowano modyfikację tej metody i dehydrogenację octanu lupenyłu przeprowadzono z mniejszą ilością octanu rtęci (4,5 g na 1 g triterpenu) w kwasie propionowym w t.w. przez 30 min (wyd. 60%) [186].

Analiza widm NMR, dehydropochodnej betulianu metylu, wykazała, że nie ma sygnału od protonu winylowego przy C-12. Zaproponowana więc została skorygowana struktura **117** [24].

**117****118****119**

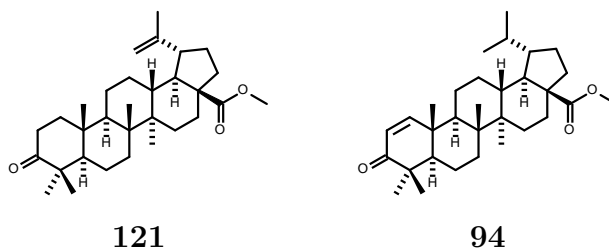
Obecnie produktowi dehydrogenacji przypisuje się wzór **118** [185]. Struktura ta została potwierdzona wynikami analizy rentgenograficznej oksypochodnej **119** [185].

Związek **119** otrzymano przez utlenienie kwasem nadbenzoesowym dioctanu 20,29-dihydro-18,19-dehydrobetuliny **120**¹⁶ [185].

Sąsiadujące ze sobą wiązania podwójne związku **118**, nie są sprzężone. Jest to spowodowane brakiem ich koplanarności. Potwierdza to anomalna absorpcja w UV (λ_{\max} 207 nm $\epsilon = 7000$) [185].

Dehydrogenację w pozycji α grupy ketonowej możliwa jest pod działaniem chlorku fenyloseleniowego (PhSeCl) i następnie kwasu 3-chloronadbenzoesowego w mieszaninie octan etylu-pirydyna. Ester metylowy kwasu dihydrobetulonowego **121** utlenia się do 1-en-3-onu **94** (63%) [223].

¹⁶Tzn. produktu selektywnej hydrogenacji dioctanu 18,19-dehydrobetuliny **118** ($R_1=AcO$, $R_2=CH_2OAc$ (str. 49) powstałego w wyniku uwodornienia egzocyklicznego wiązania podwójnego na katalizatorze PtO_2 .



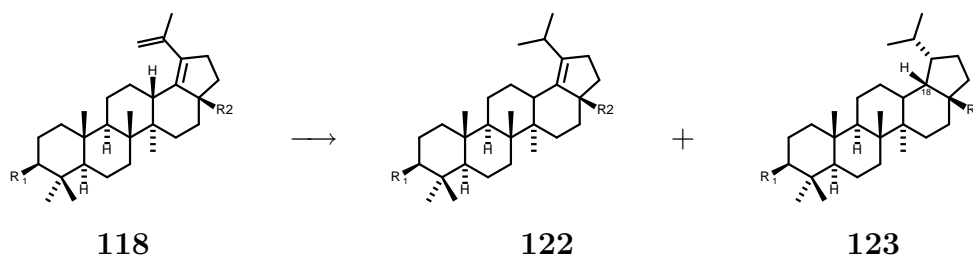
5.4 Hydrogenacja

Uwodornienie wiązania podwójnego zachodzi z bardzo dobrą wydajnością przez bezpośrednie przyłączenie wodoru przy udziale katalizatora.

Z reguły jest to pallad na węglu aktywnym [114] lub tlenek platyny (katalizator Adamsa) [72, 102]. Redukcję tą przeprowadza się najczęściej w kwasie octowym, dlatego konieczne jest zabezpieczenie reaktywnej funkcji przy C-17: karboksylowej lub hydroksymetylowej, aby nie zachodziła izomeryzacja.

Homogeniczne uwodornienie/deuterowanie można przeprowadzić przy użyciu katalizatora Wilkinsona, tj. chlorku *tris*(trifenylfosfina)rodu(I). Zaletą tej metody jest wysoka selektywność redukcji wiązań egzocyklicznych wobec endocyklicznych, czy wprowadzonej grupy nitrylowej z wydajnością prawie ilościową [156]¹⁷.

Uwodornienie innych pochodnych betuliny zachodzi niejednokrotnie z izomeryzacją wiązania podwójnego. Przeprowadzenie redukcji na PtO₂ pozwala na dość selektywną redukcję egzocyklicznego wiązania podwójnego. W wyniku uwodornienia 3,28-dioctanu 18,19-didehydrobetuliny **118** (R₁=OAc, R₂=CH₂OAc) powstają dwie pochodne: **122** (20,29-dihydro-) i **123** (18,19,20,29-tetrahydro-) w stosunku 7:3.

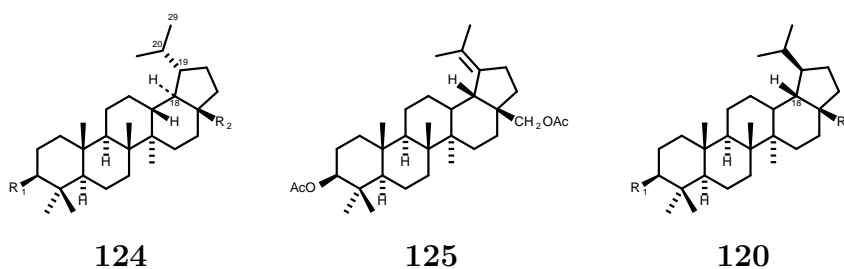


Schemat 28: Częściowa i całkowita hydrogenacja 3,28-dioctanu 18,19-didehydrobetuliny

Związek **123** ma odwróconą konfigurację przy C-18 (18βH) w odróżnieniu od dioctanu dihydrobetuliny (18αH) **124** [187].

W obecności innego, mniej aktywnego katalizatora — Pd/BaSO₄ — związek **122** (R₁=OAc, R₂=CH₂OAc) ilościowo tworzy produkt addycji 1,4 z wiązaniem podwójnym *egzo* w pierścieniu E **125** [187].

¹⁷Autorzy przeprowadzali reakcję w mieszaninie benzen—etanol (4 : 1), stwierdzając, że jej wydajność zależy od ilości katalizatora, którego używali w stosunku 1 : 1 (wagowym) do substratu. Jednak RhCl(PPh₃)₃ pod wpływem benzenu ulega przekształceniu do trudno rozpuszczalnego Rh₂Cl₂(PPh₃)₄.



Uwodornienie tego związku w obecności katalizatora PtO_2 daje ostatecznie związek **120** o konfiguracji $18\beta\text{H}$ [187].

5.5 Estryfikacja

Najstarsze wytworzone przez człowieka estry betuliny odkryto w niektórych antycznych dziegiach brzozowych. Analiza chemiczna znalezisk z czasów rzymskich w West Cotton i Catterick (Wielka Bryt.): — lepiszcza stłuczonego naczynia ceramicznego i zawartości szkliwionego naczynia — wykazała obecność połączeń estrowych betuliny i w mniejszym stopniu lupeolu z długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi: laurynowym (14:0), palmitynowym (16:0), stearynowym (18:0) i oleinowym (18 : 1). Powstały one najprawdopodobniej podczas ogrzewania dziegiu brzozowego z tłuszczem zwierzęcym w temperaturze powyżej $300\text{ }^\circ\text{C}$ w celu nadania lepiszczu odpowiednich właściwości adhezyjnych [36].

Estryfikacja jest jedną z najczęściej stosowanych metod upochadniania związków. Betulina jest diolem z grupami hydroksylowymi: pierwszo- i drugorzędową. Pod wpływem bezwodników kwasowych w pirydynie lub innej trzeciorzędowej aminie łatwo tworzy estry. Często dodatkowo stosuje się dodatek DMAP jako katalizatora. Innym dogodnym sposobem estryfikacji betuliny i kwasu betulinowego, jest użycie roztworu chlorku kwasowego w pirydynie najczęściej z DMAP jako katalizatorem. Również stapianie stałych bezwodników jak: maleinowy, fumarowy, tereftalowy z betuliną, może służyć do syntezy jej diestrów [16, 207]. Estryfikacji betuliny nie przeprowadza się za pomocą kwasów, gdyż katalizują one tworzenie wiązania eterowego pomiędzy grupą hydroksymetylenową (C-17) a izopropenyłową (C-19) (*vide* konwersja do allobetuliny –61), i reakcja ta może stać się dominującą, zwłaszcza w podwyższonej temperaturze. Przykładowo w trakcie estryfikacji betuliny kwasem mrówkowym na gorąco, powstaje głównie 3-mrówczan allobetuliny [16, 117].

Porównanie reaktywności pierwszorzędowych grup hydroksylowych: betuliny i glikolu dietylenowego¹⁸ w reakcji estryfikacji chlorkiem benzoilu wskazuje, że stała szybkości reakcji betuliny (k) jest od 2–3rzędów mniejsza niż glikolu. Zmiana polarności rozpuszczalnika w szeregu: 1,4-dioksan, chloroform, dichloroetan, nie ma większego wpływu na reaktywność grup hydroksylowych betuliny. W mocno polarnym rozpuszczalniku — pirydynie — reaktywność wzrasta, aczkolwiek nadal jest 25-krotnie mniejsza niż funkcji hydroksylowej w glikolu dietylenowym [207]. Natomiast drugorzędowa grupa hydroksylowa betuliny (C28) jest 4-krotnie mniej reaktywna w porównaniu z pierwszorzędową (C3) — dla grup hydroksylowych betuliny $k_1=16$ [$\text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$], $k_2=4$, a dla glikolu dietylenowego $k_{1,2}=420$ [207].

Niektóre silne kwasy i ich bezwodniki estryfikują betulinę już na zimno. Próba utleniania betuliny dwoma równoważnikami DMSO aktywowanego bezwodnikiem kwasu trifluorooc-

¹⁸Grupy OH glikolu wykazują niezależną reaktywność — podstawienie jednej nie wpływa zauważalnie na drugą.

5.5. Estryfikacja

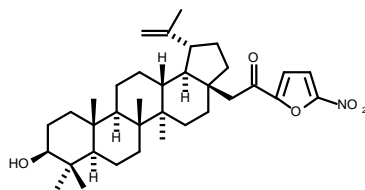
towego prowadzi do powstania wyłącznie estrów: 3,28-bis(trifluorooctanu)- (71%) i 28-trifluorooctanu betuliny (14%) [11].

Dość znaczna różnica reaktywności obu grup hydroksylowych pozwala na selektywną estryfikację betuliny lub hydrolizę jej diestrów. Przeprowadzenie reakcji na zimno pozwala na estryfikację pierwszorzędowej grupy hydroksylowej betuliny. Przykładowo działanie bezwodnikiem octowym w pirydynie w temp. 0 °C przez 40 min pozwala uzyskać 28-octan betuliny z wydajnością ponad 60% [206]. Gdy reagenty są bardziej rozcieńczone, reakcję można przeprowadzać w temperaturze pokojowej. W mieszaninie pirydyna—CH₂Cl₂—bezwodnik octowy 6 : 36 : 0,9 (v:v:v) z dodatkiem DMAP 1%(w/w) przez 18 h z wydajnością 60–72% [32].

Rozpuszczalnikami a równocześnie katalizatorami mogą być inne aminy. Betulina z 1.5 krotnym nadmiarem chlorku acetylu w bezwodnym CH₂Cl₂ z trietyloaminą w 0 °C ulega selektywnej estryfikacji do 28-octanu betuliny (69%) [72].

W trakcie syntezy serii estrów ftalowych betuliny i kwasu betulinowego, wykazano, że do wydajnej estryfikacji konieczny jest 5–10 krotny nadmiar molarny bezwodnika ftalowego, przy czasie reakcji 24 h we wrzącej pirydynie z dodatkiem DMAP (równomolarnym w stosunku do bezwodnika) [111].

Chlorki kwasów z dużą zawadą przestrzenną chętniej reagują z pierwszorzędową grupą hydroksylową betuliny. Reakcja betuliny z chlorkiem kwasu 5-nitro-2-furanowego przebiega w ciągu 1.5 h w CH₂Cl₂ z TEA w 0 °C z utworzeniem 28-estru **126** z wydajnością 52% [130].



126

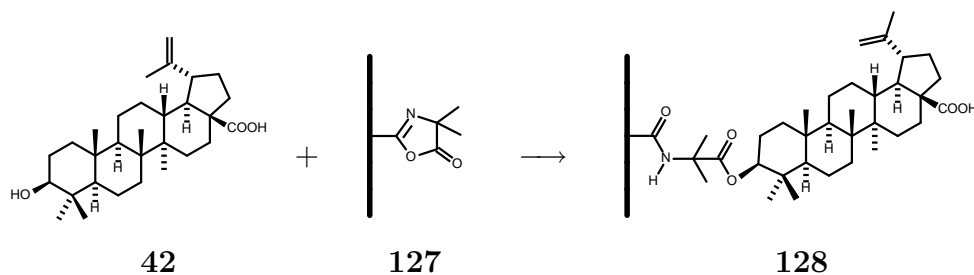
Kompleks hafnu HfCl₄ · (THF)₂ (5mol%) w chlorobenzynie, katalizuje selektywną estryfikację pierwszorzędowej grupy hydroksylowej betuliny nawet z dużymi objętościowo podstawnikami. W ten sposób otrzymano 28-pochodną z kwasem cykloheksanokarboksylowym (reflux azeotropowy, 16 h) z wydajnością 91%. Kosztowny katalizator jest stabilny w warunkach reakcji i można go odzyskać [76].

3-monoestry betuliny powstają w trakcie hydrolizy diestrów betuliny przy użyciu stechiometrycznej ilości alkoholowego roztworu zasady (wodorotlenku lub węgla). Reakcja przeprowadzana jest w temp. pokojowej w czasie kilkunastu godzin [210].

Estryfikacja kwasu betulinowego bezwodnikiem octowym bez dodatku octanu sodowego (bezwodnego) powoduje powstanie mieszanego bezwodnika 3-octanu kwasu betulinowego [85].

W reakcji z trifluorooctanem pentafluorofenyłu w pirydynie, w temp. 20 °C, kwas betulinowy tworzy ester — 3-trifluorooctano-betulinian pentafluorofenyłu. Wysoka reaktywność grupy pentafluorofenyłowej jest w tym połączeniu hamowana ograniczoną do niej dostępnością przez zawadę przestrzenną ze strony triterpenu, dlatego hydrolityczne odszczepienie tej grupy przez metanolan sodowy lub amoniak wymaga zwiększonego ciśnienia i wysokiej temperatury [228].

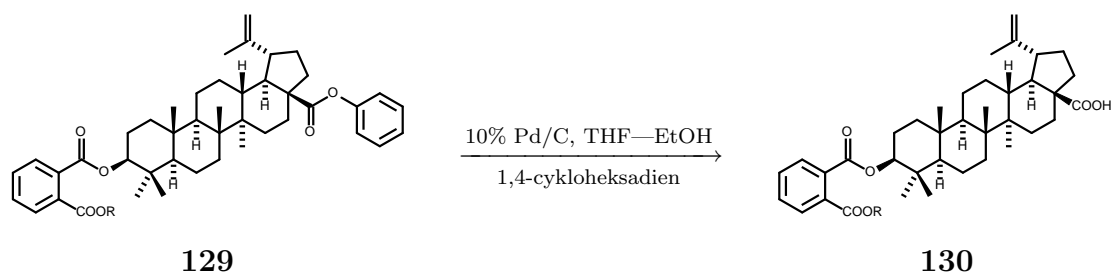
Reakcja estryfikacji grupy hydroksylowej kwasu betulinowego z ugrupowaniem azlaktanowym koploimeru bis-akrylamidowego **127**, zachodzi w temperaturze pokojowej (1 h) i posłużyła do przygotowania kolumny powinowactwa (schemat 29) [203].



Schemat 29: Przyłączenie kwasu betulinowego do kopolimeru bis-akrylamid—azlakton w reakcji estryfikacji

W reakcji kwasu betulinowego z CH_3I w bezwodnym THF z DBU jako katalizatorem powstaje betulinian metylu z wydajnością 71% [60]. Ester ten powstaje ilościowo w reakcji triterpenu z eterowym roztworem diazometanu [111]. Betulinian metylu nie ulega hydrolizie, nawet w trakcie ogrzewania w t.w. z 1 M NaOH w DMF, ani w metanolu z $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ [60].

Grupa karboksylowa kwasu betulinowego może być selektywnie estryfikowana za pomocą bromku benzylu w obecności DBU (wyd. 85%). Reszta alkoholu benzyloвого może być selektywnie odszczepiona w obecności Pd/C z 1,4-cykloheksadienem w bezwodnej mieszaninie THF—EtOH (10 h w 30 °C); hydrolizę hemifalalanów betulinianu benzylu przedstawiono na schemacie 30 ($\text{R}=\text{CH}_3$ 88%, C_2H_5 85%) [111].



Schemat 30: Selektywna hydroliza metylo- i etylo-ftalanu betulinianu benzylu ($\text{R}=\text{CH}_3$ lub C_2H_5)

Za pomocą 5% SO_3 w DMSO ¹⁹ zsyntetyzowano 3-siarczan kwasu betulinowego. Reakcja zachodzi ilościowo w czasie 15–20 min w 20 °C [66].

Niektóre mieszane estry betuliny mają nadzwyczaj silne właściwości biologiczne. 3-O-(3',3'-dimetylobursztynylo)-28-O-(2',2'-dimetylobursztynylo)-betulina w stężeniu 0,87 nM hamuje w 50% (EC_{50}) replikację wirusa HIV-1 (TI 42400 co jest porównywalne z aktywnością AZT). Diester ten powstaje jako jeden z czterech izomerów w trakcie reakcji betuliny z bezwodnikiem kwasu 2,2-dimetylobursztynowego we wrzącej pirydynie [90]. Ze względu na zawadę przestrzenną powstaje w trakcie tej reakcji w śladowych ilościach. Inny sposób polega na dwuetapowej estryfikacji. Kwas 2,2-dimetylobursztynowy reaguje z betulina tworząc dwie pochodne 7 (63%) i 8 (15%). Po rozdzieleniu, związek 8 reaguje

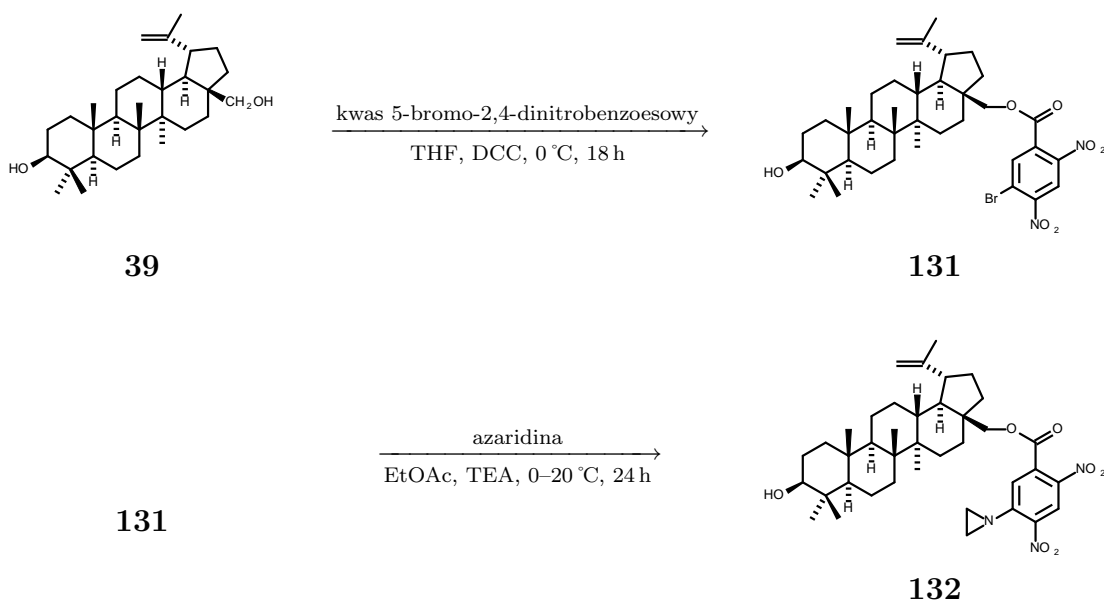
¹⁹Otrzymanego przez rozpuszczenie ciekłego SO_3 w DMSO .

5.6. Eteryfikacja

z chlorkiem kwasowym **13a**, który po deprotekcji grupy karboksylowej kompleksem palladu — $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$ w morfolinie daje diester [90].

Estryfikacja metodą Steglicha pozwala na przyłączenie w łagodnych warunkach wrażliwych funkcji estrowych; gdzie DCC jest czynnikiem aktywującym funkcję karboksylową, a DMAP katalizuje estryfikację.

28-ester betuliny z kwasem 5-bromo-2,4-dinitrobenzoesowym otrzymano w zmodyfikowanej reakcji Steglicha z wydajnością 75% (schemat: **31**) [130].

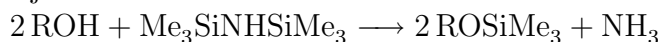


Schemat 31: Synteza estrowych nitropochodnych betuliny

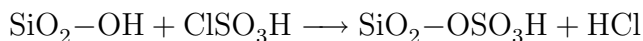
Funkcja halogenowa estru **131** — 28-(5'-bromo-2',4'-dinitro)-benzoesan betuliny — reaguje stosunkowo łatwo z azaridyną dając 28-(5'-azaridinylo-2',4'-dinitro)-benzoesan betuliny **132** [130].

5.6 Eteryfikacja

Przyłączenie podstawników trimetylosililowych do betuliny można dogodnie przeprowadzić z użyciem taniego odczynnika sililującego jakim jest HMDS — 1,1,1,3,3,3-heksametylosilazan $((\text{CH}_3)_3\text{SiNHSi}(\text{CH}_3)_3)$. Reakcja zachodzi w łagodnych warunkach a jedynym produktem ubocznym jest amoniak:



Katalizatorem reakcji jest siarczan krzemionki, który można łatwo otrzymać w reakcji krzemionki z kwasem chlorosulfonowym w CH_2Cl_2 w 20 °C (0,5 h wkraplania kwasu + 0,5 h mieszania):



Zastosowanie 1.5 krotnego równoważnika HMDS powoduje estryfikację obydwu grup hydroksylowych betuliny w 92% w czasie ogrzewania przez 50 minut we wrzącym CHCl_3 . Użycie mniejszej ilości HMDS (jednokrotny równoważnik) pozwala w tych samych warunkach na selektywną estryfikację pierwszorzędowej grupy hydroksylowej w 36% [82].

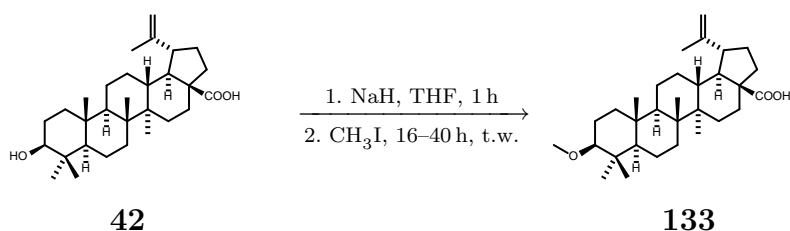
Duże podstawniki jak grupa *tert*-butylo-dimetylosiloksanowa, eteryfikują w głównej mierze grupę pierwszorzędową betuliny. Konieczna jest jednak obecność imidazolu jako katalizatora; betulina (0,14mmol) w DMF (2,5ml) z dodatkiem 0,16mmol DMAP i imidazolu 0,46mmol oraz 0,27mmol TBSCl daje 28-*tert*-butylo-dimetylosiloksylobetulinę (86%) [72]. Analogicznie z betulinianu metylu otrzymano 3-eter dimetylo-*tert*-butylosililowy [44].

Grupa eterowa — dimetylo-*tert*-butylosililowa — pod wpływem zawiesiny bezwodnego FeCl_3 (kwasu Lewisa) w mieszaninie THF—acetonitryl (1 : 1) ulega odszczepieniu w 20 °C (12 h) [44].

Reakcja betuliny z chlorkiem trifenylometylu (w DMF z dodatkiem DMAP) daje jako wyłączny produkt monoeter — 28-O-trifenylometylo-betulinę. Podstawnik ten łatwo ulega odszczepieniu pod działaniem wrzącego PPTS w CH_2Cl_2 —EtOH lub ZnCl_2 w 95% DMF [92]. Jednocześnie grupa ta nie ulega odszczepieniu w trakcie uwodornienia na katalizatorze Pd/C [92].

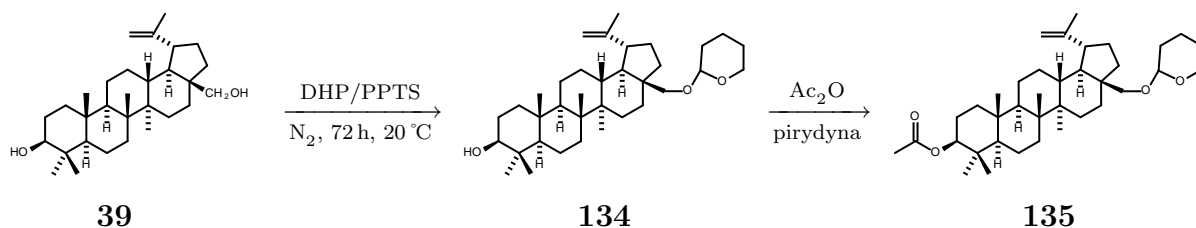
Zabezpieczenie funkcji karboksylowej kwasu betulinowego dogodnie można przeprowadzić w reakcji jej eteryfikacji dwoma równoważnikami bromku allilu w DMF z dodatkiem K_2CO_3 (3mol) w 55 °C przez 7 h (84%) [60]. Deprotekcję katalizuje kompleks — tetrakis(trifenylfosfina)pallad (0) — w bezwodnym THF z dodatkiem piperolidyny i $(\text{Ph})_3\text{P}$. Notowana dla pochodnych 3-O-glikozydowych wydajność tej reakcji wynosi 41–50% [60].

Grupa hydroksylowa kwasu betulinowego **42** ulega ilościowo eteryfikacji za pomocą CH_3I w środowisku bezwodnego THF z dodatkiem NaH (16–24 h, t.w.) schemat 32 [44].



Schemat 32: Synteza kwasu 3-metoksybetulinowego (kwasu 3 β -metoksy-lupe-20(29)-en-28-owego)

Pierwszorzędowa grupa hydroksylowa betuliny z dihydropiraniem (DHP), w obecności 4-toluenosulfonianu pirydyniowego (PPTS) jako katalizatora, selektywnie tworzy eter tetrahydropiranylowy w postaci diastereomerycznej mieszaniny, (95%). Pozwala to np. na swobodną estryfikację hydroksylu drugorzędowego przy C-3 bezwodnikiem octowym (87%) (schemat: 33). Hydrolityczna deprotekcja grupy hydroksylowej przy C-28 zachodzi

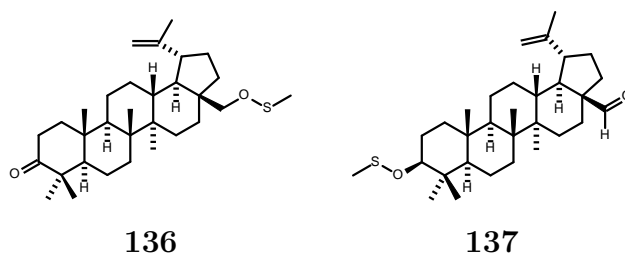


Schemat 33: Selektywne zabezpieczenie grup hydroksylowych betuliny

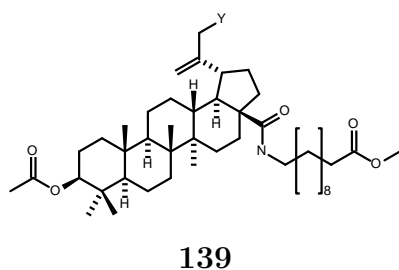
5.7. Połączenia azotowe

w dość łagodnych warunkach pod działaniem metanolowego roztworu 4-toluenosulfonianu pirydyniowego w czasie 36 h w 20 °C (95%) [97].

Tioetery Podczas utleniania betuliny 2-krotnym lub większym nadmiarem DMSO aktywowanego bezwodnikiem octowym²⁰ (24–48 h, 20 °C) w CH₂Cl₂ powstają dwa związki: eter 3-okso-28-O-metylotiometylowy **136** (73%) i eter 3-metylotiometylo-28-okso-betulinowy **137** (14%) [11].



W reakcji π -allilopalladowania Trost-Tsuji N-[3 β -acetoksy-30-bromo-lup-20(29)-en-28-oilo]-11-amino-undekanian metylu **138** (72 h, 20 °C) tworzy w zależności od użytego substratu allilotioetery. Reakcja przebiega we wrzącym, bezwodnym THF przez tydzień z katalizatorem Pd[(C₆H₅)₃]₄²¹ [44].



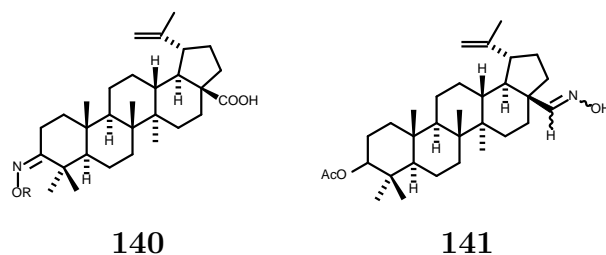
- a: Y=SCH₂CH₂OH
- b: Y=SCH₂CH₂N(CH₂CH₃)₂
- c: Y=SCH₂COOC₂H₅
- d: Y=SC₆H₄pF

5.7 Połączenia azotowe

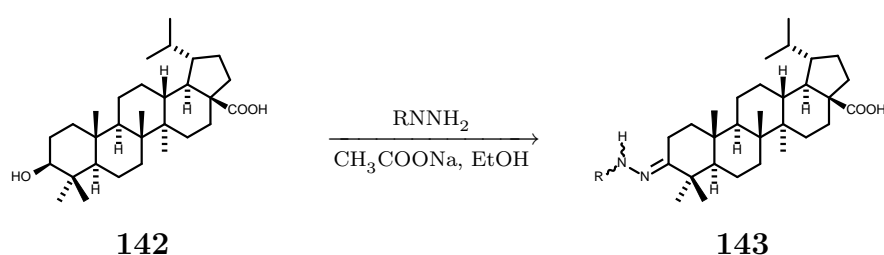
Grupa ketonowa kwasu betulonowego (3-keto-betulinowego) **43** reaguje łatwo z aminami z utworzeniem odpowiednich oksymów. W środowisku etanolu z dodatkiem NaOAc lub w pirydynie z chlorowodorkiem hydroksyloaminy lub metoksyloaminy, ilościowo tworzy oksymy **140a** (R=H) **140b** (R=CH₃) [91, 96]. Podobnie zachowuje się grupa karbonylowa 3-octanu aldehydu betulonowego, dając z hydroksyloaminą pochodną **141** [218].

²⁰Odczynnik Swerna.

²¹Kompleks palladu tworzony jest *ex tempore* przez zmieszanie roztworu octanu palladu (II) w THF z (Ph₃)P i TEA w czasie 30 min.

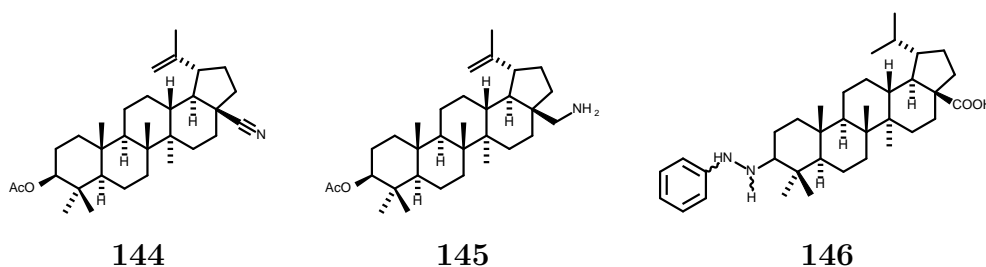


Wydajności z jakimi tworzone są hydrazony w dużym stopniu zależą od reaktywności odczynników. Kwas dihydrobetulonowy **142** tworzy hydrazony **143a** ($R=C_6H_2(2,4,6)Cl_3$), **b** ($R=COC_6H_5$) i **c** ($R=C_6H_4(4)F$) z wydajnościami: 80%, 70% i 25% (sch. 34) [134].



Schemat 34: Synteza 3-hydrazonów

Dehydratacja oksymów pozwala przekształcić je w nityle. Np. podczas ogrzewania oksymu 3-octanu-lup-20(29)-en-28-alu **141** z bezwodnikiem octowym tworzy się nityl **144** (wyd. ok. 80%), który zredukowany za pomocą $LiAlH_4$ w eterze tworzy 28-aminopochodną **145** [218].



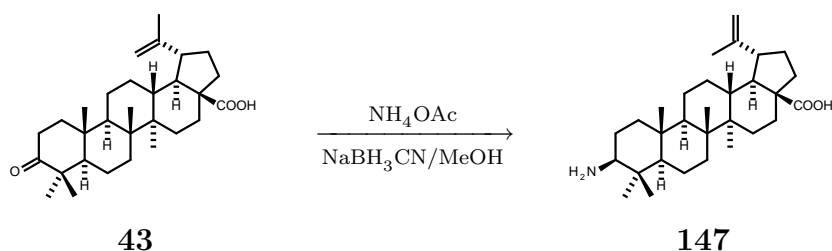
Redukcja za pomocą wodoru jest równie skutecznym sposobem przekształcenia w aminopochodną, ale podlega jej także wiązanie podwójne grupy izopropenylowej. 3-fenylhydrazon kwasu 20,29-dihydrobetulinowego **143b** zredukowany wodorem w kwasie octowym z PtO_2 (lub gąbką platynową) jako katalizatorem, tworzy mieszaninę izomerów **146** [135].

Reduktywna aminacja kwasu betulonowego **43**, przy pomocy NH_4OAc i $NaBH_3CN$ w metanolu, pozwala na wprowadzenie funkcji aminowej przy C-3 (wyd. ok. 80%). Izomer β powstaje w przewadze, tj. ułamek $\beta:\alpha$ wynosi 95 : 5 (sch. 35) [96].

Autorzy [91] powtórzyli tę reakcję i podają, że stosunek izomerów wynosi $\beta:\alpha$ 3 : 1. Proponują redukcję **43** za pomocą NH_4OAc , $TiCl_3$ i $NaBH_3CN$ w mieszaninie metanol—THF, gdzie ułamek $\beta:\alpha$ wzrasta do 9 : 1.

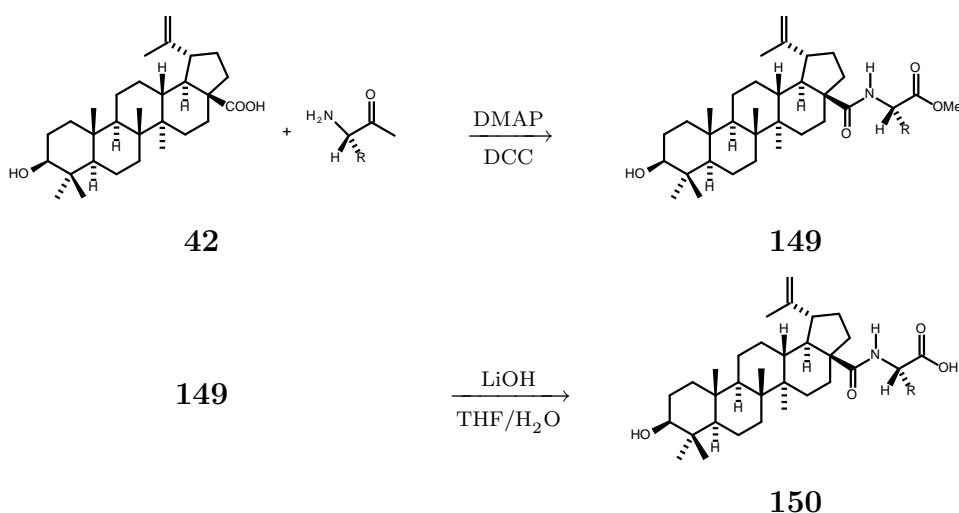
Znany jest szereg połączeń amidowych kwasu betulinowego i jego pochodnych [44, 68, 79, 183]. Niektóre z pochodnych amidowych, posiadają silne działanie farmakologiczne, np. hamujące replikację wirusa HIV-1 np: **148** [183].

5.7. Połączenia azotowe



Schemat 35: Reduktywna aminacja kwasu betulonowego

Połączenia kwasu betulonowego z aminokwasami charakteryzujące się większą polarnością i rozpuszczalnością w wodzie w porównaniu do wyjściowego triterpenu. Połączenia takie utworzono w reakcji triterpenu z estrami metylowymi aminokwasów w obecności DCC (1,3-dicykloheksylokarbodiimidu) i DMAP (20 °C, atm. azotu). Odszczepienie grupy metylowej po reakcji kondensacji, realizowano hydrolytycznie, działając roztworem LiOH w mieszaninie THF—woda (20 °C, atm. azotu) (schemat: 36 [79]).



Schemat 36: Synteza koniugatów kwasu betulonowego z L-aminokwasami

W ten sposób uzyskano połączenia z aminokwasami jak: fenyloalanina, tyrozyna, glicyna, methionina, tryptofan, izoleucyna, kwas asparaginowy, leucyna, kwas glutaminowy, alanina, prolina, walina.

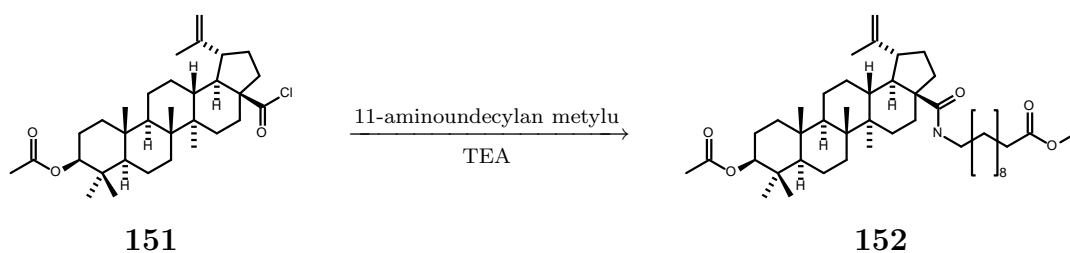
Innym sposobem syntezy amidopochodnych jest reakcja chlorku kwasu 3-acetylo-betulinowego **151**²² z odpowiednią aminą lub alkoholem w środowisku trietyloaminy (TEA) (sch. 37) [44].

Związek **152** łatwo ulega bromowaniu w pozycji allilowej (p. str. 60) do **138**.

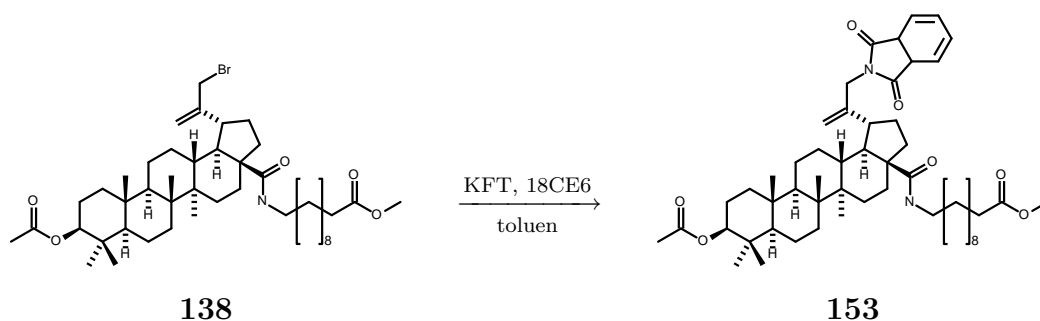
W reakcji z ftalimidkiem potasowym (KFT) w toluenie z 18-korona-6-eterem (18CE6) jako katalizatorem, związek **138** tworzy ftalimid **153** (85 °C, 8 h, 73%) (sch. 38) [44].

W reakcji π -allilopaladowania Trost-Tsuji **138** tworzy odpowiednio amid **154** lub imid **155** [44].

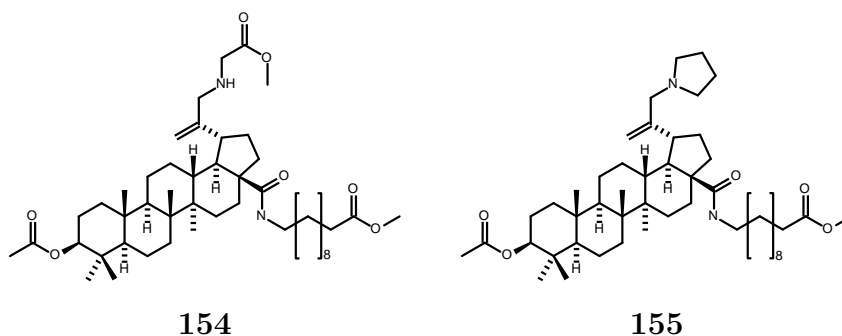
²²Schemat otrzymywania chlorku kwasu betulonowego na str. 60.



Schemat 37: Synteza N-[3β-hydroksy-lup-20(29)-en-28-oilo]-11-amino-undekanianu metylu



Schemat 38: Reakcja z ftalimidkiem potasowym



Amid kwasu betulinowego otrzymano przez ogrzewanie w temp 55–60 °C przez 72 h w zamkniętym naczyniu stalowym, estru 3-trifluorooctano-betulinianu pentafluorofenyłu, w mieszaninie THF—ciekły amoniak 1 : 1 (wyd. 93%) [228].

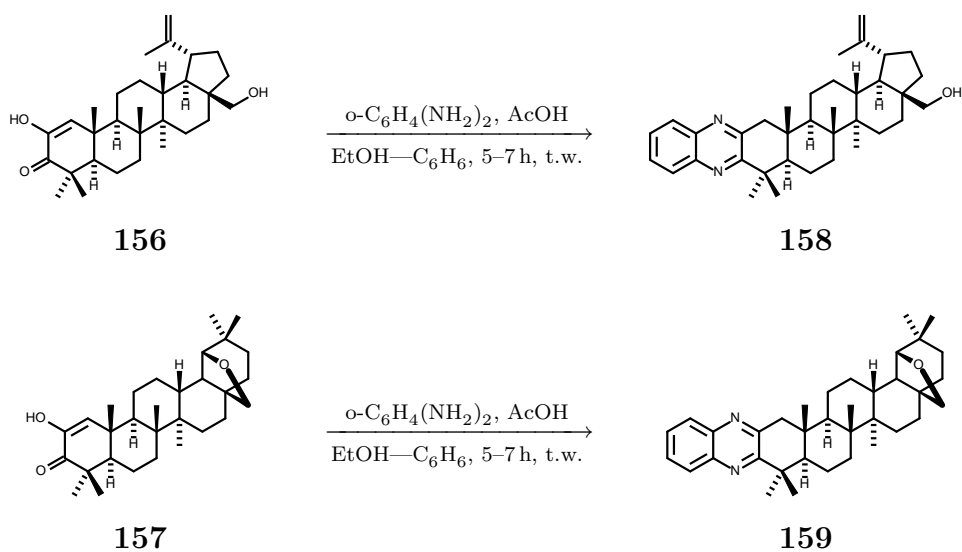
Diosfenole **156** i **157** w reakcji kondensacji z 2-fenylendiaminą, w mieszaninie 95% etanol—benzen 5:3, tworzą odpowiednie chinoksalino-pochodne **158** i **159** (ogrzewanie w t.w. przez 5–7 h; wyd. 85–95%) (schemat 39). Niewielki dodatek kwasu octowego zapobiegają tworzeniu żywicy [106].

W wyniku kondensacji kwasu betulonowego **43** z mrówczanem etylu w obecności metanolanu sodowego tworzy się związek **160**, który pod wpływem NH_2OH w etanolu daje pochodną z pierścieniem izoksazolowym **161** (schemat:40) [223].

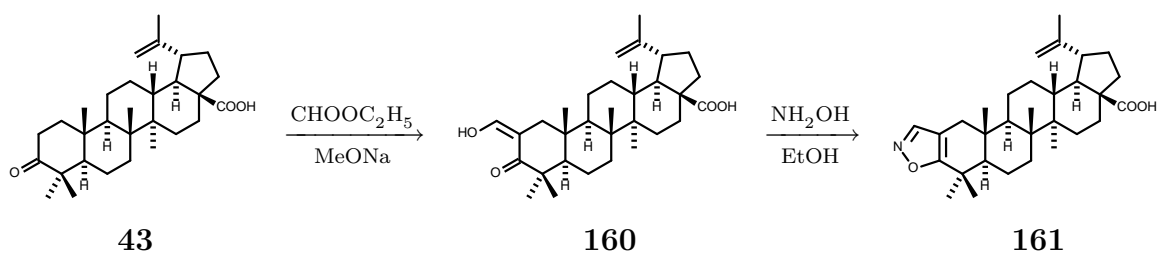
Izoksazolopochodna kwasu betulonowego **161** pod wpływem metanolanu sodowego w mieszaninie eter etylowy—metanol, ilościowo przekształca się w 3-keto-2-nityl **162**, izomeryzujący pod wpływem DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyjano-1,4-benzochinonu) do **163** (60%)(schemat 41) [223].

Kwas 3-epi-23-karboksybetulinowy **110** reagując z DCC (10 h w –5 °C i 15 h w 20 °C) tworzy 23-cykloheksyloamid **164** (18%) oraz cykliczną pochodną **165** (30%) [120].

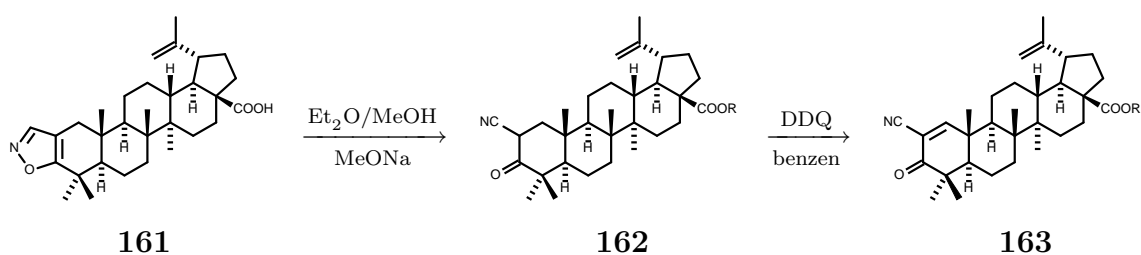
5.7. Połączenia azotowe



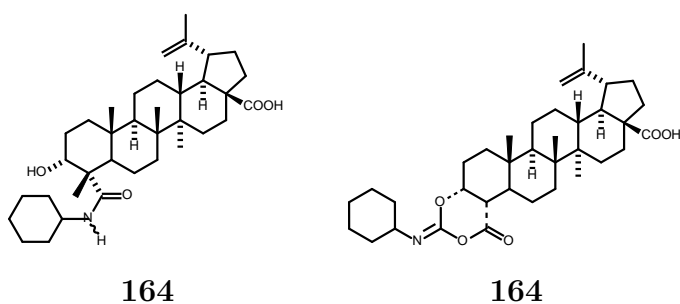
Schemat 39: Synteza chinoksalino-pochodnych betuliny i allobetuliny



Schemat 40: Synteza izoksazolopochodnej kwasu betulinowego



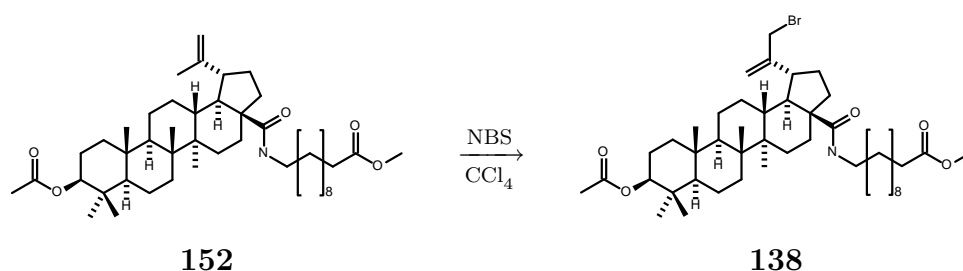
Schemat 41: Tworzenie 3-okso-2nitylu i jego izomeryzacja



5.8 Reakcje z fluorowcami — halogenopochodne

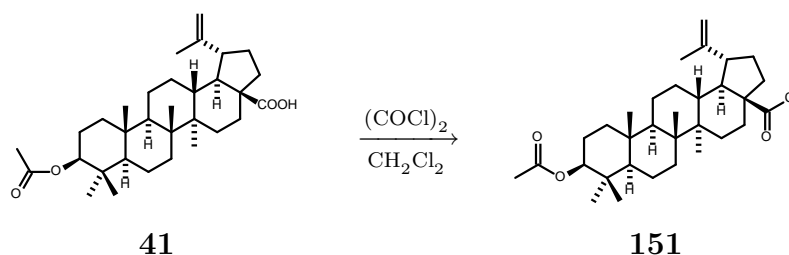
Diocetan betuliny w reakcji z NBS ulega bromowaniu w pozycji allilowej dając z wydajnością 65% 3,28-diacetoksy-30-bromo-lup-20(29)en **166** ($R=CH_2OCOCH_3$) (3 h, t.w. w CCl_4). Związek ten w reakcji z octanem srebra w mieszaninie TBACl—toluen (2 h, t.w.) tworzy z wyd. 55% 3,28,30-triacetoksy-lup-20(29)-en **167**, tożsamy z produktem acetylacji **85** powstałego z rozszczepienia epoksydu **83** (*vide* str. 43) [154].

Podobnie N-[3 β -hydroksy-lup-20(29)-en-28-oilo]-11-amino-undekanian metylu **152** w reakcji z zawiesiną NBS w CCl_4 ilościowo ulega bromowaniu w pozycji allilowej do N-[3 β -acetoksy-30-bromo-lup-20(29)-en-28-oilo]-11-amino-undekanianu metylu **138** (72 h, 20 °C) (sch. 42) [44].



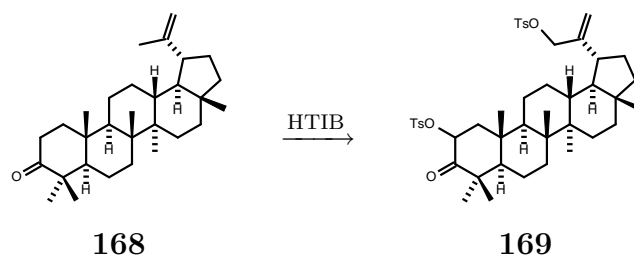
Schemat 42: Bromowanie pozycji allilowej izopropenyłu za pomocą NBS

Octan kwasu betulinowego z chlorkiem oksalilu w CH_2Cl_2 tworzy odpowiedni chlorek kwasowy (schemat 43).



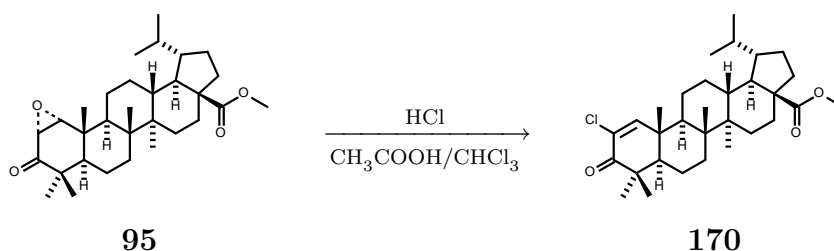
Schemat 43: Synteza chlorku kwasu betulinowego

Lupenon **168** w reakcji z 2 równoważnikami [hydroksy(tosyloksy)jodo]benzenu (HTIB) daje produkt oksytosylacji w pozycji α oraz allilowej **169** (34%) (sch. 44) [107].



Schemat 44: Synteza ditosylolupenonu

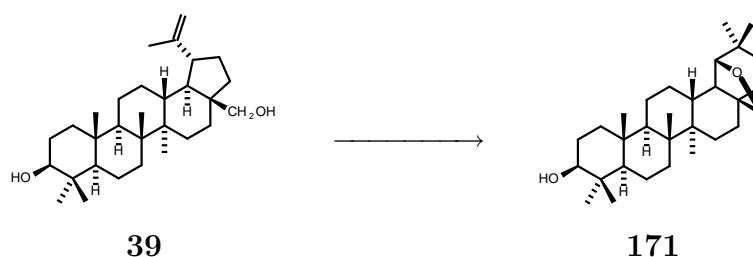
Rozszczepieniu epoksydu **95** (p.str. 44) chlorowodorem w mieszaninie kwas octowy— $CHCl_3$ towarzyszy przyłączenie chloru w pozycji 2 **170** (53%) (sch. 45) [223].



Schemat 45: Halogenacja pozycji 2 pierścienia A

5.9 Izomeryzacja

Grupa izopropenylowa i hydroksymetylowa betuliny znajdują się względem siebie w pewnym oddaleniu w konfiguracji *trans*, jednak w odpowiednich warunkach możliwa jest reakcja pomiędzy nimi — katalizowane kwasem przyłączenie hydroksylu do wiązania podwójnego. Eteryfikacji tej towarzyszy najczęściej nieodwracalne przegrupowanie pierścienia E **171**.



Schemat 46: Izomeryzacja betuliny do allobetuliny

Jest to jedna z najwcześniej poznanych reakcji izomeryzacji betuliny. Została ona po raz pierwszy opisana w 1922 r., jako zachodząca pod wpływem gorącego, stężonego kwasu mrówkowego [16].

Izomer konstytucyjny betuliny, powstający w wyniku tej konwersji — allobetulina — nie jest już zaliczany do triterpenów typu lupanu, lecz do typu β -amyryny (oleananu). Jego nazwa chemiczna to: 19 β ,28-epoksy-18 α -oleanan-3 β -ol **171**.

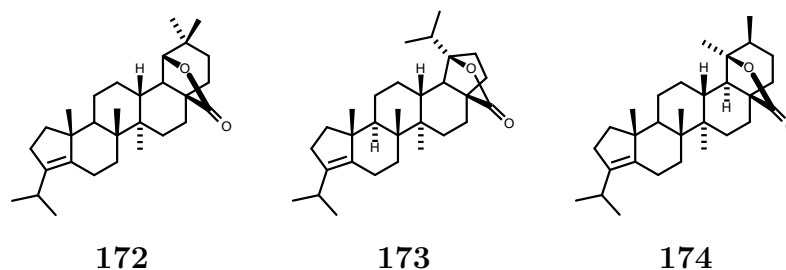
Tworzenie allobetuliny katalizują kwasy, jak: roztwór chlorowodoru w chloroformie lub etanolu, kwas siarkowy czy octowy [16].

Konwersja betuliny jak i jej 3-octanu, czy też 3-ketobetuliny do odpowiednich allozwiązków, zachodzi z dobrą wydajnością (80–90%) pod wpływem siarczanu dimetylu [117].

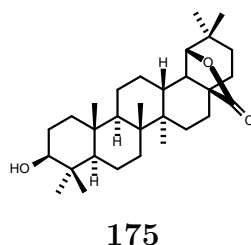
Cyklizację tą katalizują również stałe kwasy, jak: kaolinit, montmorylonity K10 i KSF, bentonit (glinka wybielająca ang.:bleaching clay), żel krzemionkowy z kwasem siarkowym lub 4-toluenosulfonowym. Konwersja taka została opisana dla betuliny i kwasu betulinowego [116]. Reakcję przeprowadza się przez ogrzewanie triterpenu z katalizatorem, we wrzącym, bezwodnym chlorku metylenu w ciągu 0.5 do 6 h a jej wydajność waha się w granicach 93–99% [116].

Kwas betulinowy ogrzewany w chloroformie w t.w. ²³ przez 3 h w obecności montmorylonitu K10 ulega izomeryzacji z równoczesną częściową dehydroksylacją i tworzone są związki **172** (A-neo-18 α -olean-3(5)-en-28(19)-olid 74%), **173** (A-neo-lup-3(5)-en-28(19)-olid 12%) i **174** (A-neo-18- α -tarakast-3(5)-en-28(19)-olid 6.4%).

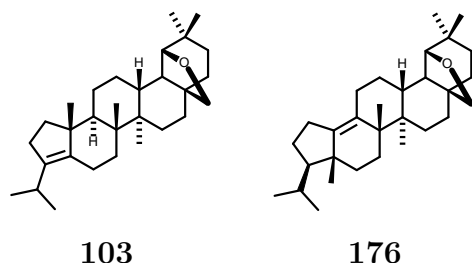
²³T.w. czystego chloroformu wynosi 61 °C



W tych samych warunkach, lecz nieco niższej temperaturze, tj.: 55 °C głównymi produktami są: związki **175** i **172**. Zabezpieczenie grupy 3-hydroksylowej kwasu betulinowego poprzez acetylację zapobiega dehydroksylacji i wyłącznym produktem reakcji (po odszczerpieniu acetylu przy C3) jest **175**.



Temperatura w jakiej zachodzi katalizowana montmorylonitem K10 izomeryzacja odgrywa istotną rolę jeśli chodzi o jednoczesną dehydroksylację grupy 3-hydroksylowej i migrację tworzonego wiązania podwójnego. Betulina w obecności K10 ogrzewana w chlorku metylenu w t.w. przez 3 h ulega przekształceniu do allobetuliny bez żadnych reakcji ubocznych z wydajnością 93%. Natomiast we wrzącym benzenie i cykloheksanie z powstającą allobetuliną tworzą się następnie: 19 β ,28-epoksy-A-neo-18 α -3(5)-oleanen **103** i 19 β ,28-epoksy-A-neo-5 β -metylo-25-nor-18 α -9-oleanen **176**. Równowagowy stosunek tych izomerów zależy od temperatury; w wyższej preferowane jest tworzenie **176**, po ostudzeniu do 20 °C zwiększa się ilość **103**. W cykloheksanie ułamek **103** : **176** wynosi 65 : 9,9 a w benzenie 40 : 38 [116].

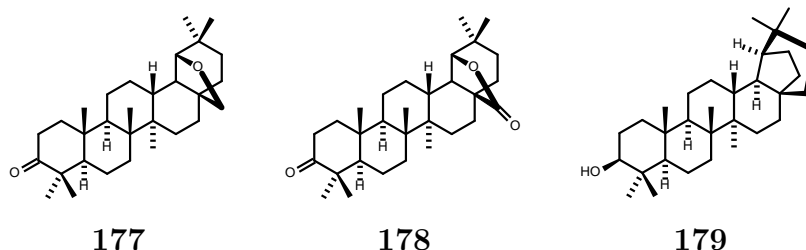


Innymi katalizatorami konwersji betuliny są: FeCl₃ · 6 H₂O lub Fe(NO₃)₃ · 9 H₂O na żelu krzemionkowym lub tlenku glinowym. Ich użycie nie wymaga zabezpieczenia grupy hydroksylowej przy C-3, gdyż proces zachodzi prawie ilościowo (ponad 95%) w krótkim czasie, tj. 5–15 min. Przy dłuższym czasie reakcji (2 h) powstała w wyniku konwersji allobetulina, ulega dalej dehydratacji połączonej z izomeryzacją i wyłącznymi produktami są **103** i **176** w stosunku 5,5 : 4,5.

5.9. Izomeryzacja

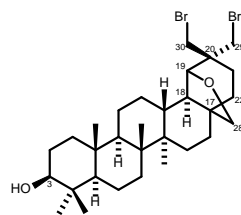
Jeśli katalizatorem konwersji betuliny jest dziewięciowodny azotan żelaza (III) na żelu krzemionkowym, to przy długim czasie reakcji (6 h), zamiast dehydratacji, zachodzi utlenienie grupy hydroksylowej przy C-3 do ketonu (70%) **177** (**103** i **176** powstają w śladowych ilościach) [113].

Flekhter i wsp. przedstawiają konwersję kwasu 3-oksobetulonowego do cyklicznego laktonu **178** za pomocą kwasu trifluorooctowego w chloroformie (8min, 95%) [46].



W trakcie ogrzewania etanolowego roztworu betuliny z dodatkiem stężonego kwasu solnego (10M), obok allobetuliny powstaje inny produkt cyklizacji — 20,28-epoksy-19 α H-lupan-3 β -ol (20%) **179** [43].

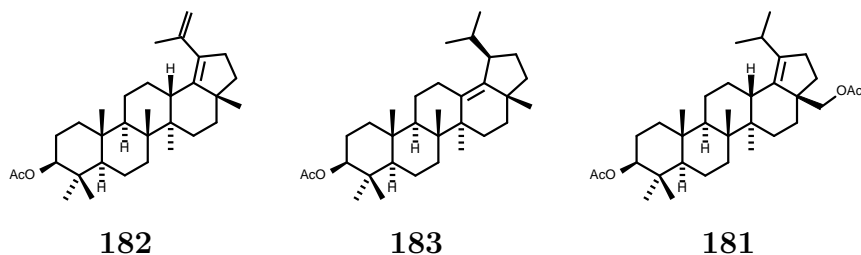
Addycja fluorowca do wiązania podwójnego betuliny przebiega z jednoczesnym przegrupowaniem pierścienia E. W wyniku reakcji betuliny z Br₂ w CHCl₃ tworzy się 29,30-dibromoallobetulina **180** z wydajnością 80% [115]. Wydajność reakcji spada gdy brom jest użyty w stosunku molowym większym niż 1 a jednocześnie reakcja wymaga światła; w ciemności wynosi 6% [115]. Na podstawie danych rentgenograficznych autorzy określają konformację jako all-trans, C-C-C-C-C-C z pierścieniem zawierającym tlen jako lekko zniekształcone krzesło.



180

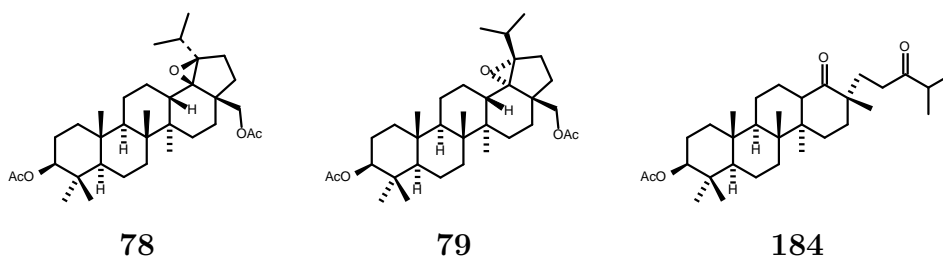
Wysoka wydajność reakcji przy proporcji reagentów 1 : 1 wskazuje, że jest to reakcja addycji — przy reakcji wolnorodnikowej powstawałby HBr i wymagałaby ona co najmniej 2-krotnego nadmiaru Br₂. Z drugiej strony konieczna obecność światła przemawia za procesem wolnorodnikowym.

Zarówno bromowódor w środowisku kwas octowy—bezwodnik octowy—benzen, jak i kwas 4-toluenosulfonowy, katalizują przemieszczenie wiązania podwójnego w dioctanie betuliny i 3-octanie lupenyli. Z dioctanu betuliny pod wpływem HBr, powstaje izomer Δ 18 **181**, który jest identyczny ze związkiem tworzącym się w wyniku częściowego uwodornienia produktu dehydrogenacji dioctanu betuliny octanem rtęci (**122**) [185, 188]. Natomiast z octanu lupenyli powstają związki (zw. **182** (20%) i **183** (20%)). Pod działaniem mieszaniny HBr-Ac₂O-AcOH-benzen, związek **182** ulega łatwo przegrupowaniu do **183** [185, 191].

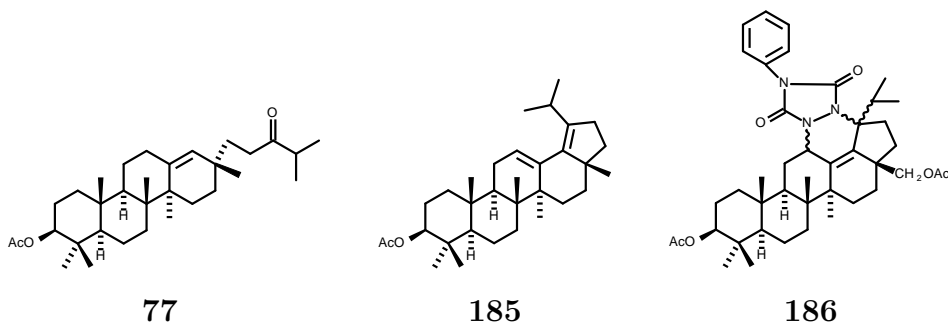


Izomer Δ^{18} **181** pod działaniem kwasu 3-chloronadbenzoesowego, lub nadmruwkowego tworzy $18\beta,19\beta$ epoksyd **78**. Natomiast w reakcji z ozonem, który ma charakter dwurodnika, powstaje $18\alpha,19\alpha$ epoksyd **79** [189]. Sytuacja wygląda analogicznie w przypadku epoksydacji izomeru 3-octanu lupenyłu [191].

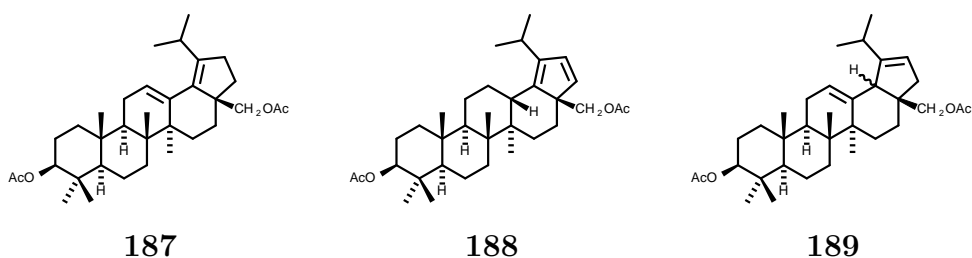
Struktura związku **78** została potwierdzona rentgenograficznie [189].



Obydwa izomeryczne oksirany **78**, **79** w benzenowym roztworze eteratu BF_3 , ulegają rozszczepieniu do pochodnej bakaranu **77** (wyd. 90%)²⁴. Rozszczepieniu oksiranu $18\beta,19\beta$ epoksyd **78** towarzyszy powstawanie dodatkowo śladowych ilości dienu **185**, którego obecność wydedukowano na podstawie analizy adduktu **186** (reakcja Dielsa-Aldera) z 4-fenyl-1,2,4-triazolino-3,5-dionem [189].



Inaczej przebiega otwarcie oksiranu $18\beta,19\beta$ **78** katalizowane kwasem *p*-toluenosulfonowym. Produktami rozszczepienia są dieny: **187** i **188** (w sumie 70%) oraz około 30% pochodnej bakaranu **77** [190].

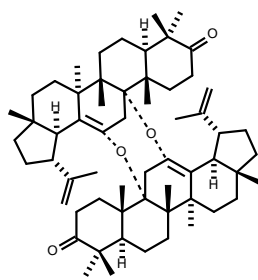


²⁴Związek ten powstaje również w wyniku utlenienia izomeru Δ^{18} przy pomocy $\text{RuO}_2\text{—NaIO}_4$ i dalszej selektywnej redukcji i dehydratacji związku **184**.

5.10. Dehydratacja

18 α ,19 α epoksyd (**79**) ilościowo ulega przekształceniu do pochodnej bakaranu **77** pod działaniem eteratu BF₃, a pod wpływem kwasu p-toluenosulfonowego w 85%, z jednoczesnym utworzeniem niesprężonego dienu **189** jako produktu ubocznego [190].

Lupenon **168** ogrzewany z morfoliną, siarką i kwasem p-toluenosulfonowym w mieszaninie DMF—CH₂Cl₂, w temp. 100 °C przez 36 h tworzy w reakcji Wilgerodta-Kindlera niezwykle dimer **190** z wydajnością 40%.

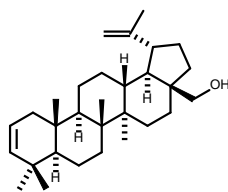


190

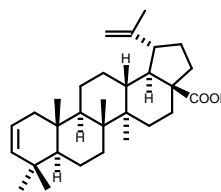
Istnienie²⁵ tego związku zaproponowano na podstawie widm NMR (HMBC) ES-MS oraz analizy elementarnej [45].

5.10 Dehydratacja

Drugorzędowa grupa hydroksylowa betuliny (C-3) ulega odszczepieniu w reakcji Mitsunobu z utworzeniem wiązania podwójnego pomiędzy C-2 i C-3 **191**; roztwór betuliny i trifenylfosfiny w THF + DEAD w atm. gazu obojętnego 12 h 20 °C [184]. W podobny sposób przeprowadzono dehydratację kwasu betulinowego. 3-tosylan kwasu betulinowego ogrzewany octanem sodowym w DMF przez 6 h w 120 °C daje kwas 2(3),20(29)-lupadieno-28-karboksyłowy **192** (71%) [44].



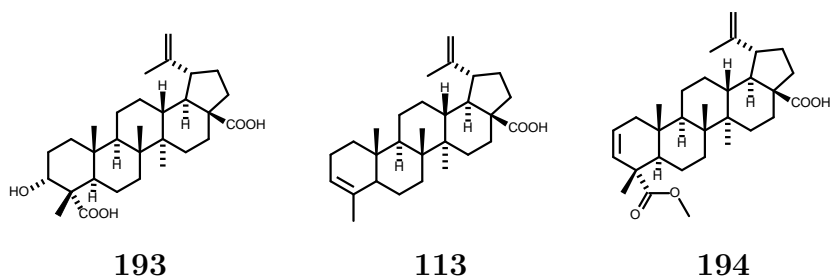
191



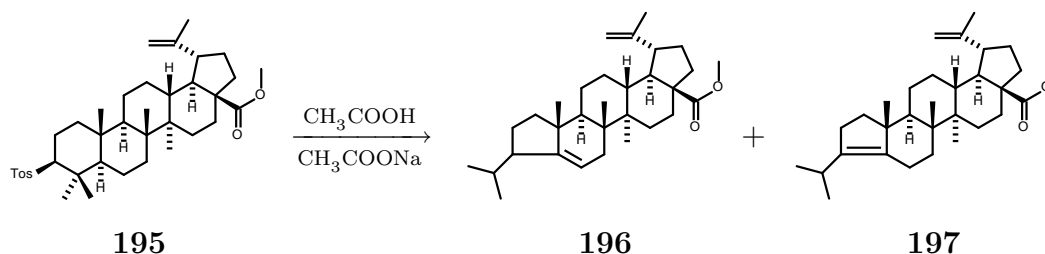
192

Odszczepieniu grupy tosyłowej od kwasu 3-epi-23-karboksybetulinowego **193** towarzyszy dekarboksylacja przy C-4 z utworzeniem kwasu 23-nor-3,20(29)-lupadien-28-owego **113** (91%) (DMF, NaOAc, 6 h, 120 °C); pochodna **193** ze zstryfikowanym karboksylem przy C-4, przekształca się w **194** (82%) [120].

²⁵Takie połączenie dwóch cząsteczek lupeolu wydaje się bardzo mało prawdopodobne, ze względu na bardzo duże zawady przestrzenne.



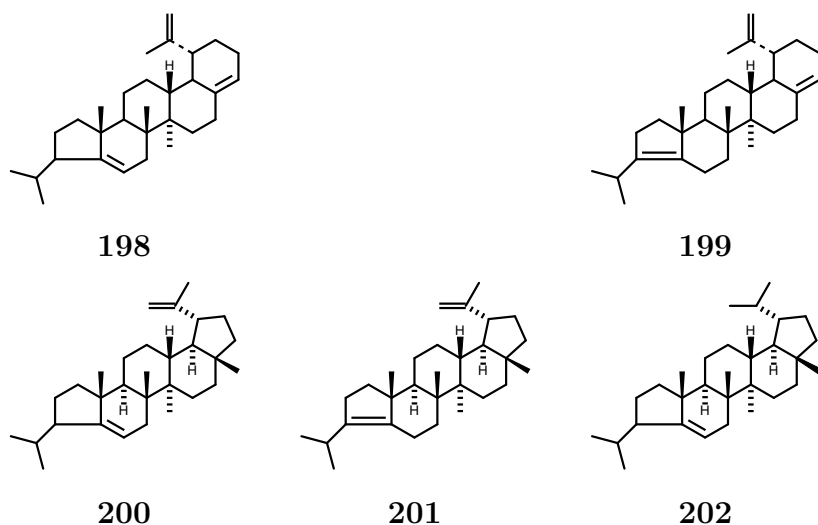
Oderwaniu grupy 3-tosylowej od estru metylowego kwasu betulinowego **195** w kwaśnym środowisku (kwas octowy + octan sodowy) towarzyszy przegrupowanie Wagnera-Meerweina pierścienia A, i powstaje mieszanina związków **196** i **197** w stosunku 1 : 4 (3 h, t.w.) (schemat 47) [9]. W takich warunkach z 3,28-ditosylanu betuliny powstają produkty



Schemat 47: Solwoliza 3-tosylanu estru metylowego kwasu betulinowego

z przegrupowanymi pierścieniami A **198** i E **199**, natomiast z 3-tosylanu lupeolu związki z przegrupowanym tylko pierścieniem A **200** i **201** [9].

Powstawanie dodatkowych produktów izomeryzacji podczas dehydratacji triterpenów w kwaśnym środowisku spowodowane jest, jak wskazują autorzy, katalizowanej przez H^+ migracji wiązania podwójnego [9].



W alkalicznym środowisku pirydyny chlorek fosforylu ($POCl_3$) odrywa obydwie grupy hydroksylowe betuliny i jako wyłączny produkt powstaje **198** z przegrupowanym pierścieniem E. W przypadku estru metylowego kwasu betulinowego, lupeolu i dihydrolupeolu,

tworzą się wyłącznie odpowiednio: **196**, **200** i **202**, co jest oczywiste przy braku reaktywnej funkcji przy C-17 tych związków [9].

Dehydroksylacji pierścienia A allobetuliny **171** lub cyklicznego laktonu kwasu allobetulinowego **175** przez ogrzewanie ich 3-tosylanów w pirydynie w t.w., nie towarzyszy przegrupowanie pierścienia A a jedynie wprowadzenie wiązania podwójnego w pozycji C-2-C-3 [116].

5.11 Glikozylacja

Znaczna część naturalnych triterpenów występuje w formie O-glikozydów — połączeń nazywanych saponinami. Są to związki amfifilowe, wykazujące m.in. zdolność obniżania napięcia powierzchniowego.

Betulina należy do triterpenów, które nie występują w formie saponin. Znanych jest za to kilkanaście naturalnych estrów (*vide* 5.5, strona 50). Natomiast kwas betulinowy występuje niekiedy w formie saponin. Np. w bobrku trójlistkowym *Menyanthes trifoliata*, główną saponiną jest bidesmozyd²⁶ — kwas 3-O- $[\beta$ -D-galaktopiranozylo(1 \rightarrow 4) β -D-glukopiranozylo]-28-O- $[\beta$ -D-apiofuranozylo(1 \rightarrow 6) β -D-glukopiranozylo] betulinowy [78].

W połączeniu z cukrami triterpeny stają się częściowo rozpuszczalne w wodzie, co ma niekiedy istotne znaczenie farmakologiczne. Opracowywane są zatem metody syntezy takich połączeń.

Uvarova i wsp. w 1973 r. przedstawiła syntezę beta-O-glikozydów betuliny metodą ortoestrową. Metoda ta służy do wysoce stereoselektywnej syntezy 1,2-trans-glikozydów. Przy wykorzystaniu α -ortoestrów powstają głównie anomery β -glikozydów [217].

Betulina, bądź jej monoestry dość łatwo ulegają glikozylacji w trakcie ogrzewania w nitrometanie, z dodatkiem HgBr₂ jako katalizatora (0.02 mmol na 1 mol betuliny). Grupa hydroksylowa przy C-28 betuliny ulega reakcji łatwiej niż drugorzędowa, przy C-3. W przypadku reakcji betuliny z 1,2-metylo-ortoocetanem-*per*-O-acetylo- α -maltozy (schemat 48) powstają: 28-*per*-O-acetylo- β -D-maltozyd 3-octanu betuliny (61,5%) i 3,28-di-*per*-O-acetylo- β -D-maltozyd (29,8%). Autorzy przedstawiają również modyfikację metody, gdzie katalizatorem był nadchloran 2,6-dimetylopirydyniowy a substratami 3-octan i 28-octan betuliny, jednak wydajność tych syntez jest niższa o około 10%²⁷. Gdy ortoester posiada większą zawadę przestrzenną, jak np. *tert*-butylo-ortoocetan β -D-glukozy, glikozylacji podlega wyłącznie hydroksyl pierwszorzędowy (28,7% po 0,75 h) a produktem ubocznym reakcji jest dioctan betuliny (39,7%) [206].

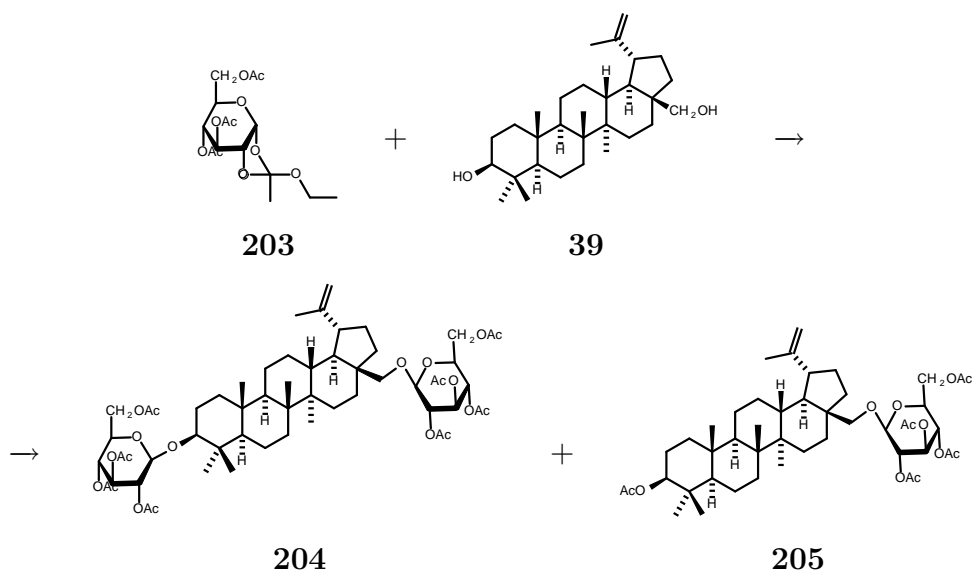
Ogrzewanie alkoholi z *per*-O-acetylo-1,5-anhydro-2-deoksy-heks-1-enitolem²⁸ w obecności bezwodnej żywicy sulfonowej jako katalizatora kwasowego z dodatkiem LiBr w acetonitrylu, prowadzi do utworzenia odpowiednich 2-deoksyglikopiranozydów [166].

Reakcję taką dla niektórych 3-hydroksytriterpenów przedstawiają *Flekhter i wsp.* [48]. Roztwór 28-octanu betuliny w mieszaninie chlorek metylenu-acetonitryl (1 : 1) ogrzewany z *per*-O-acetylo-1,5-anhydro-2-deoksy-*L*-gluko-heks-1-enitolem lub *per*-O-acetylo-1,5-anhydro-2,6-dideoksy-*L*-gluko-heks-1-enitolem w obecności katalizatora. W reakcjach glikozylacji, addycja 3-hydroksylu triterpenowego do wiązania podwójnego odpowiedniego

²⁶Bidesmozyd to saponina z dwoma łańcuchami cukrowymi.

²⁷Przedstawiony czas reakcji jest krótszy, co również mogło wpłynąć na wydajność.

²⁸Nazwa wywodzi się od odpowiedniego 1,5-anhydroalditolu (anhydroglucitolu).



Schemat 48: Glikozylacja betuliny metodą ortoestrową

glikalu, prowadzi do utworzenia wyłącznie anomerów α L-2-deoksyglikozydu lub L-2,6-dideoksyglikozydu [rysunek] z wydajnościami 80–90% [48].

3- β -D-fukofuranozyd i 3- β -L-fukofuranozyd betulinianu metylu i epibetulinianu metylu, zsyntetyzowali *Ma iwsp.* w reakcji odpowiedniego bromku (per-O-)acetylofukofuranozydowego z triterpenem zawierającym wolną grupę 3-hydroksylową w obecności zeolitu srebrnego [121]. Analiza widm NMR i ORD pochodnych fukofuranozydowych tych triterpenów posłużyły do określenia konfiguracji absolutnej ich grup hydroksylowych w pozycji C-3²⁹ [121].

Podobnie 3-glukozyd betuliny (Bet-(Glu)) zsyntetyzowano metodą Koenigsa-Knorra — w kondensacji 28-octanu betuliny z acetobromoglukozą, z następczą deacetylacją [140].

Monodesmozydy o dłuższych łańcuchach, zawierających 5 i 6 cząsteczek glukozy utworzono w wyniku transglikozylacji diglikozydu betuliny z α -cyklodekstryną za pomocą glikozylotransferazy cyklodekstrynowej (CGT-azy) [140].

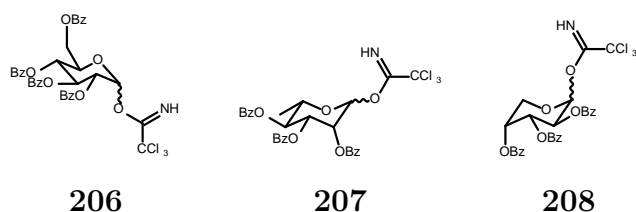
Ani czysta betulina, ani jej 3-glikozydy nie wykazują wpływu na szybkość kiełkowania nasion lucerny (alfa-alfa). Natomiast mają ujemny wpływ na wzrost korzonka. Siła ich działania zależy od ilości przyłączonych cząsteczek cukru. Przy stężeniu 0,018% betulina hamuje wzrost korzonka w 20% a jej 3-glukozyd w ok. 40%. Aktywność Bet-(Glu)₃ i Bet-(Glu)₂ jest większa, gdyż 30% inhibicja wzrostu zaznacza się przy stężeniu 0,009%. Przy wyższym stężeniu — 0,04% — Bet-(Glu)₃ podobnie jak Bet-(Glu)₄ hamuje wzrost korzonka lucerny o 50%, natomiast Bet-(Glu)₆ i Bet-(Glu)₅ działają słabiej — 40% aktywność [140].

Metodę syntezy 3-glikozydu betuliny w fazie stałej przedstawili w 2004 r. [112]. Ogrzewanie 28-O-TBDMS-betuliny z 1-acetylo-2,3,5-tribenzoesanem- β -D-rybofuranozy i aktywowanym włóknem węglowym (ang. ACF — activated carbon fiber) jako katalizatorem o charakterze kwasu Lewisa w temp. 160 °C przez 16 h, prowadzi do utworzenia wiązania β -D-glikozydowego pomiędzy triterpenem i cukrem (64%) [112].

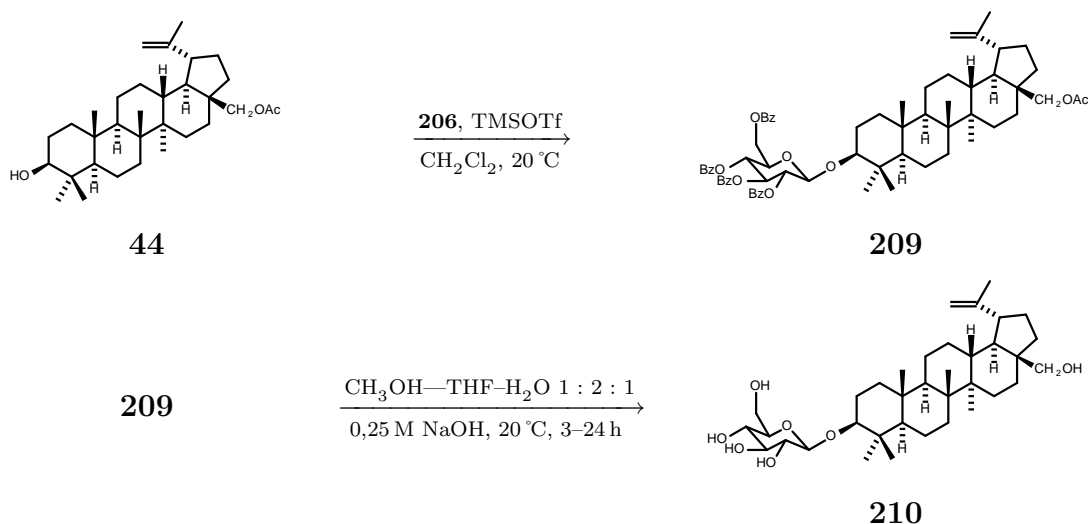
²⁹Jest to tzw. metoda Kobayashi określania konfiguracji alkoholi drugo- i trzeciorzędowych.

5.12. Przekształcenia biotechnologiczne

Szereg glikozydowych pochodnych otrzymano przez połączenie selektywnie acetylowanych pochodnych betuliny z trichloroacetimidami estrów benzylowych D-glukozy **206**, L-ramnozy **207** i D-arabinozy **208**.



Reakcja przebiega w temperaturze pokojowej z dobrymi wydajnościami — ok. 70% — ale wymaga bezwzględnie bezwodnego środowiska (bezw. CH_2Cl_2 , sita molekularne 4 Å, atmosfera argonu). Katalizatorem reakcji jest TMSOTf. Ze względu na sąsiadującą grupę benzoilową tworzone są wyłącznie 1,2-*trans*-glikozydy; przykładowo synteza 3-O-β-D-glukopiranozydu betuliny przedstawiono na schemacie 49.



Schemat 49: Synteza 3-O-β-D-glukopiranozydu betuliny

W ten sposób zsyntetyzowano: 3-O-β-D-glukopiranozyd lupeolu, 3-O-α-L-ramnopiranozyd lupeolu, 3-O-α-D-arabinopiranozyd lupeolu, 3-O-β-D- i 28-O-β-D-glukopiranozyd betuliny, 3-O-α-L- i 28-O-α-L-ramnopiranozyd betuliny, 3-O-α-D- i 28-O-α-D-arabinopiranozyd betuliny, 3-O-β-D-glukopiranozyd betulinianu metyłu, 3-O-α-L-ramnopiranozyd betulinianu metyłu i 3-O-α-D-arabinopiranozyd betulinianu metyłu. Rozpuszczalność tych saponozydów jest większa niż wolnych triterpenów. Wykazują również silniejsze działanie cytotoksyczne na kilku nowotworowych liniach komórkowych [60].

5.12 Przekształcenia biotechnologiczne

Opisywane w literaturze przekształcenia biotechnologiczne, miały na celu zbadanie potencjalnych ścieżek metabolicznych. Uzyskane wydajności tych transformacji na ogół są zbyt niskie aby mogły mieć jakiegokolwiek praktyczne zastosowanie.

W hodowlach zawiesinowych, niektóre mikroorganizmy zdolne są do przekształcania triterpenów do hydroksy-, keto- i karboksypochodnych.

Metabolity kwasu betulinowego z hodowli *Bacillus megaterium* ATCC 14581 to: kwas 3-keto-lup-20(29)-en-28-karboksylowy (3-ketobetulinowy) (wyd. 0,44%), kwas 3 β ,7 β -dihydroksy-lup-20(29)-en-28-owy (wyd. 0,085%) i kwas 3 β ,6 α ,7 β -trihydroksy-lup-20(29)-en-28-owy (wyd. 0,45%) [108].

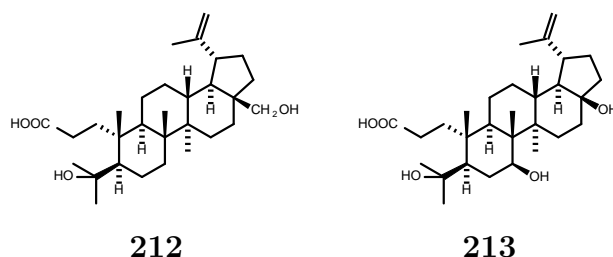
Pochodna z utlenioną grupą 3-hydroksylową — kwas 3-ketobetulinowy — jako wyłączny produkt, powstaje (wyd. 1,3%) z kwasu betulinowego w hodowli *Mucor mucedo* UI-4605 [108]. Jest ona również głównym produktem biotransformacji przez *Bacillus megaterium* ATCC 13368 (4.1%), obok którego powstają w mniejszych ilościach trzy metabolity: kwasu 3-keto-11 α -hydroksy-lup-20(29)-en-28-owego (0,19%), kwasu 1 β -hydroksy-3-keto-lup-20(29)-en-28-owego (0,13%), kwasu 3 β ,7 β ,15 α -trihydroksy-lup-20(29)-en-28-owego (0,54%) [21].

Szczep *Cunninghamella elegans* ATCC 9244 transformuje kwas betulinowy do kwasu 1 β ,3 β ,7 β -trihydroksy-lup-20(29)-en-28-owego [108].

Przeprowadzono również glikozydację kwasu betulinowego do 28 β -D-glukopiranozylo-estru **211** przy pomocy szczepu grzybów *Cunninghamella* sp. NRRL 5695. Wydajność tej glikozylacji jest jednak bardzo mała i wynosi 0,77% [22]. Prawdopodobnie jest to spowodowane zatrzymywaniem kwasu betulinowego w komórkach lub ścianie komórkowej grzybów³⁰. Również metabolit — glikozyd — nie ulega wydaleniu poza komórkę [22].

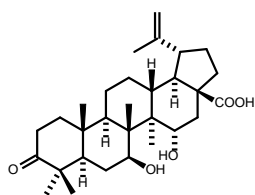
Glikozydoester kwasu betulinowego **211** w przeciwieństwie do wolnego triterpenu wykazuje niższą aktywność wobec kilku linii czerniaka ludzkiego [22]. Rozpuszczalność ma raczej mały wpływ na cytotoksyczność pochodnych betuliny. Kwas betulinowy wykazuje wyższą cytotoksyczność wobec kilku linii czerniaka ludzkiego niż jego bardziej hydrofilna pochodna — **211**. Sugeruje to, że obecność wolnej grupy karboksylowej triterpenu ma istotne znaczenie dla aktywności cytotoksycznej. Z drugiej strony zwiększona polarność związku **211** może być przyczyną jego szybszego usuwania z komórki docelowej lub /i gorszego oddziaływania z lipofilnymi receptorami.

Dość niezwykle produkty biotransformacji powstają w wyniku działania grzyba *Chaetomium longirostre* IFO 9873. Oprócz wprowadzenia dodatkowych grup hydroksylowych, otwiera on pierścień A triterpenu i zdolny jest do dekarboksylacji cząsteczki przy C-17. Metabolitem betuliny jest kwas 4,28-dihydroksy-3,4-seko-lup-20(29)-en-3-owy (rys. **212**) 3% i dwa inne produkty powstające w śladowych ilościach.

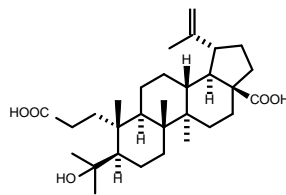


Bardziej polarny kwas — betulonowy — ulega biotransformacji do: kwasu 4,7 β ,17-trihydroksy-3,4-seko-28-nor-lup-20(29)-en-3-owego (12%) **213**, kwasu 4-hydroksy-3,4-seko-lup-20(29)-en-3,28-diowego (6%) **214** i 7 β ,15 α -dihydroksy-3-keto-lup-20(29)-en-28-owego (4%) **215** [5].

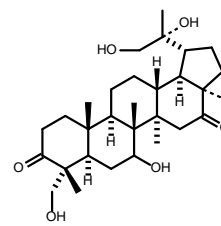
³⁰Po 9 dobach inkubacji nie daje się go wykryć w medium.



215



214



216

W teście aktywacji genu EBV-EA, indukowanej przez TPA, wszystkie produkty biotransformacji betuliny i kwasu betulonowego posiadają większą aktywność od substratów [5].

Bakterie *Nocardia* sp. NRRL 5646 przekształcają kwas betulonowy i 23-hydroksybetulinowy do mniej polarnych estrów metylowych [226].

Avicennia germinans, stanowią jedną z roślin namorzynów w Północnej Brazylii. Liście tej rośliny zawierają betulinę, jednak nie stwierdza się jej obecności w osadach przybrzeżnych w przeciwieństwie do innych triterpenów, jak np. tarakserolu, germanikolu, lupeolu i β -amyryny. Spowodowane jest to znaczną podatnością betuliny na biodegradację przez florę występującą w tych osadach. W trakcie inkubacji osadu w warunkach zbliżonych do naturalnych, już po 40 dniach betulina jest niewykrywalna w próbkach, podczas gdy w autoklawowanej próbce jej stężenie nie ulega praktycznie zmianie w ciągu 92 dni. Germanikol i β -amyryna ulegają rozkładowi, ale po upływie tego czasu, są jeszcze wykrywalne. Najodporniejszym triterpenem z wyżej wymienionych jest tarakserol. Tłumaczy to zapewne, dlaczego tarakserol jest najczęściej spotykanym triterpenem w osadach morskich [103].

Suberyna z kory brzozej nie ulega rozkładowi przez bardzo długi czas. Analiza produktów biodegradacji zewnętrznej warstwy kory *Betula platyphylla* Sukatchev var. *japonica* (Miq.) Hara, wykazała, że betulina ulega przekształceniu do tetrahydroksy-nor-triterpenu: (17R, 20R)-7 β ,20,23,29-tetrahydroksy-28-norlupan-3,16-dionu **216** [49].

Rozdział 6

Oznaczanie toksyczności podstawowej

Określenie cytotoksyczności jest jednym z najważniejszych etapów kreowania nowych środków leczniczych. Znanych jest wiele metod jej oznaczania zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Ze względów etycznych badania na zwierzętach przeprowadzane są dopiero dla związków, których aktywność w jakimś stopniu pozwala już oczekiwać ciekawych wyników w sensie siły bądź kierunku działania [225].

Istnieją dwa podstawowe sposoby wyznaczania liczby żywych komórek w hodowli:

- bezpośrednio (liczenie rzeczywistej liczby komórek)
- pośrednio (monitorowanie jednego lub kilku parametrów hodowli dokładnie odzwierciedlających liczbę żywych komórek).

Pomiar bezpośredni zwykle obejmuje barwienie barwnikami przeżywalnościowymi zawieszonych, oddzielonych komórek związkami jak błękit trypanu, eozyna, nigrozyna, które są usuwane z żywych komórek, ale nie z martwych. Liczba zabarwionych (martwych) i niezabarwionych (żywych) komórek w medium (może być następnie wyznaczona za pomocą hemocytometru, mikroskopu lub elektronicznego licznika barwnych komórek [160]). Metody te ograniczone są znacznym zróżnicowaniem intensywności zabarwienia komórek, spowodowane np. niecałkowitą śmiercią komórek lub ich łączeniem w konglomeraty (niektóre komórki wykazują silną kohezję), a ponadto kłopotliwość ich stosowania przy dużej ilości próbek [69].

Wśród pośrednich sposobów oznaczania liczności komórek są: określanie ilości białek komórkowych lub DNA, które generalnie są proporcjonalne do liczby komórek w próbce. W badaniu syntezy białek i DNA z reguły stosuje się znaczniki radioaktywne. Inne sposoby kontrolują nagromadzanie barwników w wakuolach wewnątrzkomórkowych, poziom zużycia składników odżywczych jak glukoza lub produkcję metabolitów takich jak kwas mlekowy, a także pomiar jednego lub kilku konstytutywnych enzymów lub procesów metabolicznych [69].

Pomiar uszkodzenia błony plazmatycznej jest typową miarą śmierci komórki [214]. Istnieje szereg sposobów jej pomiaru opartych na pobieraniu lub usuwaniu barwnika, oraz uwalniania radioaktywnych izotopów, barwników fluorescencyjnych lub kalceiny-AM z oznakowanych komórek docelowych. W innych analizach mierzona jest ilość enzymów cytoplazmatycznych uwalnianych przez uszkodzone komórki, gdzie wielkość aktywności enzymu wykrywanego w supernatancie hodowlanym koreluje proporcjonalnie do ilości zlizowanych komórek.

Znane są następujące testy uwalniania enzymów: alkalicznej i kwaśnej fosfatazy, transaminazy glutaminian—szczawiooctan, transaminazy glutaminian—pirogronian (GPT) oraz liazy argininobursztynianowej.

Zastosowanie tych testów jest utrudnione niskim poziomem tych enzymów w komórkach, oraz pracochłonną metodyką oznaczania aktywności niektórych z tych enzymów.

W przeciwieństwie do tego, dehydrogenaza mleczanowa (LDH) jest stabilnym enzymem cytoplazmatycznym obecnym we wszystkich komórkach. Gdy błona komórkowa zostaje uszkodzona, LDH jest szybko uwalniany do medium hodowlanego [214]. Medium bezkomórkowe jest inkubowane z mieszaniną reakcyjną z zestawu. Aktywność LDH jest określana kolorymetrycznie. W pierwszym etapie NAD^+ jest redukowany do NADH/H^+ w trakcie katalizowanej przez LDH konwersji mleczanu do pirogronianu. Następnie enzym obecny w mieszaninie — diaforaza — przenosi protony z NADH/H^+ na sól tetrazolową — chlorek jodotetrazolowy (chlorek 2-/4-jodofenylo/-3-/4-nitrofenylo/-5-fenylo-2H-tetrazolowy) — redukując ją do barwnika formazanowego [214].

W teście MTT oznacza się właściwie aktywność mitochondriów, przez pomiar tworzenia ciemno-niebiesko zabarwionego produktu — formazanu — powstającego przez redukcję pierścienia tetrazolowego MTT. Uznaje się, że redukcja ta przeprowadzana jest głównie przez mitochondria pod wpływem dehydrogenazy bursztynianowej i jest zatem miarą aktywności mitochondriów [119]. Istnieją jednak doniesienia że w niektórych liniach, jak prawidłowe ludzkie fibroblasty i komórki linii ludzkiego raka wątroby (HepG2) redukcja MTT może również w znaczącym stopniu mieć miejsce poza mitochondriami [17].

Ilość dodawanego MTT powinna być ustalona dla każdej linii komórkowej, gdyż mogą występować znaczne różnice przy których tworzona jest maksymalna ilość formazanu; przykładowo w linii komórek L-DAN (łuskowaty nowotwór płuc linia ustalona) w zakresie stosowanych stężeń MTT 1–5 mg/ml absorbancja zmienia się w zakresie 0,1–0,5 ($\lambda=570$ nm), a w linii GLC4 0,1–0,3 w zakresie stężeń 0,4–2 mg/ml. Użycie nadmiaru MTT w niektórych liniach powoduje zmniejszenie ilości tworzonych formazanu. Przy wysokich licznosciach komórek, i wysokiej absorbancji (powyżej 0,8) są odstępstwa liniowej zależności pomiędzy ilością powstałego formazanu a liczbą komórek. Na absorbancję istotny wpływ ma pH roztworu, osiągając maksimum przy wartości 10,5 [151]. Pod nieobecność buforu o pH=10,5, duży wpływ ma także obecność medium hodowlanego, zmieniając charakterystykę widmową krzywej absorbancji formazanu. Dodanie 5 μl medium zwiększa absorbancję formazanu rozpuszczonego w DMSO (A_{570}) ponad dwukrotnie (!). Dodanie kolejnych objętości medium nie ma już takiego wpływu [151].

Niektóre substancje, jak np. chlorochina, mogą zatruwać enzymy, powodując zaniżenie wartości oznaczanej toksyczności [214].

Rozdział 7

Zarys metod wyznaczania lipofilności

Lipofilność jest właściwością molekularną oddziaływań rozpuszczalnik—rozpuszczalnik, generalnie charakteryzowaną za pomocą współczynników podziału. Do jej zastosowań należą pozornie tak odległe dziedziny jak projektowanie leków i rozwój metod rozdzielania chromatograficznego. Właściwie optymalizacja lipofilności jest wiodącą zasadą w rozwoju leków działających np. w ośrodkowym układzie nerwowym — środowisku wysoce lipoidowym [127].

Należy dokonać rozróżnienia pomiędzy terminami „hydrofobowość” i „lipofilność”, które niekiedy uważane są za synonimowe. Zgodnie z zaleceniami IUPAC przyjęte są następujące definicje [138]:

hydrofobowość jest asocjacją niepolarnych grup lub cząsteczek w środowisku wodnym, która wynika z tendencji wody do wypychania niepolarnych molekuł.

lipofilność wyraża powinowactwo cząsteczki lub jej fragmentu do środowiska lipofilowego. Jest mierzona powszechnie dzięki rozdziałowi substancji w układach dwufazowych, zarówno ciecz–ciecz, jak i ciało stałe–ciecz.

Współczynnik podziału został zdefiniowany w 1872 r. przez Berthelota i Jungfleisha. Zauważyli oni, że ułamek równowagowego stężenia związku w dwu niemieszalnych rozpuszczalnikach jest stały, niezależnie od absolutnej wartości stężenia związku. Współczynnik podziału danej substancji jest charakterystyczną immanentną właściwością i zależy wyłącznie od typu dwu niemieszalnych rozpuszczalników i temperatury. Współczynniki podziału mogą być zatem tabelaryzowane, jako charakterystyczne stałe związku.

Jeżeli związek może istnieć w dwu niezależnych formach, jak np. zjonizowana i niezjonizowana, wówczas istotne będzie pH rozpuszczalnika wodnego [19, 138].

Wprowadzony przez Hansha w 1964 r. logarytm dziesiętny współczynnika podziału substancji w układzie 1-oktanol–woda, do dzisiaj jest standardową miarą lipofilności związków [138].

Stosowana metoda wyznaczania tego współczynnika, tzw. metoda wytrząsania polega na wytrząsaniu dwufazowego układu w rozdzielaczu. Związek wprowadzany jest do układu w rozpuszczalniku do którego ma większe powinowactwo (rozpuszczalność). Po pewnym czasie wytrząsania ustala się jego stężenie równowagowe w obydwu fazach. Wartość $\log P$ obliczana jest na podstawie równania:

$$\log P = \log\left(\frac{C_{1\text{-oktanol}}}{C_{\text{woda}}}\right). \quad (7.1)$$

Pozornie prosta procedura napotyka szereg praktycznych problemów, jak kontrola temperatury, określenie czasu ustalania równowagi (wytrząsania — najczęściej 3 h), oszacowanie objętości faz do prostej detekcji i określenia stężenia. Dla substancji o wystarczająco dużej rozpuszczalności w wodzie i silnej absorpcji UV metoda ta pozostaje rutynową [67].

Wartości podziału 1-oktanol—woda naają się do modelowania wiązania z białkami osocza i modelowania oddziaływań z błonami biologicznymi składającymi się w przeważającej mierze z białek. Dla innych typów błon bardziej odpowiednie mogą być inne rozpuszczalniki. Błony (lub receptory) mogą posiadać charakterystyki wiązania wodorowego różne od tych w 1-oktanolu. Zatem mogą nie zawierać żadnych akceptorów ani donorów (modelem mogą być alkany), mogą zawierać głównie grupy protonodonorowe (modelem może być chloroform) lub grupy protonoakceptorowe (jak w błonach fosfolipidowych). Do modelowania błon fosfolipidowych zaproponowano stosowanie dipelargonianu glikolu propylenowego (PGDP), jako fazy lipidowej, jednocześnie metoda wytrząsania została tu zastąpiona metodą mieszania [138].

Wprawdzie układ 1-oktanol—woda jest powszechnie przyjętym systemem odniesienia, dającym jedną ciągłą skalę do pomiarów hydrofobowości, ale jak widać posiada szereg poważnych ograniczeń. Pomiary są żmudne a ich powtarzalność pomiędzy laboratoriami jest niewielka. Oznaczenia można dokonać tylko w pewnym przedziale $2 < \log P < 4$. Metoda jest czasochłonna a problem określenia stężenia słabo rozpuszczalnych w wodzie substancji jeszcze zawęża jej stosowalność. Powolne ustalanie się równowagi wyklucza oznaczenia dla substancji powierzchniowo czynnych. Trudne jest również uzyskanie wiarygodnych wyników dla substancji lotnych i roztworów w których występują zjawiska asocjacji i dysocjacji. Dodatkowe problemy powodowane są przez tworzenie emulsji, rozdział faz, oraz zanieczyszczenia [19, 67].

Zanieczyszczenie związku o $\log P = 3$, substancją o wartości $\log P = 1$ w ilości 1% zmniejszy wartość do 2,72. Jeśli chodzi o czystość rozpuszczalników to wystarcza woda destylowana, ale dokładne oczyszczenie 1-oktanolu sprawia znaczne trudności [19].

Zalety wyznaczania współczynnika podziału metodami chromatograficznego zauważono już dość dawno. W 1940r. Martin i Synge wykazali, że wartości R_f uzyskane z chromatografii cienkowarstwowej (CC) mogą być powiązane ze współczynnikiem podziału zgodnie z równaniem:

$$P = k \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right), \quad (7.2)$$

gdzie wartość R_f związku X jest zdefiniowana jako stosunek odległości plamy substancji X ($O_X - O_0$) do czoła rozpuszczalnika od punktu startowego ($O_F - O_0$)

$$R_f = \frac{(O_X - O_0)}{(O_F - O_0)} \quad (7.3)$$

Wartości R_f zmieniają się w zakresie 0–1 lub procentowo 0–100 (wówczas zapisuje się hR_f).

Wykazano, że wartości R_M , zdefiniowane równaniem:

$$R_M = \log \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right) \quad (7.4)$$

są liniowo skorelowane z wartością $\log P$. Połączenie równań 7.3 i 7.4 daje:

$$R_M = \log \left(\frac{(O_F - O_0) - (O_X - O_0)}{O_X - O_0} \right) = \log \left(\frac{O_F - O_X}{O_X - O_0} \right). \quad (7.5)$$

Równanie Martina łączy wartość chromatograficznego współczynnika podziału R_M z logarytmem współczynnika podziału, $\log P_s$ w układzie identycznym z chromatograficznym:

$$R_M = \log P_s + \log \frac{V_s}{V_M} \quad (7.6)$$

gdzie V_s V_M są objętościami odpowiednio fazy stacjonarnej i ruchomej.

Wartości R_M są często ekstrapolowane do stężenia wody równego 1, jako hipotetycznego eluentu. Oznacza to brak organicznego modyfikatora w pomiarze TLC. Takie wartości są z reguły oznaczane R_{M0} lub R_{MW}

Standardowy współczynnik podziału $\log P$, jest liniowo powiązany ze współczynnikiem podziału chromatograficznego:

$$\log P = aR_M + b, \quad (7.7)$$

gdzie a i b to stałe [93, 138, 158].

Lipofilność można też szacować za pomocą technik obliczeniowych. Programy komputerowe przewidujące wartości współczynników $\log P$ dokonują tego na podstawie wbudowanych¹ (lub zewnętrznych) baz danych, gdzie stabelaryzowane są wartości poszczególnych grup chemicznych. Obliczenie dokonywane jest przez sumowanie tych wartości na podstawie wzoru strukturalnego. Programy często nie uwzględniają szczegółów strukturalnych cząsteczki, tzn. nie rozróżniają odmiennego otoczenia chemicznego niektórych fragmentów i ich oddziaływania z tym otoczeniem [94, 147].

Obliczone wartości są na ogół zbliżone do doświadczalnych, ale jest wiele odstępstw, zwłaszcza dla związków o złożonej strukturze, dla których zsumowanie inkrementów pochodzących od poszczególnych grup jest niewystarczające [122, 147]

Ze względu na wielkość współczynników lipofilności związki klasyfikuje się jako [73]:

hydrofilne	$\log P < -2$
słabo hydrofilne	$0 > \log P > -2$
lipofilne	$5 > \log P > 0$
silnie lipofilne	$8 > \log P > 5$
superlipofilne	$\log P > 8$.

Lipofilność jest jednowymiarową reprezentacją związanej ze strukturą, ogólnej właściwości, odzwierciedlającą jej tendencje do oddziaływania z innymi cząsteczkami. W modelowaniu molekularnym, gdzie rozważane są modele trójwymiarowe i konieczne staje się określenie bardziej subtelnego oddziaływania stała ta staje się niewystarczająca [59]. Niemniej, doświadczalne wyznaczenie ogólnego charakteru badanych pochodnych triterpenowych, daje dobry punkt wyjściowy do dalszych badań.

¹Baza programu ACD została utworzona na podstawie danych 18 400 związków.

Rozdział 8

Założenia i cel pracy

Zainteresowanie betuliną i innymi triterpenami zaczyna wzrastać w ostatnich latach. Jest ku temu wiele powodów. Triterpeny są jedną z najliczniejszych grup substancji występujących w świecie roślin, zwierząt i prymitywnych organizmów, takich jak np. bakterie, wliczając w to podkrólestwo *Archaea*.

Nie do końca wyjaśniona rola tych związków, biogeneza, biodegradacja, ciekawa struktura i właściwości stanowią silną motywację do zgłębiania tajników wiedzy o triterpenoidach.

Znanych jest obecnie kilka tysięcy związków triterpenowych (1508 haseł kluczowych w „Dictionary of Terpenoids” [30] i liczba ta stale rośnie).

Betulina podobnie jak lupeol i kwas betulinowy należy do grupy triterpenów pochodnych lupanu. Związki te posiadają wiele udokumentowanych danymi literaturowymi aktywności. Prace najczęściej im poświęcone dotyczą działania przeciwnowotworowego [2, 12, 13, 15, 18, 23, 27, 38, 39, 42, 56–58, 65, 79, 80, 95–98, 111, 118, 149, 150, 152, 153, 165, 170, 171, 175, 179, 192, 196, 197, 216, 223, 229]. Wśród innych opisywanych w literaturze właściwości wymienionych związków wskazywane jest ich działanie przeciwpierwotniakowe (w tym wobec *Plasmodium falciparum*) [26, 203, 228], przeciwzapalne [4, 61, 75, 87, 89, 125, 162, 220], hepatoprotekcyjne [72, 131, 139, 193, 227], przeciwkamicze [25, 208], chemoprewencyjne [53, 54, 181, 220] i przeciwwirusowe (również anty-HIV-1) [46, 62, 74].

Kwas betulinowy — pochodna betuliny — uznany został nawet za modelową substancję indukującą apoptozę w komórkach nowotworowych

Zbliżony strukturalnie do betuliny i kwasu betulinowego lupeol, również wykazuje działanie cytotoksyczne [132]. Można zatem powiedzieć, że pomiędzy tymi cząsteczkami istnieje znaczne podobieństwo budowy i właściwości.

Dostępność betuliny należy do najwyższych wśród wszystkich triterpenów. Jest ona głównym składnikiem ekstraktu z kory brzozy brodawkowatej obok innych gatunków brzoź. W zewnętrznej warstwie kory tych drzew występuje w ilości do ok. 25%, czemu zawdzięczają one swoje białe zabarwienie. Jej obecność stwierdzono w ponad 240 innych gatunkach roślin, w różnych ich częściach morfotycznych takich jak: kora, korzenie, liście, kwiaty, itd., lecz tam stanowi od ułamka do kilku procent [70].

Betulina jest zatem potencjalną substancją leczniczą w wymienionych chorobach. Wprowadzenie jednak nowej substancji chemicznej do celów farmaceutycznych poprzedzone być musi licznymi doświadczeniami, wśród których oznaczenie cytotoksyczności podstawowej jest jednym z kluczowych aspektów farmakologicznych.

Pierwszym etapem oznaczania cytotoksyczności jest przeprowadzenie licznych testów

na liniach komórek zwierzęcych i ludzkich. Następnym powinno być określenie wpływu substancji na zwierzęta, i dopiero po pozytywnym jego przejściu związek może być wprowadzony w procedury badań przedklinicznych i klinicznych [160].

Prawidłowe przeprowadzenie początkowych faz badań, tj. oznaczeń parametrów fizykochemicznych i oceny działania związków na linie komórkowe, umożliwia przewidywanie właściwości farmakologicznych i farmakokinetycznych, a także zredukowanie liczby eksperymentów na zwierzętach [225].

Do określenia mechanizmu działania biologicznego danej substancji przydatne są modyfikacje struktury chemicznej. Przekształcenie określonych funkcji chemicznych obecnych w danym związku chemicznym w inne, a później zbadanie aktywności biologicznej uzyskanych pochodnych, pozwala na wydedukowanie roli grup funkcyjnych w danym aspekcie aktywności. Do tego celu, obok wyznaczenia podstawowych parametrów fizykochemicznych, przydatne jest również określenie innych właściwości cząsteczkowych, jak np. lipofilności [178].

Sam ekstrakt z kory brzozy brodawkowatej zaczyna być stosowany na świecie jako substancja o działaniu tonizującym, ściągającym, łagodzącym i oczyszczającym, stanowiąc dodatek do kosmetyków. Suchemu ekstraktowi nadano nawet nr CAS: 84012-15-7; EINECS/ELINCS 281-660-9 (dane ze strony [www Food and Drug Administration](http://www.FoodandDrugAdministration.gov)). W aktualnym piśmiennictwie brak jest prac poświęconych szerszym badaniom cytotoksyczności betuliny.

Podstawowym zamierzeniem niniejszej pracy było zbadanie działania cytotoksycznego betuliny na komórki linii nowotworowych i prawidłowych oraz podjęcie dyskusji ewentualnej zależności: struktura—aktywność (SAR) z uwzględnieniem danych z piśmiennictwa.

W trakcie realizacji tego zamierzenia wyłoniły się następujące problemy badawcze:

- konieczność izolacji betuliny o wysokim stopniu czystości,
- synteza pochodnych betuliny z przekształconymi grupami funkcyjnymi związku macierzystego,
- potwierdzenie struktury uzyskanych związków,
- oznaczenie cytotoksyczności betuliny i jej pochodnych na kilku liniach komórkowych z wykorzystaniem różnych metod *in vivo*,
- wyznaczenie lipofilności otrzymanych związków,
- określenie zależności pomiędzy strukturą półsyntetycznych pochodnych betuliny a ich aktywnością cytotoksyczną.

Część II
Doświadczalna

Rozdział 9

Materiał i metody

9.1 Metody

Temperatury topnienia ($^{\circ}\text{C}$) zmierzono na aparacie Koefflera — wartości są nieskorygowane.

Widma magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) zarejestrowano na spektrometrze Varian Mercury-VX¹, przy częstościach: dla protonów (^1H) 300 MHz, i 75 MHz dla atomów węgla (^{13}C). Rozpuszczalnikiem dla wszystkich związków był deuterowany chloroform (CDCl_3). Przesunięcia chemiczne są wyrażone jako wartości δ (ppm) z tetrametylosilanem (TMS) jako wzorcem wewnętrznym. Multipletowość sygnałów na widmach ^1H NMR oznaczono symbolami: s — singlet, d — dublet, t — tryplet, dd — dublet dubletów, td — tryplet dubletów, m — multiplet. Stałe sprzężenia (J) wyrażone są w Hz.

Widma masowe (MS ESI) uzyskano na aparacie Finnigan MAT 95S² (przy ustawieniach: 0,4 mA, 7 V, fotonielacz 1,5 kV).

Widma w podczerwieni (IR) na aparacie Jasco FT/IR-410³ w tabletkach KBr.

Widmo UV-VIS betuliny zmierzono na spektrometrze UV/VIS Jasco V-530⁴ w CHCl_3 .

Fotografie komórek wykonano na odwróconym mikroskopie sprzężonym z cyfrowym aparatem fotograficznym Nikon Eclipse TS100, przy powiększeniu 100-krotnym.

Wykaz wykorzystanych programów komputerowych znajduje się w dodatku C na str. 213.

9.1.1 Chromatografia cienkowarstwowa

Do badania produktów syntez pochodnych betuliny stosowano krótkie płytki o przeciętnych rozmiarach $3 \times 2\text{--}8$ cm (wys. \times szer.), które rozwijano w komorze cylindrycznej⁵ o wymiarach $2,5 \times 10$ cm ($\phi \times$ długość; Sigma) na drodze ok. 2,5 cm.

¹Pracownia Spektroskopii Magnetycznego Rezonansu Jądrowego Wydziału Farmaceutycznego UJ CM.

²Środowiskowe Laboratorium Analiz Fizykochemicznych i Badań Strukturalnych UJ, Ingardena 3, Kraków.

³Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego UJ CM.

⁴Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego UJ CM.

⁵Komorę stanowi ustawiony poziomo walec ze szczeliną na górze. Dzięki małym rozmiarom komora wysyciała się bardzo szybko a czas rozwijania chromatogramów wynosił przeciętnie 30 s a objętość stosowanego eluentu 2,5–3 ml.

Do sprawdzania czystości i tożsamości związków po krystalizacji i/lub oczyszczeniu chromatograficznym stosowano płytki o długości 11–12 cm. Chromatogramy rozwijano na drodze 8–10 cm w komorze o wymiarach 13 × 10 × 8 cm (wys. × szer. × gł.). Komora była wstępnie wysycana odpowiednim układem rozwijającym przez co najmniej 30 min w temperaturze 20–25 °C.

Chromatogramy wywoływano w parach jodu lub/i (po wysublimowaniu jodu) przez spryskiwanie 20% metanolem roztworem kwasu siarkowego i ogrzewanie suszarką ręczną lub nad płomieniem palnika do pojawienia się barwnych plam⁶.

Stosowane mieszaniny elucyjne zawierały z reguły lotne składniki, dlatego wartości R_f wyrażono względem betuliny (**BET**) R_f^{BET} lub dioctanu betuliny (**BC2**) R_f^{BC2} .

9.2 Odczynniki

Stosowane odczynniki pochodziły od następujących producentów:

bezwodnik octowy (cz.d.a.), bezwodnik propionowy (cz.), chlorek kwasu benzoowego (cz., destylowany przed użyciem), pirydyna (cz., przed użyciem destylowano z nadpeletek KOH), siarczyn sodowy bezw. (cz.), heksacyjanożelazian (III) potasowy ($K_4[Fe(CN)]_6$) (cz.), heksacyjanożelazian (II) potasowy ($K_3[Fe(CN)]_6$) (cz.) — POCH, Gliwice;
 metanol (cz.d.a.), chlorek metylenu (cz., cz.d.a.), chloroform (cz.d.a.), 2-propanol (cz., cz.d.a.), 1,4-dioksan do syntez (cz.), cykloheksan (cz.d.a.), kwas octowy lodowaty (cz.d.a.) octan sodowy (cz.d.a.), octan etylu (cz.d.a.), heksan (frakcja z nafty, cz.), węgiel aktywny Norit SX 2 (cz.d.a.) — Chempur, Piekary;
 cholesterol (cz., >99%) — Aldrich, Milwaukee, USA;
 doksorubicyna (cz.d.a.), MTT (cz.d.a.), dimetylosulfotlenek (cz.d.a.), błękit trypanu (cz.d.a., 0,4% w 0,81% NaCl i 0,06% KH_2PO_4), kolchicyna (cz.), 2-butoksyetanol (cz.d.a.) — Sigma;
 1,4-dioksan (>99,8% do spektroskopii UV), chlorek kaproliu (cz.), chlorek kaprynoilu (cz.), chlorek kapryloilu (cz.), chlorek lauroilu (cz.), chlorek palmitoilu (cz.), bromoimid kwasu bursztynowego (cz.), bezwodnik kwasu ftalowego (cz.), bezwodnik kwasu glutarowego (cz.), etylenodiaminatetraacetylożelazian (III) sodowy (cz.), katalizator palladowy (10% Pd/C) — Fluka;
 bromek 1-butylo-3-metyloimidazoliowy — Aldrich; zestaw do testu LDH — CytoTox 96, Promega (USA).

⁶Kolor plam nie może być podstawą do potwierdzania tożsamości związków. Barwa jest zmienna i zależy m. in. od ilości naniesionej substancji. Plamy były nietrwałe, zwłaszcza pod wpływem wilgoci. Nie ma wyjaśnienia chemizmu powstawania zabarwienia na płytce pod wpływem stężonego kwasu siarkowego i temperatury.

9.3 Izolacja i oczyszczanie betuliny (BET)

Korę — jako surowiec do ekstrakcji — zebrano z ok. pięcioletniego drzewa brzozy brodawkowatej *Betula verrucosa* Ehrh. rosnącego w Lanckoronie. Drzewo po ścięciu okorowano a zebraną korę pocięto na drobne kawałki o przeciętnych wymiarach 2 cm² i suszono w temperaturze pokojowej przez okres jednego miesiąca.

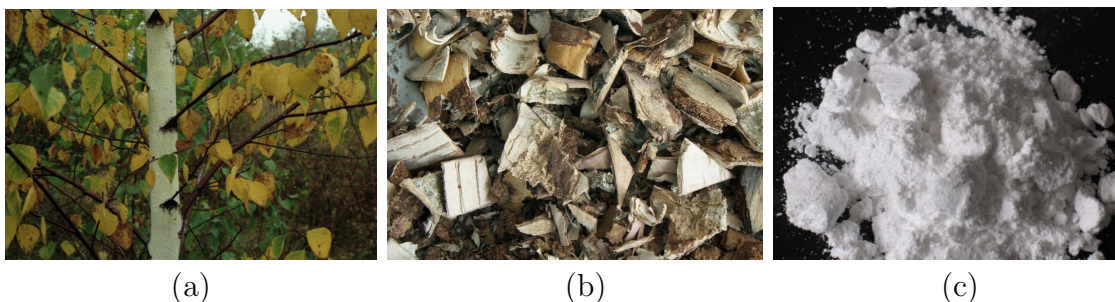
Ekstrakcję kory prowadzono na łaźni wodnej w aparatach Soxhleta, w gilzach wykonanych z bibuły Whatman Nr 4 zawierających po 100 g kory.

Korę wstępnie ekstrahowano heksanem (frakcja z nafty; 500 ml) przez 50 h (5 × 10 h), a następnie chlorkiem metylenu (500 ml) przez 50 h (5 × 10 h).

Po odparowaniu ekstraktu heksanowego uzyskiwano przeciętnie 3,3–3,5 g s.s., natomiast z ekstraktu dichlorometanowego 12–13 g.

Z 900 g kory uzyskano 100 g surowego suchego ekstraktu dichlorometanowego⁷.

Betulinę wyizolowano z ekstraktu i oczyszczono dwoma metodami, przedstawionymi poniżej.



Rys. 9.1: Brzoza biała *Betula verrucosa* Ehrh. (a), wysuszona, rozdrobniona kora (b), krystaliczna betulina (c)

Metoda A: 20 g surowego ekstraktu ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną w 2% metanowym roztworze KOH przez 10 h. Kolbę pozostawiono na noc w temp. 20 °C, po czym na lejku Büchnera odsączono osad, który przemyto obficie wodą⁸. Wydzieloną betulinę (ok. 15 g) krystalizowano na gorąco z 2-propanolu. Po trzykrotnej krystalizacji uzyskano ok. 4,5 g betuliny częściowo zanieczyszczonej lupeolem. Do całkowitego usunięcia lupeolu stosowano krystalizację z mieszaniny toluen—metanol 1 : 4, a następnie z acetonu.

Metoda B: 31,8 g surowego ekstraktu ogrzewano pod chłodnicą zwrotną z 200 ml heksanu przez 4 h. Po nieznacznym ostudzeniu zawartość kolby przesączono przez lejek Büchnera. Przesącz po odparowaniu zawierał 0,35 g s.s. składającej się głównie z lupeolu i betuliny, co stwierdzono na podstawie TLC. Osad po odsączeniu poddano wyczerpującej acetylacji: rozpuszczono w 40 ml pirydyny (bezw.), dodano 80 ml bezwodnika octowego oraz 20 ml chlorku metylenu i ogrzewano na wrzącej łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 3 h. Po tym czasie dodawano porcjami 30 ml wody destylowanej i kolbę ogrzewano jeszcze

⁷Ekstrakt ten miał jasnożółte zabarwienie i przyjemny charakterystyczny zapach, pochodzący prawdopodobnie od związków seskwiterpenowych o małej lotności; suszenie ekstraktu na obrotowej wyparce próżniowej przez 2 h w 100 °C nie powodowało jego eliminacji.

⁸Ze względu na silne pienienie przesączu konieczne było użycie wysokiej kolby ssawkowej.

przez 30 min. Następnie dodano 120 ml etanolu i ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 1 h, po czym pozostawiono na noc w temp. 20 °C. Z roztworu wypadł osad, który odsączono na lejku Büchnera. Następnie po przemyciu wodą i etanolem osad wysuszone. Osad rozpuszczono w 140 ml mieszaniny heksan—chlerek metylenu, dodano 1 g węgla aktywnego Norit SX 2 i ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 20 min. Mieszaninę schłodzono, przesączono przez warstwę (2 cm) żelu krzemionkowego i odparowano rozpuszczalnik na wyparce obrotowej. Uzyskano w ten sposób 18 g (34,2 mmol) surowego dioctanu betuliny (**BC2**), który rozpuszczono na gorąco w 500 ml 2-propanolu. Do kolby dodano 15 ml roztworu 11 g KOH (196 mmol) w wodzie i ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 5 h. Mieszaninę pozostawiono na noc w temp. 20 °C, po czym odsączono bezbarwny, drobny osad, czystej betuliny (ok. 18 g), którą przekryształizowano z acetonu. Uzyskano 10 g czystej i 5,5 g słabo zanieczyszczonej betuliny.

Czysta betulina (**BET**): t.t. 252–253 °C (lit. 255–256 °C [116]).

$R_f = 0,31$ (CHCl₃—EtOAc 8 : 1).

NMR ¹H (δ, ppm): 4,68; 4,58 (każdy m, 1H, H-29); 3,80 (d, 1H, $J_{AX} = 10,64$; H-28) i 3,33 (d, 1H, $J_{AX} = 10,64$; H-28); 3,18 (dd, 1H, $J_{AX} = 11,11$; $J_{AM} = 5,41$; H-3); 2,38 (td, 1H, $J_{AX} = 10,46$; $J_{AM} = 5,69$; H-19); 1,68 (s, 3H, CH₃-30); 1,02 (s, 3H, CH₃); 0,98 (s, 3H, CH₃); 0,97 (s, 3H, CH₃); 0,83 (s, 3H, CH₃); 0,77 (s, 3H, CH₃);

NMR ¹³C (δ, ppm): 150,46; 109,67; 78,96; 60,55; 55,29; 50,40; 48,76; 47,78; 42,71; 40,91; 38,85; 38,70; 37,31; 37,15; 34,23; 33,96; 29,75; 29,17; 27,97; 27,39; 27,04; 25,21; 20,82; 19,07; 18,29; 16,09; 15,97; 15,34; 14,75 (widma NMR rys. 1 na str. 182, dokładne przypisanie sygnałów w tabeli 1, str.210).

IR ν_{max} KBr (cm⁻¹): 3409; 3083; 1643; 1617; 1454; 1386; 1375; 1027; 882.

UV-VIS: $\lambda_{max} = 210$ nm.

M.cz. obl. C₃₀H₅₀O₂ 442,73; znal. 442,4 (MS ESI).

9.3.1 Izolacja i identyfikacja lupeolu (**LUP**) — głównego zanieczyszczenia ekstraktu kory brzozy *Betula verrucosa* Ehrh.

3 g surowego ekstraktu z kory, po opisanej powyżej wyczerpującej acetylacji surowej betuliny, rozpuszczono na gorąco w heksanie (100 ml) i poddano rozdzielaniu na suchej kolumnie z żelem krzemionkowym (70–230 mesh, typ 60, Merck), eluując mieszaniną heksan—EtOAc 20 : 0–10 : 1. Zebrane frakcje połączono na podstawie analizy chromatograficznej (TLC) i odparowano rozpuszczalnik na wyparce obrotowej. Uzyskano w ten sposób czysty dioctan betuliny (**BC2**) (ok. 2 g) oraz octan lupenyłu (**ACLUP**) (ok. 100 mg).

Związek zidentyfikowano jako: 3β-acetoksy-lup-20(29)-en.

$R_f^{BC2} = 1,5$ (heksan—EtOAc 8 : 1), t.t. 199–209 °C.

NMR ¹H (δ, ppm): 4,47 (m, 1H; H-3); 2,37 (td, 1H, $J_{AX} = 10,98$; $J_{AM} = 5,57$; H-19); 4,57 i 4,68 (każdy m, 1H; H-29); 1,68 (s, 3H; H-30); 1,03 (s, 3H, CH₃); 0,93 (s, 3H, CH₃); 0,85 (s, 3H, CH₃); 0,83 (s, 3H, CH₃); 0,82 (s, 3H, CH₃); 0,79 (s, 3H, CH₃);

NMR ¹³C (δ, ppm): 170,99; 150,96; 109,32; 80,97; 55,38; 50,35; 48,29; 48,00; 42,98; 42,82; 40,85; 39,99; 38,38; 38,05; 37,79; 37,08; 35,56; 34,21; 29,83; 27,93; 27,43; 25,10; 23,70; 21,29; 20,94; 19,27; 18,19; 17,98; 16,48; 16,16; 15,96; 14,49 (widma NMR rys. 5 na str. 186).

100 mg 3-octanu lupenyłu (**ACLUP**) poddano hydrolizie alkalicznej w 2% metanolemowym roztworze KOH (40 ml) przez 3 h w t.w. pod chłodnicą zwrotną. Po ochłodzeniu

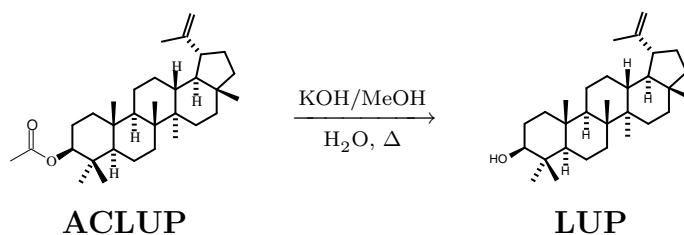
9.3. Izolacja i oczyszczanie betuliny (**BET**)

rozcieńczono roztwór wodą (100 ml). Wypadł biały, drobny, krystaliczny osad, który oddzielono na lejku Büchnera, przemyto kilkakrotnie wodą i po wysuszeniu krystalizowano z chloroformu, uzyskując czysty lupeol (**LUP**).

Związek zidentyfikowano jako: lup-20(29)-en-3 β -ol.

T.t. 189–193 °C (lit. 212–213 °C, eter—etanol [114]).

$R_f^{BET} = 1,9$ (CHCl₃—EtOAc 8 : 1), $R_f^{BC2} = 0,6$ (heksan—EtOAc 8 : 1).



Schemat 50: Hydroliza octanu lupenyłu (**ACLUP**)

NMR ¹H (δ , ppm): 3,18 (dd, 1H, $J_{AX} = 10,77$; $J_{AM} = 5,39$; H-3); 2,38 (dd, $J_{AX} = 11,06$; $J_{AM} = 5,61$; H-19); 4,57 (m, 1H; H-29) i 4,69 (m, 1H; H-29); 1,68 (s, 3H; H-30); 1,02 (s, 3H, CH₃); 0,94 (s, 3H, CH₃); 0,84 (s, 3H, CH₃); 0,84 (s, 3H, CH₃); 0,83 (s, 3H, CH₃); 0,78 (s, 3H, CH₃).

NMR ¹³C (δ , ppm): 150,95; 109,30; 105,00; 78,99; 55,30; 50,44; 48,30; 47,97; 42,98; 42,82; 40,83; 40,00; 38,84; 38,71; 38,05; 37,17; 35,58; 34,29; 29,85; 29,68; 27,98; 27,42; 25,15; 20,92; 19,30; 18,31; 17,99; 16,10; 15,97; 15,35; 14,54 (widma NMR rys. 3 na str. 184, dokładne przypisanie sygnałów w tabeli 1, str.210).

IR ν_{max} KBr (cm⁻¹): 3412; 3068; 2871; 1638; 1617; 1453; 1380; 1042; 880.

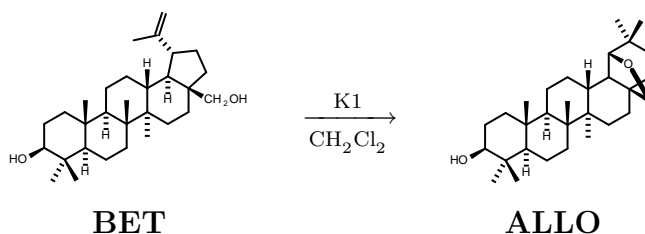
M.cz. obl. dla C₃₀H₅₀O 426,73; znal. 426,6 (MS ESI).

9.4 Synteza pochodnych betuliny

9.4.1 Synteza allobetuliny (ALLO)

0,44 g (1 mmol) betuliny (**BET**) zawieszono w 50 ml CH_2Cl_2 poddając sonikacji ultradźwiękami. Dodano 1,3 g katalizatora (K1) sporządzonego przez dokładne roztarcie w moździerzu porcelanowym 1,1 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ z 2,2 g żelu krzemionkowego (70–230 mesh, typ 60, Merck). Po 30 min sonikacji ok. 80% betuliny uległo przereagowaniu. Roztwór pozostawiono na 12 h (bez sonikacji) w temp. 20 °C. Po tym czasie nastąpiło całkowite przereagowanie. Do kolbki wiano ok. 20 ml wody i intensywnie mieszano przez 10 min. Po oddzieleniu frakcji organicznej w rozdzielniku, osuszono bezwodnym Na_2SO_4 i odparowano rozpuszczalnik. Osad przekrystalizowano z 10 ml cykloheksanu, a następnie 21 ml mieszaniny $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 20 : 1. Uzyskano drobnokrystaliczny płatkowaty osad o kształcie drobnych trójkątów.

Wydażność 95% (po oczyszczeniu 70%).



Schemat 51: Izomeryzacja betuliny (**ALLO**)

Związek zidentyfikowano jako: 19 β ,28-epoksy-18 α -olean-3 β -ol.

$R_f^{\text{BET}} = 1,54$ ($\text{CHCl}_3-\text{EtOAc}$ 8 : 1).

T.t. 269–272 °C (lit.: 266–268 °C [116]) **NMR** ^1H (δ , ppm): 3,17 (dd, 1H, $J_{AX} = 10,99$; $J_{AM} = 5,36$; H-3) 3,51 (s, 1H; H-19); 3,42 i 3,75 (każdy d, 1H, $J_{AX} = J_{XA} = 7,77$; H-28), 0,75 (s, 3H, CH_3); 0,78 (s, 3H, CH_3); 0,83 (s, 3H, CH_3); 0,89 (s, 3H, CH_3); 0,91 (s, 3H, CH_3); 0,95 (s, 3H, CH_3);

NMR ^{13}C (δ , ppm): 87,89; 78,86; 71,22; 55,50; 51,07; 46,82; 41,45; 40,69; 40,60; 38,93; 38,87; 37,24; 36,73; 36,24; 34,13; 33,91; 32,70; 28,80; 27,98; 27,40; 26,43; 26,25; 24,53; 20,97; 18,25; 16,46; 15,70; 15,38; 13,49; (widma NMR rys. 11 na str. 187, dokładne przypisanie sygnałów w tabeli 2, str.211).

IR ν_{max} KBr (cm^{-1}): 3853; 2937; 2867; 1636; 1451; 1386; 1301; 1264; 1206; 1138; 1040; 768.

M.cz. obl. $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$ 442,73.

Izomeryzacja pod wpływem katalizatora K1 zachodzi również w chloroformie, cykloheksanie i toluenie, a nie zachodzi w metanolu, nawet po 72 h w temp. 20 °C, ani po 5 h w t.w.

Równolegle przeprowadzono trzy reakcje, w których katalizatorem były inne kompleksy żelaza roztarte analogicznie z żelazem krzemionkowym: heksacyjanożelazian (II) potasowy ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), heksacyjanożelazian (III) potasowy ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) i etylenodiaminatetraacetylożelazian (III) sodowy. Nawet długotrwałe ogrzewanie pod chłodnicą zwrotną (2×12 h) we wrzącym roztworze CH_2Cl_2 , nie prowadziło do zajścia jakiegokolwiek reakcji.

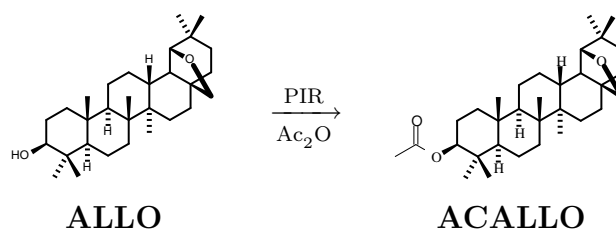
9.4.2 Synteza 3-octanu allobetuliny (ACALLO)

100 mg (0,23 mmol) allobetuliny (**ALLO**) rozpuszczono w 3 ml bezwodnej pirydyny i ogrzewano do wrzenia z 2,5 ml (24 mmol) bezwodnika octowego pod chłodnicą zwrotną przez 20 min. Dodano 20 ml wody, następnie intensywnie zamieszano i pozostawiono na 1 h. Zawiesinę powstałego drobnego osadu przesączono przez mały zwitek waty umieszczony w nóżce lejka, przemyto kilkakrotnie wodą, metanolem (5 ml) i rozpuszczono w chloroformie (10 ml). Po zateżeniu przesączu do połowy objętości związek wytrącono wlewając metanol (ok. 15 ml). Po wysuszeniu otrzymano bezbarwny, płatkowaty osad.

Wydajność 92% (po oczyszczaniu 43%).

Związek zidentyfikowano jako: 3 β -acetoksy-19 β ,28-epoksy-18 α -olean.

T.t. 289–291 °C (lit. 287–287,5 [116]).



Schemat 52: Synteza octanu allobetuliny (**ACALLO**)

NMR ^1H (δ , ppm): 4,47 (m, 1H; H-3); 3,51 (s, 1H; H-19); 3,76 i 3,42 (d, $J_{AX} = 8,00$, $J_{XA} = 8,00$; H-28), 2,01 (s, 3H, grupa acetylowa) (widmo ^1H NMR na str. 208).

M.cz. obl. dla $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_3$ 484,76; znal. 484,5 (MS ESI).

9.4.3 Synteza dioctanu betuliny (BC2)

4,4 g (9,94 mmol) betuliny (**BET**) rozpuszczono w 10 ml bezwodnej pirydyny z 30 ml bezwodnika octowego i 20 ml CH_2Cl_2 . Mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w t.w. przez 2 h. Następnie chlorek metylenu oddestylowano na wyparce próżniowej a do pozostałego roztworu wiano porcjami 60 ml wody i pozostawiono kolbę w temp. 20 °C na 4 h. Powstał osad, który odsączono na lejku Büchnera, przemyto obficie wodą i kilkakrotnie przekrystalizowano z mieszaniny metanol–chlorek metylenu 4 : 1. Uzyskano biały krystaliczny osad.

Wydajność 98% (po oczyszczaniu ok. 50%).

Związek zidentyfikowano jako: 3 β ,28-diacetoksy-lup-20(29)-en.

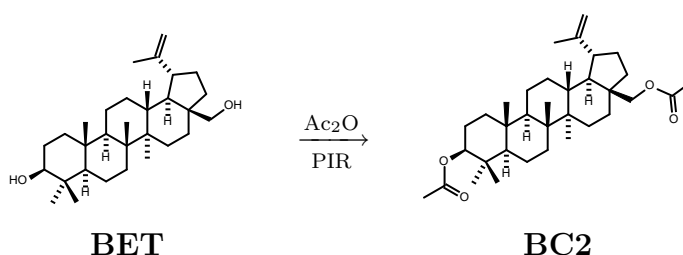
T.t. 220–222 °C (lit.: 221–222 °C [114], 224–226 °C [116]).

$R_f^{BET} = 2,9$ (CHCl_3 —EtOAc 8 : 1); $R_f^{BC2} = 7,6$ (heksan—EtOAc 8 : 1).

NMR ^1H (δ , ppm): 4,68 i 4,58 (każdy m, 1H; H-29); 4,46 (dd, 1H, $J_{AX} = 10,35$; $J_{AM} = 5,79$; H-3); 4,24 i 3,84 (każdy d, 1H, $J_{AX} = J_{XA} = 10,76$; H-28); 2,43 (td, 1H, $J = 10,87$; $J_{AM} = 5,77$; H-19);

NMR ^{13}C (δ , ppm): 171,61; 170,99; 150,10; 109,89; 80,87; 62,77; 55,34; 50,24; 48,73; 47,69; 46,27; 42,65; 40,85; 38,35; 37,76; 37,52; 37,03; 34,52; 34,09; 29,70; 29,53; 27,92; 27,01; 25,10; 23,66; 21,32; 21,05; 20,77; 19,08; 18,14; 16,48; 16,15; 16,01; 14,70 (widma NMR rys. 11 na str. 192).

IR ν_{max} KBr (cm^{-1}): 3454; 3068; 2951; 2871; 1737; 1466; 1456; 1388; 1366; 1245; 1029; 1015; 980; 889.

Schemat 53: Synteza dioctanu betuliny (**BC2**)

M.cz. obl. dla $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_4$ 526,80; znal. 526,4 (MS ESI).

9.4.4 Synteza 3-octanu betuliny (**3MOB**)

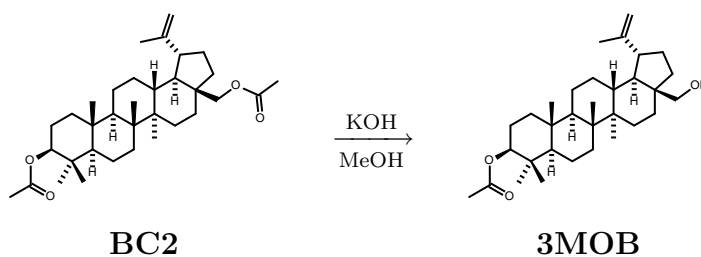
2,40 g (4,55 mmol) dioctanu betuliny (**BC2**) rozpuszczono w mieszaninie 50 ml 1,4-dioksanu, 50 ml CHCl_3 i 100 ml MeOH, a następnie wkroplono r-r 0,26 g KOH (4,63 mmol) w 10 ml MeOH z 0,5 ml wody. Całość intensywnie zamieszano i pozostawiono w temp. 20 °C na 2 doby, mieszając co pewien czas. Roztwór rozcieńczono w rozdzielniku wodą destylowaną. Frakcję chloroformową po kilkukrotnym przemyciu wodą, oddzielono i osuszono bezwodnym Na_2SO_4 . Po rozdzielaniu związku na kolumnie z żelalem krzemionkowym, frakcje zawierające sam 3-octan, połączono i po odparowaniu rozpuszczalnika przekrystalizowano z mieszaniny metanol–chloroform 4 : 1. Uzyskano biały krystaliczny osad (kryształy igielkowe).

Wydajność 75% (po oczyszczeniu ok. 50%).

Związek zidentyfikowano jako: 3 β -acetoksy-lup-20(29)-en-28-ol.

T.t. 256–260 °C (lit. 260–260,5 °C [16]).

$R_f^{\text{BET}} = 2$ (CHCl_3 —ETOAc 8 : 1).

Schemat 54: Synteza 3-octanu betuliny (**3MOB**)

NMR ^1H (δ , ppm): 4,46 (dd, 1H, $J_{\text{AX}} = 10,76$; $J_{\text{AM}} = 5,38$; H-3); 2,38 (td, 1H, $J_{\text{AX}} = 10,60$; $J_{\text{AM}} = 5,86$; H-19); 3,32 i 3,79 (każdy d, 1H, $J_{\text{AX}} = J_{\text{XA}} = 11,30$; H-28); 4,57 i 4,67 (każdy m, 1H; H-29); 1,67 (s, 3H; H-30);

NMR ^{13}C (δ , ppm): 171,04; 150,45; 109,71; 80,92; 60,52; 55,35; 50,27; 48,71; 47,79; 47,76; 42,68; 40,91; 38,35; 37,78; 37,27; 37,05; 34,13; 33,95; 29,71; 29,14; 27,93; 27,01; 25,14; 23,68; 21,33; 20,82; 19,05; 18,17; 16,48; 16,16; 15,96; 14,70 (widma NMR rys. 11 na str. 190);

IR ν_{max} KBr (cm^{-1}): 3419; 3073; 2943; 1731; 1643; 1465; 1454; 1374; 1246; 1025; 979; 887.

M.cz. obl. $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_3$ 484,76, znal. 484,3 (MS ESI).

9.4.5 Synteza 28-octanu betuliny (28MOB)

5 g (11,29 mmol) wstępnie oczyszczonej betuliny rozpuszczono w mieszaninie 40 ml bezwodnej pirydyny i 100 ml CH_2Cl_2 . W celu zmniejszenia prawdopodobieństwa estryfikacji drugorzędowych grup hydroksylowych betuliny wiano 60 ml 2-propanolu, po czym 10 ml (106 mmol) bezwodnika octowego. Roztwór mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego, monitorując przebieg reakcji za pomocą TLC. Po upływie 2,5 h reakcję przerwano dodając 20 ml wody i mieszając przez 30 min. Roztwór rozwarstwiono 150 ml wody, przelano do rozdzielacza i pięciokrotnie przemyto 100 ml wody. Do frakcji organicznej wiano 20 ml MeOH (w celu łatwiejszego odpędzenia resztek CH_2Cl_2) i zatężono na wyparce próżniowej do objętości ok. 40 ml, rozcieńczono 200 ml etanolu, a następnie dodano 50 ml wody i zamieszano. Roztwór pozostawiono na 48 h. Osad, który wypadł z roztworu, odsączono na lejku Büchnera, przemyto wodą i wysuszono.

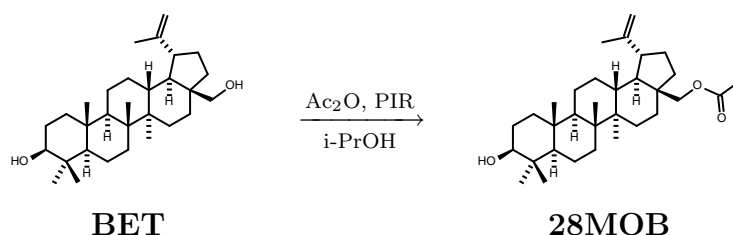
Po kilkukrotnej chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym i krystalizacji z mieszaniny chloroform—metanol 1 : 3 uzyskano krystaliczny związek w postaci długich igieł.

Wydażność 70% (po oczyszczeniu ok. 50%).

Związek zidentyfikowano jako: 28-acetoksy-lup-20(29)-en-3 β -ol.

T.t. 219–221 °C (lit. 210–212 °C [60]).

$R_f^{BET} = 1,7$ (CHCl_3 —ETOAc 8 : 1).



Schemat 55: Synteza 28-octanu betuliny (28MOB)

NMR ^1H (δ , ppm): 3,18 (dd, 1H, $J_{AX} = 10,66$; $J_{AM} = 5,14$; H-3); 2,44 (td, 1H, $J_{AX} = 11,02$; $J_{AM} = 5,88$; H-19); 3,85 i 4,24 (każdy d, 1H, $J_{AX} = J_{XA} = 11,00$; H-28), 4,58 i 4,68 (każdy m, 1H, H-29); 1,67 (s, 3H, H-30);

NMR ^{13}C : 171,58; 150,13; 109,82; 62,80; 55,30; 50,38; 48,79; 47,68; 46,30; 42,69; 40,87; 38,85; 38,71; 37,58; 37,15; 34,54; 34,20; 29,76; 29,59; 27,97; 27,40; 27,06; 25,20; 21,02; 20,78; 19,11; 18,28; 16,07; 16,02; 15,33; 14,75 (widma NMR rys. 11 na str. 191);

IR ν_{max} KBr (cm^{-1}): 3561; 3474; 3086; 2940; 2868; 1721; 1644; 1453; 1388; 1366; 1261; 1044; 983; 888.

M.cz. obl. $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_3$ 484,76, znal. 484,4 (MS ESI).

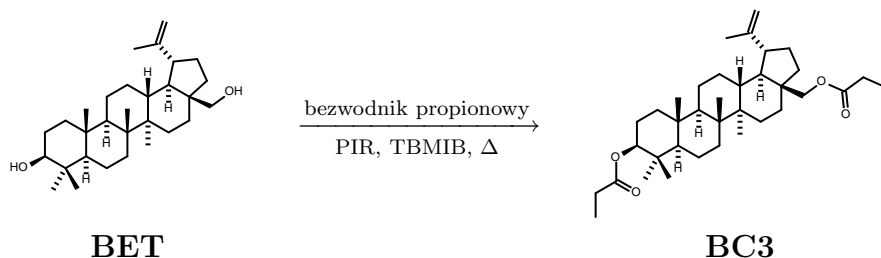
9.4.6 Synteza dipropionianu betuliny (BC3)

2,2 g (4,96 mmol) betuliny (**BET**) ogrzewano do wrzenia z 30 ml (455 mmol) bezwodnika propionowego z dodatkiem 10 ml pirydyny przez 4 h. Reakcję monitorowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Do kolby wiano porcjami 50 ml wody utrzymując roztwór we wrzeniu przez 30 min. Wyłączono ogrzewanie, dodano jeszcze 50 ml wody i 20 ml metanolu, ostudzono i odsączono na lejku Büchnera. Po kilkukrotnej krystalizacji z mieszaniny metanol—chlorek metylenu 4 : 1 uzyskano biały krystaliczny osad o t.t. 169–170 °C (lit.: 164–165 °C, [16]).

Wydajność 85% (po oczyszczeniu ok. 45%).

Związek zidentyfikowano jako: 3,28-dipropionoiloksy-lup-20(29)-en.

$R_f^{BC2} = 1,3$ (heksan—EtOAc 8 : 1).



Schemat 56: Synteza dipropionianu betuliny (**BC3**)

NMR ^1H (δ , ppm): 4,46 (dd, 1H, $J_{AX} = 9,84$; $J_{AM} = 5,74$; H-3); 2,43 (td, 1H, $J_{AX} = 10,94$; $J_{AM} = 5,57$; H-19); 3,23 i 4,26 (każdy d, 1H, $J_{AX} = 10,66$, $J_{XA} = 10,66$, H-28), 4,57 i 4,67 (każdy m, 1H, H-29); 1,67 (s, 3H, H-30); 1,02 (s, 3H, CH_3); 0,96 (s, 3H, CH_3); 0,83 (s, 3H, CH_3); 0,83 (s, 3H, CH_3); 0,82 (s, 3H, CH_3);

NMR ^{13}C : 174,91; 174,28; 150,14; 109,85; 80,57; 62,52; 55,35; 50,25; 48,76; 47,70; 46,40; 42,67; 40,87; 38,34; 37,85; 37,52; 37,04; 34,54; 34,08; 29,75; 29,56; 28,05; 27,93; 27,70; 27,03; 25,12; 23,69; 20,77; 19,10; 18,14; 16,51; 16,13; 16,01; 14,72; 9,33; 9,23, (widma NMR rys. 11 na str. 194).

M.cz. obl. $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_4$ 554,85, znal. 554,4 (MS ESI).

9.4.7 Synteza dikapronianu betuliny (**BC6**)

W kolbie Erlenmeyera ze szlifem umieszczono 0,5 g (1,13 mmol) betuliny (**BET**), którą rozpuszczano w 3 ml bezwodnej pirydyny i 20 ml chlorku metylenu, i dodano 2 ml (15,19 mmol) chlorku kwasu kapronowego. Powstałą mieszaninę zatkało korkiem szklanym i pozostawiono na 24 h. Już po chwili bezbarwny roztwór zmieniał zabarwienie na żółty, następnie pomarańczowy i dalej czerwony. Po 5 dobach nastąpiło praktycznie całkowite przereagowanie co stwierdzono za pomocą TLC. Do kolby z roztworem dodano około 20 ml chlorku metylenu, 10 ml MeOH i 0,1 g węgla aktywnego. Po intensywnym zamieszaniu, zawartość kolby przesączono przez zwitek waty z żelą krzemionkowym. Bezbarwny roztwór odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem (obrotowa wyparka próżniowa) na wrzącej łaźni wodnej⁹. Pozostałość rozpuszczono w cykloheksanie i naniesiono na kolumnę (12 cm \times 3 cm) wypełnioną 20 tlenku glinu (typ 504 C, Fluka) i 3 Florsilu (Fluka). Kolumnę przemyto cykloheksanem (50 ml) i eluowano związek mieszaniną heksan—octan etylu 20 : 1. Po połączeniu odpowiednich frakcji (na podstawie TLC) i odparowaniu rozpuszczalnika uzyskano czysty związek w postaci bezbarwnej gęstej mazi.

Wydajność 97% (po oczyszczeniu ok. 80%).

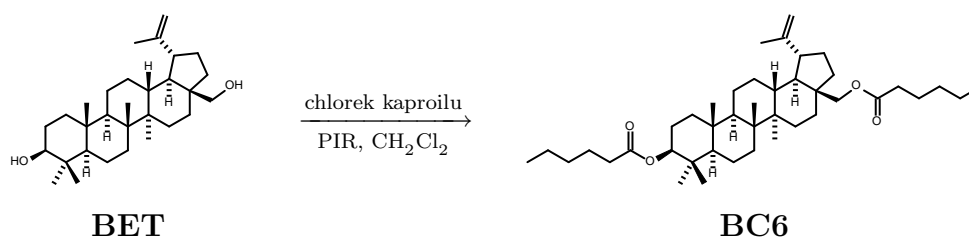
Związek zidentyfikowano jako: 3 β ,28-dikaproilo-lup-20(29)-en.

$R_f^{BC2} = 1,76$ (heksan—EtOAc 20 : 1).

NMR ^1H (δ , ppm): 4,46 (dd, 1H, $J_{AX} = 10,22$; $J_{AM} = 5,64$; H-3); 2,44 (td, 1H, $J_{AX} = 10,76$; $J_{AM} = 5,83$; H-19); 3,82 i 4,25 (każdy d, 1H, $J_{AX} = J_{XA} = 11,28$; H-28); 4,58 i 4,68 (każdy m, 1H; H-29); 1,68 (s, 3H, H-30);

⁹Dzięki temu zabiegowi można częściowo oddzielić estry metylowe kwasu heksanowego.

9.4. Synteza pochodnych betuliny



Schemat 57: Synteza dikapronianu betuliny (**BC6**)

NMR ¹³C (δ, ppm): 174,39; 173,74; 150,18; 109,86; 80,54; 62,49; 55,34; 50,23; 48,74; 47,71; 46,37; 42,66; 40,85; 38,32; 37,81; 37,52; 37,04; 34,81; 34,57; 34,48; 34,08; 31,35; 31,33; 29,76; 29,54; 27,94; 27,00; 25,11; 24,84; 24,75; 23,71; 22,33; 20,77; 19,10; 18,14; 16,56; 16,15; 16,01; 14,72; 13,94 (widma NMR rys. 11 na str. 196).

M.cz. obl. dla C₄₂H₇₀O₄ 639,02; znal. 638,6 (MS ESI).

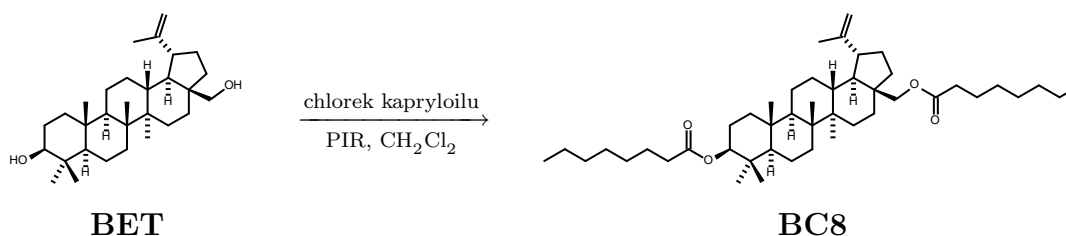
9.4.8 Synteza dikaprylanu betuliny (**BC8**)

Syntezę przeprowadzono analogicznie jak 9.4.7, stosując 0,75 g (1,69 mmol) betuliny (**BET**) i 2 ml (12,95 mmol) chlorku kapryloilu. Otrzymano bezbarwną gęstą maź.

Wydażność 97% (po oczyszczeniu ok. 80%).

Związek zidentyfikowano jako: 3β,28-dikapryloilo-lup-20(29)-en.

$R_f^{BC2} = 1,9$ (heksan—EtOAc 20 : 1).



Schemat 58: Synteza dikaprylanu betuliny (**BC8**)

NMR ¹H (δ, ppm): 4,47 (dd, 1H, $J_{AX} = 10,21$; $J_{AM} = 5,93$; H-3); 2,44 (td, 1H, $J_{AX} = 10,98$; $J_{AM} = 5,72$; H-19); H-28 3,83 i 4,26 (każdy d, 1H, $J_{XA} = J_{AX} = 11,20$; H-28); 4,58 i 4,68 (każdy m, 1H; H-29); 1,68 (s, 3H, H-30);

NMR ¹³C (δ, ppm): 174,37; 173,72; 150,18; 109,85; 80,55; 62,50; 55,36; 50,25; 48,76; 47,72; 46,38; 42,68; 40,87; 38,35; 37,82; 37,54; 37,04; 34,84; 34,58; 34,52; 34,09; 31,67; 29,77; 29,57; 29,13; 28,92; 27,94; 27,03; 25,16; 25,08; 23,71; 22,59; 20,78; 19,11; 18,15; 16,55; 16,14; 16,01; 14,72; 14,07 (widma NMR rys. 16 na str. 197).

IR ν_{max} KBr (cm⁻¹): 2929; 2857; 1733; 1457; 1385; 1248; 1226; 1171; 1105; 1008; 978; 883.

M.cz. obl. dla C₄₆H₇₈O₄ 695,12; znal. 694,3 (MS ESI).

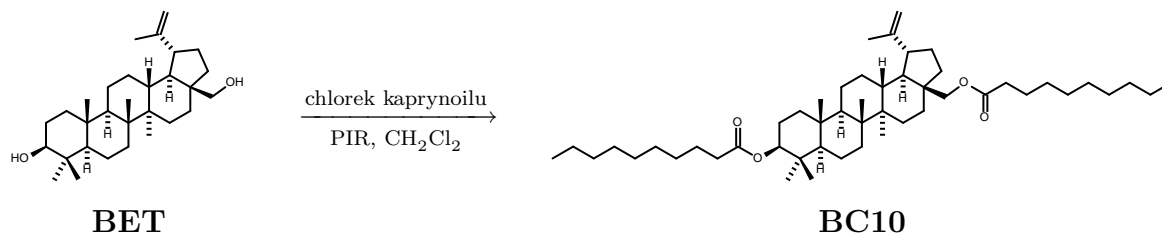
9.4.9 Synteza dikaprynianu betuliny (**BC10**)

Syntezę przeprowadzono analogicznie jak 9.4.7, stosując 0,68 g (1,53 mmol) betuliny (**BET**) i 2 ml (11,24 mmol) chlorku kaprynoilu. Otrzymano bezbarwną gęstą maź.

Wydajność 98% (po oczyszczeniu ok. 70%).

Związek zidentyfikowano jako: 3 β ,28-dikaprynoilo-lup-20(29)-en.

$R_f^{BC2} = 2,05$ (heksan—EtOAc 20 : 1).



Schemat 59: Synteza dikaprynianu betuliny (**BC10**)

NMR ^1H (δ , ppm): 4,47 (dd, 1H, $J_{AX} = 9,76$; $J_{AM} = 5,72$; H-3); 2,44 (td, 1H, $J_{AX} = 11,06$; $J_{AM} = 5,80$; H-19); 3,83 i 4,26 (każdy d, 1H, $J_{AX} = J_{XA} = 10,89$; H-28); 4,58 i 4,68 (każdy m, 1H; H-29);

NMR ^{13}C : 174,37; 173,72; 150,18; 109,84; 80,55; 62,50; 55,36; 50,25; 48,76; 47,72; 46,38; 42,68; 40,87; 38,35; 37,82; 37,54; 37,04; 34,85; 34,59; 34,53; 34,09; 31,86; 31,85; 29,78; 29,57; 29,45; 29,42; 29,26; 29,25; 29,19; 29,17; 27,95; 27,03; 25,17; 25,08; 23,71; 22,66; 20,78; 19,11; 18,15; 16,55; 16,13; 16,01; 14,73; 14,11 (widma NMR rys. 11 na str. 198).

IR ν_{max} KBr (cm^{-1}): 3462; 2927; 2855; 1732; 1639; 1456; 1386; 1245; 1175; 1106; 1008; 979; 883.

M.cz. obl. dla $\text{C}_{50}\text{H}_{86}\text{O}_4$ 751,23; znal. 750,5 (MS ESI).

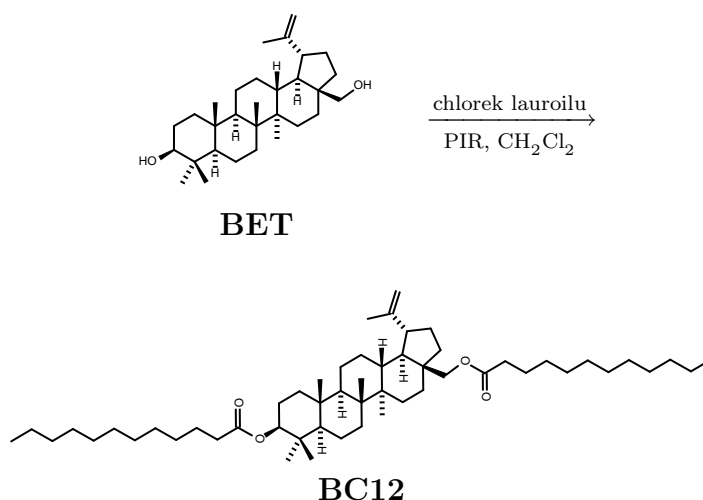
9.4.10 Synteza dilaurynianu betuliny (**BC12**)

Syntezę przeprowadzono analogicznie jak 9.4.7, stosując 0,60 g (1,35 mmol) betuliny (**BET**) i 2 ml (9,91 mmol) chlorku lauroilu. Otrzymano bezbarwną gęstą maź.

Wydajność 95% (po oczyszczeniu ok. 75%).

Związek zidentyfikowano jako: 3 β ,28-dilauroilo-lup-20(29)-en.

$R_f^{BC2} = 2,2$ (heksan—EtOAc 20 : 1).



Schemat 60: Synteza dilaurynianu betuliny (**BC12**)

9.4. Synteza pochodnych betuliny

NMR ^1H (δ , ppm): 4,46 (dd, 1H, $J_{AX} = 10,24$; $J_{AM} = 5,94$; H-3); 2,44 (td, 1H, 11,16; 5,91; H-19); 3,82 i 4,26 (każdy d, 1H, $J_{AX} = J_{XA} = 11,23$; H-28); 4,58 i 4,68 (każdy m, 1H; H-29); 1,67 (s, 3H; H-30);

NMR ^{13}C (δ , ppm): 174,34; 173,68; 150,13; 109,85; 80,53; 62,48; 55,36; 51,41; 50,25; 48,76; 47,72; 46,38; 42,67; 40,87; 38,35; 37,81; 37,54; 37,04; 34,84; 34,59; 34,51; 34,10; 31,91; 31,89; 29,78; 29,61; 29,58; 29,50; 29,45; 29,33; 29,32; 29,25; 29,18; 29,16; 29,14; 27,93; 27,03; 25,15; 25,08; 24,95; 23,71; 22,67; 20,78; 19,09; 18,15; 16,54; 16,12; 16,01; 14,72; 14,11 (widma NMR rys. 11 na str. 199).

IR ν_{max} KBr (cm^{-1}): 3415; 2927; 1730; 1641; 1617; 1464; 1375; 1248; 1175; 1108; 1009; 978; 884; 757.

M.cz. obl. dla $\text{C}_{54}\text{H}_{94}\text{O}_4$ 807,34.

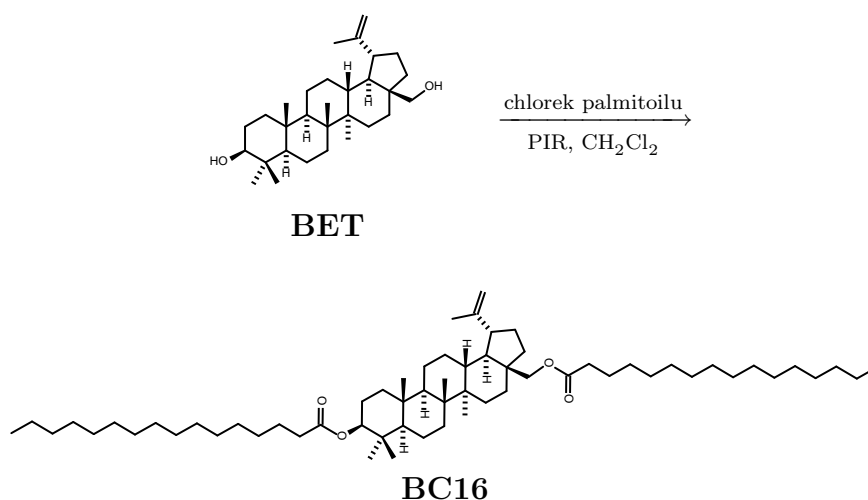
9.4.11 Synteza dipalmitynianu betuliny (BC16)

Syntezę przeprowadzono analogicznie jak 9.4.7, stosując 0,45 g (1,01 mmol) betuliny (**BET**) i 2,5 ml (10,02) chlorku palmitoilu. Amorficzne ciało stałe, t.t. ok.35 °C.

Wydażność 94% (po oczyszczeniu ok. 75%).

Związek zidentyfikowano jako: 3 β ,28-dipalmitoilu-lup-20(29)-en.

$R_f^{BC2} = 2,54$ (heksan—EtOAc 20 : 1).



Schemat 61: Synteza dipalmitynianu betuliny (**BC16**)

NMR ^1H (δ , ppm): 4,46 (dd, 1H, $J_{AX} = 10,21$; $J_{AM} = 5,93$; H-3); 2,43 (td, 1H, $J_{AX} = 10,76$; $J_{AM} = 5,81$; H-19); 3,82 i 4,25 (każdy d, 1H, $J_{AX} = J_{XA} = 11,20$; H-28); 4,58 i 4,68 (każdy m, 1H; H-29); 1,67 (s, 3H; H-30);

NMR ^{13}C (δ , ppm): 174,29; 174,28; 173,64; 150,08; 109,86; 80,50; 62,45; 55,35; 51,38; 50,25; 48,75; 47,70; 46,37; 42,66; 40,86; 38,34; 37,80; 37,53; 37,03; 34,81; 34,58; 34,50; 34,08; 31,92; 29,68; 29,66; 29,58; 29,50; 29,44; 29,36; 29,25; 29,17; 29,14; 27,93; 27,03; 25,15; 25,07; 24,94; 23,71; 22,68; 20,78; 19,08; 18,14; 16,54; 16,12; 16,00; 14,71; 14,11 (widma NMR rys. 11 na str. 200).

IR ν_{max} KBr (cm^{-1}): 3461; 2916; 1734; 1641; 1467; 1384; 1173; 979; 880; 721.

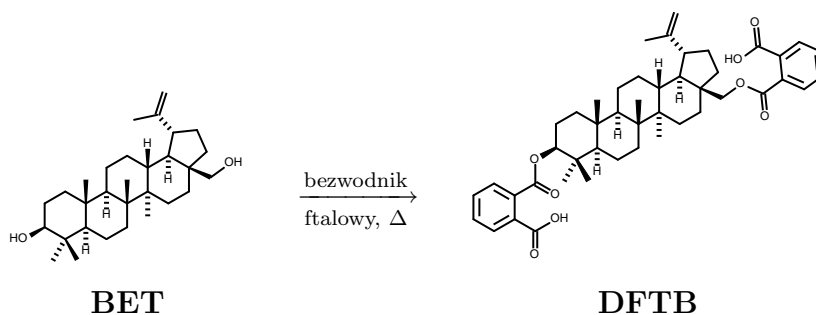
M.cz. obl. dla $\text{C}_{62}\text{H}_{110}\text{O}_4$ 919,55.

9.4.12 Synteza bis(hemifitalanu) betuliny (DFTB)

0,9 g (2,03 mmol) betuliny (**BET**) ogrzewano w kolbce z 7,5 g (50,63 mmol) bezwodnika ftalowego w temp. 140–150 °C przez 3 h. Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą TLC. Zawartość kolbki zalano mieszaniną etanol—woda 1 : 1, ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 1 h i pozostawiono na noc. Po dwukrotnej krystalizacji z etanolu związek oczyszczano chromatograficznie, na kolumnie (11,5 × 2,8 cm) wypełnionej 20 g żelu krzemionkowego (0,063–0,200 mm, typ 60, Merck). Jako układ eluujący stosowano chlorek metylenu—octan etylu 1 : 0 – 10 : 1 – 4 : 1. Najczystsze frakcje połączono i po odparowaniu przekrystalizowano z mieszaniny chlorek metylenu metanol 1 : 5, a następnie z acetonu uzyskując kryształy o t.t 180–182 °C (lit. 178–180 °C [111]).

Wydajność 94% (po oczyszczeniu ok. 30%).

Związek zidentyfikowano jako: 3β,28-bis(*o*-hemifitaloilo)-lup-20(29)-en.



Schemat 62: Synteza bis(hemifitalanu) betuliny (**DFTB**)

NMR ¹H (δ, ppm): 7,85–7,89 (m, 2H); 7,69–7,84 (m, 2H); 7,52–7,63 (m, 4H); 4,74 (m; H-3 — nakłada się z H-29); 2,48 (td, 1H, $J_{AX} = 11,41$; $J_{AM} = 5,71$; H-19); 4,09 i 4,53 (każdy d, 1H, $J_{AX} = J_{XA} = 10,94$; H-28); 4,60 i 4,70 (każdy m, 1H; H-29); 1,68 (s, 3H, H-30);

NMR ¹³C (δ, ppm): 173,07; 172,90; 168,27; 167,50; 150,05; 133,46; 133,06; 132,02; 131,90; 130,92; 130,81; 130,39; 129,71; 129,66; 129,05; 128,92; 109,95; 82,96; 64,58; 55,48; 50,25; 48,90; 47,80; 46,52; 42,72; 40,86; 38,42; 38,02; 37,67; 37,07; 34,43; 33,95; 29,58; 28,01; 27,01; 25,13; 23,15; 20,86; 19,10; 18,09; 16,66; 16,16; 16,02; 14,89 (widma NMR rys. 11 na str. 206).

IR ν_{max} KBr (cm⁻¹): 3457; 3077; 2946; 2870; 2650; 2535; 1721; 1644; 1455; 1391; 1375; 1290; 1126; 1074; 964; 788; 747.

M.cz. obl. C₄₆H₅₈O₈ 738,96; znal. 737,7 (MS ESI).

9.4.13 Synteza bis(hemiglutaranu) betuliny (DGB)

0,9 g (2,03 mmol) betuliny (**BET**) ogrzewano w temp. ok. 100 °C z 9 g (78,88 mmol) bezwodnika kwasu glutarowego, przez 1 h mieszając co pewien czas. Już po kilku minutach bezwodnik uległ stopieniu, natomiast betulina była widoczna w postaci białej zawiesiny. Mieszanina przybrała wkrótce lekko żółte zabarwienie z nadal widocznym osadem, którą ogrzewano w 100 °C jeszcze przez 2 h. Następnie zwiększono temperaturę do 120 °C i po upływie 1 h roztwór stał się homogeniczny, a po dalszych 2 h cała betulina przereagowała co potwierdzono za pomocą TLC (CHCl₃—EtOAc—MeOH 10 : 10 : 1 z dodatkiem 1 kropli kwasu octowego). Zawartość kolby rozpuszczono w acetonie i wiano do 90 ml wody

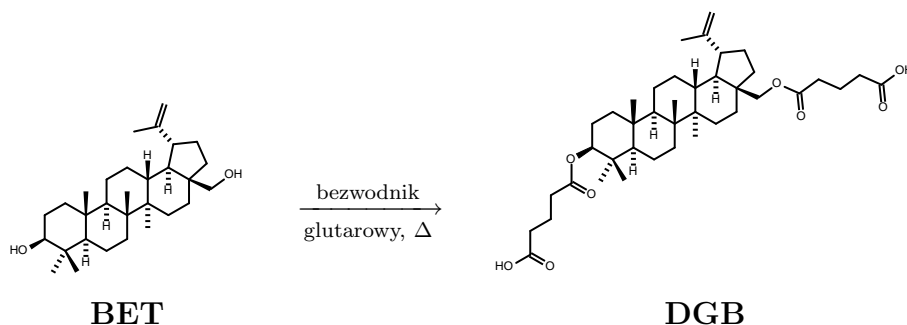
9.4. Synteza pochodnych betuliny

w kolbie 250 ml i ogrzewano mieszaninę w temp. 95 °C przez 2 h. Następnie po rozcieńczeniu wodą, i po ostudzeniu ekstrahowano octanem etylu. Po osuszeniu frakcji organicznej za pomocą bezw. siarczanu sodu odparowano rozpuszczalnik. Związek poddano rozdzielni chromatograficznej na kolumnie zawierającej ok 20g żelu krzemionkowego (Merck, typ 60; 70–230 mesh), wymywając związek mieszaniną chlorek metylenu–octan etylu 10 : 1 – 4 : 1. Po wyselekcjonowaniu odpowiednich frakcji, ponownie je oczyszczano na kolumnie, uzyskując czystą substancję o charakterze bezbarwnego szkliwa.

Wydażność 94% (po oczyszczeniu ok. 35%).

Związek zidentyfikowano jako: 3 β ,28-bis(*o*-hemiglutaroiło)-lup-20(29)-en.

T.t. 97–101 °C.



Schemat 63: Synteza bis(hemiglutaranu) betuliny (**DGB**)

NMR ^1H (δ , ppm): 4,48 (dd, 1H, $J_{AX} = 9,88$; $J_{AM} = 6,59$; H-3); 3,85 i 4,28 (każdy d, 1H, $J_{AX} = J_{XA} = 11,11$; H-28); 4,58 i 4,68 (każdy m, 1H; H-29); 2,36–2,48 (m, 9H); 1,88–2,04 (m, 5H); 1,67 (s, 3H; H-30);

NMR ^{13}C (δ , ppm): 178,76; 173,31; 172,68; 150,08; 109,91; 81,10; 62,84; 55,33; 50,24; 48,74; 47,70; 46,36; 42,68; 40,87; 38,32; 37,81; 37,55; 37,04; 34,54; 34,08; 33,64; 33,28; 33,02; 32,98; 29,74; 29,53; 27,99; 27,01; 25,11; 23,70; 20,78; 19,99; 19,86; 19,10; 18,14; 16,56; 16,14; 16,01; 14,72 (widma NMR rys. 11 na str. 207).

IR ν_{max} KBr (cm^{-1}): 3250; 3071; 2945; 2872; 2670; 1720; 1642; 1455; 1416; 1390; 1222; 1148; 1105; 1057; 1010; 977; 885; 755; 667.

M.cz. obl. $\text{C}_{40}\text{H}_{62}\text{O}_8$ 670,93; znal. 670,4 (MS ESI).

9.4.14 Synteza dibenzoesanu betuliny (**DBB**)

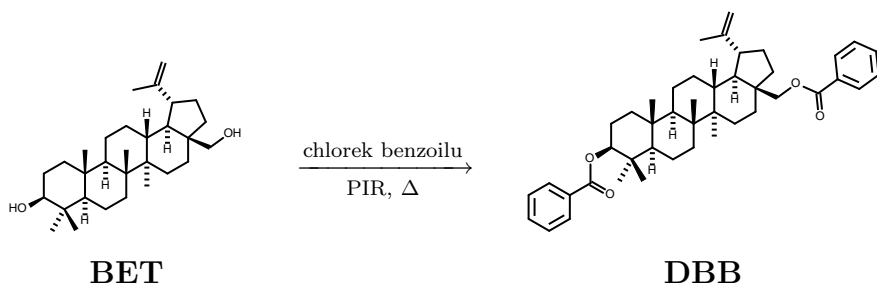
0,9 g (2,04 mmol) betuliny (**BET**) rozpuszczono w mieszaninie 75 ml chlorku metylenu i 2 ml świeżo osuszonej pirydyny. Następnie wkroplono 2 ml (11,7 mmol) świeżo destylowanego chlorku benzoilu i dodano kilka kryształków bromku 1-butylo-3-metyloimidazoliowego jako katalizatora. Kolbę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 1 h. Ponieważ reakcja nie przebiegła do końca, zateżono roztwór do objętości ok. 50 ml, następnie dodano 2 ml pirydyny, 1 ml chlorku benzoilu i ogrzewano jeszcze przez 2 h. W celu przerwania reakcji do mieszaniny wiano 25 ml MeOH i kontynuowano ogrzewanie przez kolejne 30 min. Zawartość kolby odparowano na wyparce obrotowej. Wypadły kryształy i oleista ciecz, którą z trudem częściowo oddestylowano, dodając kilkakrotnie metanol. Mazisty osad rozpuszczono na ciepło w ok. 10 ml chlorku metylenu, po czym do roztworu dodano 100 ml MeOH i ogrzewano do wrzenia przez ok. 30 min. Po ostygnięciu mieszaniny wypadł osad (1,14 g), który odsączono i krystalizowano z 2-propanolu, a następnie acetonu.

Wydajność 90% (po oczyszczeniu ok. 60%).

Związek zidentyfikowano jako: 3 β ,28-dibenzoilo-lup-20(29)-en.

T.t. 170–173 °C.

$R_f^{BC2} = 1,34$ (heksan—EtOAc 20 : 1).



Schemat 64: Synteza dibenzoesu betuliny (DBB)

NMR ^1H (δ , ppm): 8,01–8,07 (m, 4H), 7,47–7,59 (m, 2H), 7,40–7,45 (m, 4H), 2,54 (1H, td, $J_{AX} = 10,94$; $J_{AM} = 5,53$; H-19); 4,10 i 4,54 (2H, d, $J_{AX} = 11,26$; H-28);

NMR ^{13}C (δ , ppm): 166,94; 166,28; 150,11; 132,88; 132,70; 130,98; 130,48; 129,55; 129,52; 128,37; 128,31; 109,95; 81,56; 63,26; 55,45; 50,30; 48,86; 47,81; 46,72; 42,78; 40,94; 38,40; 38,20; 37,67; 37,12; 34,73; 34,13; 29,95; 29,64; 28,11; 27,14; 25,19; 23,75; 20,84; 19,16; 18,20; 16,79; 16,18; 16,09; 14,81 (widma NMR rys. 11 na str. 205);

IR ν_{max} KBr (cm^{-1}): 3465; 3069; 2945; 2871; 1718; 1639; 1388; 1315; 1271; 1175; 1111; 1069; 1025; 970; 883; 710.

M.cz. obl. $\text{C}_{44}\text{H}_{58}\text{O}_4$ 650,94, znal. 650,4 (MS ESI).

9.4.15 Synteza dioctanu dihydrobetuliny (DODHB)

1,2 g (2,27 mmol) dioctanu betuliny (**BC2**) rozpuszczono w 100 ml cykloheksanu, dodano 55 mg katalizatora palladowego (10% Pd/C) i przepuszczano przez roztwór wodoru z wytwornicy (przepływ 10 ml H_2/min) przez 10 h intensywnie mieszając i ogrzewając do ok. 60 °C na mieszadle magnetycznym. Roztwór następnie przesączono przez zwitek waty umieszczony w nóżce lejka z niewielką ilością żelu krzemionkowego (ok. 0,5 g). Po odparowaniu rozpuszczalnika uzyskano płatkowate kryształy o t.t. 262–263 °C (lit. 259 °C [114])¹⁰.

Wydajność 99% (po oczyszczeniu ok. 70%).

Związek zidentyfikowano : 3 β ,28-diacetoksy-lupan.

Uwodorniona pochodna różniła się współczynnikiem R_f od wyjściowego związku w bardzo małym stopniu, a kolor plam na chromatogramie był praktycznie taki sam¹¹ $R_f^{BC2} = 1,09$ (heksan—EtOAc 20 : 1).

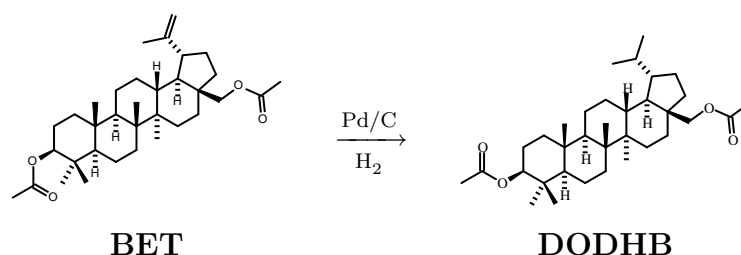
NMR ^1H (δ , ppm): 4,44 (dd, 1H, H-3); 3,78 i 4,21 (każdy d, 1H, $J_{AX} = 10,64$);

NMR ^{13}C (δ , ppm): 171,44; 170,82; 80,81; 62,74; 55,29; 49,92; 48,08; 46,41; 44,47; 42,81; 40,89; 38,35; 37,74; 37,09; 36,98; 34,61; 34,18; 29,82; 29,39; 27,90; 26,89; 26,76; 23,64; 22,86;

¹⁰W zakresie ok. 230–261 °C zachodzi intensywna sublimacja kryształów

¹¹Dlatego w trakcie redukcji konieczne było pobranie próbki wkrótce po jej rozpoczęciu, gdy uwidaczniał się jeszcze niezredukowany substrat — w przeciwnym wypadku nie wiadomo było, czy reakcja zaszła całkowicie, czy w ogóle nie — np. w obecności zatrutego katalizatora.

9.4. Synteza pochodnych betuliny



Schemat 65: Synteza dioctanu dihydrobetuliny (**DODHB**)

21,56; 21,23; 20,96; 20,77; 18,14; 16,47; 16,06; 15,99; 14,85; 14,57 (widma NMR rys. 11 na str. 193).

IR ν_{max} KBr (cm^{-1}): 3443; 2948; 1739; 1457; 1367; 1030.

M.cz. obl. dla $\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{O}_4$ 528,82 znal. 468,4 ($\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}$).

9.4.16 Synteza dihydrobetuliny (**DHB**)

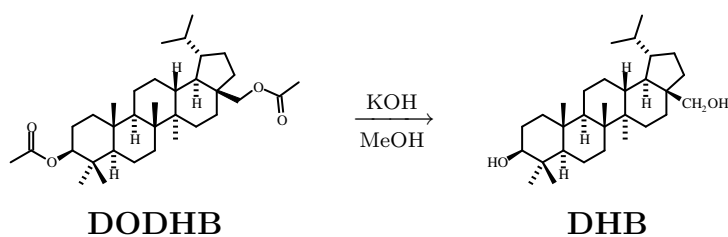
1 g (1,89 mmol) dioctanu dihydrobetuliny (**DODHB**) ogrzewano do wrzenia w 200 ml MeOH z dodatkiem 3,5 g (62,37 mmol) KOH pod chłodnicą zwrotną przez 2 h. Po schłodzeniu roztworu do 0°C , wypadł biały krystaliczny osad, który odsączono na lejku Büchnera i przemyto wodą. Ze względu na bardzo słabą zwilżalność związku, osad zawieszono w 20% MeOH, ponownie odsączono i wysuszono.

Wydażność 99% (po oczyszczeniu ok. 90%).

T.t. $279,5\text{--}280,5^\circ\text{C}$ (lit. $277\text{--}280^\circ\text{C}$ [114]).

Związek zidentyfikowano jako lupan- $3\beta,28$ -diol.

$R_f^{BET} = 1,08$ ($\text{CHCl}_3\text{—EtOAc}$ 10 : 1).



Schemat 66: Synteza dihydrobetuliny (**DHB**)

NMR ^1H (δ , ppm): 3,48 (m, 1H, H-3); 3,61 i 4,08 (każdy d, 1H, $J_{AX} = J_{XA} = 10,65$; H-28);

NMR ^{13}C (δ , ppm): 78,97; 60,63; 55,31; 50,13; 48,13; 47,91; 44,63; 42,90; 41,00; 38,86; 38,73; 37,15; 36,89; 34,36; 34,02; 29,47; 29,36; 27,97; 27,41; 26,96; 26,89; 22,87; 21,73; 20,85; 18,31; 16,00; 15,32; 14,83; 14,64, (widma NMR rys. 11 na str. 189).

IR ν_{max} KBr (cm^{-1}): 3399; 2950; 2866; 1460; 1385; 1030.

M.cz. obl. dla $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_2$ 444,74; znal. 444,4 (MS ESI).

9.4.17 Synteza 30-bromo-dioctanu betuliny (**BRDOB**)

520 mg (1 mmol) dioctanu betuliny (**BC2**) rozpuszczono w 30 ml 1,4-dioksanu, i w czasie 30 min wkroplono 190 mg (1,07 mmol) bromoimidu kwasu bursztynowego (NBS) w 10 ml

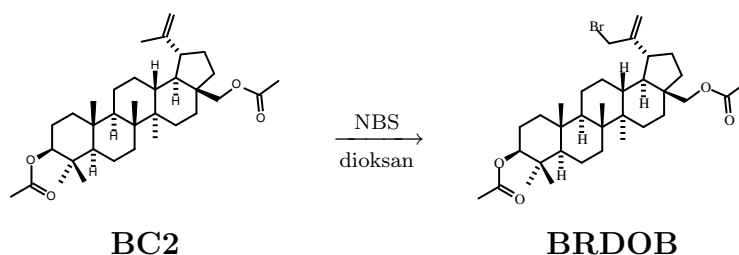
1,4-dioksanu. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej¹². Mieszaninę pozostawiono na mieszadle na 10 h, po czym w celu rozłożenia nieprzereagowanego NBS-u do mieszaniny dodano 480 mg siarczynu sodowego (3,8 mmol) w 20 ml wody, intensywnie zamieszano i pozostawiono na noc. Po rozcieńczeniu wodą wypadł osad, który po odsączeniu na szklanej kulce¹³, przekrystalizowano z 20 ml 2-propanolu uzyskując 310 mg związku.

Wydajność 75% (po oczyszczeniu ok. 52%).

Związek zidentyfikowano jako: 30-bromo-3 β ,28-diacetoksy-lup-20(29)-en.

T.t. 198–201 °C (lit. 183–185 °C [8], 188–190 °C [154]).

$R_f^{BC2} = 0,76$ (heksan—EtOAc 20 : 1)



Schemat 67: Synteza 30-bromo-dioctanu betuliny (**BRDOB**)

NMR ¹H (δ , ppm): 4,46 (dd, 1H, $J_{AX} = 9,81$; $J_{AM} = 5,75$; H-3); 2,43 (td, 1H, $J_{AX} = 11,10$; $J_{AM} = 5,12$; H-19); 3,83 i 4,25 (każdy d, 1H, $J_{AX} = J_{XA} = 11,21$; H-28); 5,02 i 5,12 (każdy s, 1H; H-29); 3,97 (dwa wzajemnie sprzężone d $J_{AX} = 10,47$, CH₂Br); 2,06 (s, CH₃ — acetyl); 2,02 (s, CH₃ — acetyl);

NMR ¹³C (δ , ppm): 171,58; 171,02; 150,79; 113,29; 80,86; 62,57; 55,33; 50,25; 50,21; 46,35; 43,20; 42,65; 40,90; 38,36; 37,77; 37,43; 37,03; 34,28; 34,13; 32,49; 29,78; 27,93; 26,99; 23,66; 21,33; 21,05; 20,91; 18,14; 16,48; 16,15; 16,05; 14,70; (widma NMR rys. 11 na str. 201).

M.cz. obl. C₃₄H₅₃O₄Br 605,70; znal. 604,3 i 606,3 (charakterystyczny pik M+2 dla związków zawierających brom).

Uwodornienie związku **BRDOB**, przeprowadzone analogicznie do syntezy dioctanu dihydrobetuliny (str. 98), dało produkt, którego widma **NMR** są identyczne z **DODHB**¹⁴.

9.4.18 Synteza 30-metoksybetuliny (30MBET)

1060 mg (2 mmol) dioctanu betuliny (**BC2**) rozpuszczono w 60 ml 1,4-dioksanu i w czasie 15 min wkroplono 390 mg (2,05 mmol) NBS w 10 ml dioksanu intensywnie mieszając na mieszadle magnetycznym. Po stwierdzeniu całkowitego przereagowania (po 2 h) za pomocą TLC¹⁵ dodano roztwór nasyconego Na₂SO₃ w wodzie (100 ml) i po 30 min mieszania rozcieńczono jeszcze wodą (100 ml). Odsączono osad, który po wysuszeniu rozpuszczono w 60 ml MeOH, dodano 300 mg KOH i ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 3 h. Po rozcieńczeniu wodą (300 ml) wypadł biały krystaliczny osad. Po wysuszeniu związek rozpuszczono w chloroformie i poddano rozdzielni na kolumnie zawierającej 20 g

¹²Reakcja przebiega podobnie w metanolu w t.w., i już po 20 min następuje całkowite przereagowanie, lecz powstaje więcej produktów ubocznych.

¹³Odpowiednik gwoździa Willstattera.

¹⁴Fakt ten świadczy o dużej labilności atomu bromu przyłączonego w pozycji allilowej.

¹⁵Na płytce widoczny jeden główny produkt.

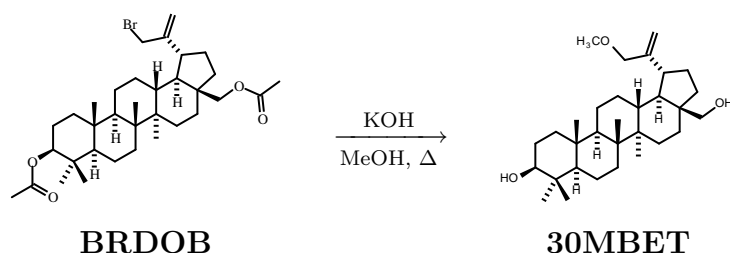
9.5. Linie komórkowe i ich hodowla

żelu krzemionkowego (70–230 mesh, typ 60, Merck). Kolumnę przemywano mieszaniną CHCl_3 –EtOAc 10 : 1. Po połączeniu jednorodnych chromatograficznie frakcji i odparowaniu rozpuszczalnika uzyskano biały krystaliczny osad o t.t. 207–213 °C.

Wydażność 90% (po oczyszczeniu ok. 40%).

Związek zidentyfikowano jako: 30-metoksy-lup-20(29)-en-3 β ,28-diol.

$R_f^{BET} = 0,50$ (CHCl_3 –ETOAc 8 : 1).



Schemat 68: Synteza 30-metoksybetuliny (**30MBET**)

NMR ^1H (δ , ppm): 3,18 (dd, 1H, $J_{AX} = 10,68$; $J_{AM} = 5,34$; H-3); 2,28 (td, 1H, $J_{AX} = 10,70$; $J_{AM} = 5,31$; H-19); 3,31 i 3,78 (każdy d, 1H, $J_{AX} = J_{XA} = 11,12$; H-28); 4,91 (m, 2H; H-29); 3,86 (s, 3H, OCH_3); 0,74 (s, 3H, CH_3); 0,82 (s, 3H, CH_3); 0,95 (s, 3H, CH_3); 0,98 (s, 3H, CH_3); 1,01 (s, 3H, CH_3).

NMR ^{13}C (δ , ppm): 151,01; 109,07; 78,94; 74,90; 60,28; 58,30; 55,27; 50,36; 49,40; 47,75; 43,67; 42,67; 40,94; 38,84; 38,68; 37,19; 37,14; 34,26; 33,79; 31,48; 29,21; 27,97; 27,37; 27,03; 26,69; 20,92; 18,29; 16,09; 15,98; 15,34; 14,72 (widma NMR rys. 2 na str. 204, dokładne przypisanie sygnałów w tabeli 2, str.211).

IR ν_{max} KBr (cm^{-1}): 3364; 2938; 2868; 1745; 1644; 1463; 1388; 1375; 1359; 1186; 1102; 1031; 933; 898.

M.cz. obl. $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_3$ 472,75; znal. 472,4 (na widmie masowym dominują sygnały: M– CH_3O 441,3, M'– CH_3OH 409,3).

9.5 Linie komórkowe i ich hodowla

Oznaczenia cytotoksyczności w testach redukcji błękitu tetrazolowego (MTT) i uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH) przeprowadzono na liniach komórek gruczolakoraka płuc NCI-H292 (ang.: human pulmonary mucoepidermoid carcinoma) i komórek nabłonka upigmentowanego oka ARPE-19 (ang.: retinal pigment binding epithelial cells).

NCI-H292 są linią ciągłą nabłonkowych komórek śluzowonaskórkowych (ang.: mucoepidermoid) wywodzącą się z ludzkiego płaskonabłonkowego raka płuc [71].

ARPE-19 jest samoistnie powstałą linią prawidłowych komórek nabłonkowych wywodzącą się z normalnych ludzkich komórek barwnikowych siatkówki [31].

Komórki były hodowane w jednej warstwie w medium RPMI 1640 z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej i antybiotyków (penicyliny i streptomycyny).

Gdy hodowle tworzyły spójną, jedną warstwę (były konfluentne), odessano medium, komórki przepłukano za pomocą PBS (10 ml), poddano 5 min trypsynizacji (1 ml roztwór u 0,25% trypsyny na butelkę o powierzchni 75 cm^2) i przeniesiono na płytki 24-dółkowe w medium zawierającym 0,5% surowicy bydlęcej. Gęstość komórek w obu hodowlach wynosiła 20×10^3 na dółek o powierzchni 1,8 cm^2 .

Komórki inkubowano w temp. 37 °C w atmosferze zawierającej 95% powietrza i 5% CO₂. Po upływie 24 h, płytki wyjmowano z ciepłarki, odsysano medium hodowlane, przemywano roztworem PBS (ok. 0,5 ml na dołek), ponownie odsysano i wlewano po 1 ml medium ze związkami o określonym stężeniu.

Dla każdego badanego stężenia sporządzono próby kontrolne.

Roztwory wyjściowe sporządzono przez rozpuszczenie badanych związków w DMSO (lub 2-butoksyetanolu w doświadczeniu wstępnym).

Po dodaniu do dołków roztworów badanych związków i delikatnym zamieszaniu ruchem przypominającym ósemkę — aby komórki nie uległy odwirowaniu lub skupieniu w centrum dołka — płytki inkubowano w warunkach wyżej podanych.

Oznaczenia cytotoksyczności pochodnych betuliny, wyrażonej przeżywalnością komórek ocenianą w teście błękitu trypanu (TB), przeprowadzono na komórkach mysich: czerniaka B16 (ang.: melanoma), mięsaka XC (ang.: sarcoma) i prawidłowych fibroblastów 3T3. Komórki B16 i XC hodowano w naczyniach plastikowych na pożywce MEM (Minimum Eagle's Medium 1959) z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej, oraz mieszaniny antybiotyków. Fibroblasty hodowano na pożywce DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) z wysoką zawartością glukozy (4500 mg/ml), z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej oraz mieszaniny antybiotyków: penicyliny, streptomycyny i neomycyny.

Przed doświadczeniem komórki poddawano trypsynizacji i odwirowaniu. Uzyskaną zawiesinę komórek w płynie hodowlanym (MEM lub DMEM) przenoszono na 24-dołkowe płytki o gęstości komórek $1,5 \times 10^4$ na dołek. Po 24 h inkubacji w inkubatorze w atmosferze zawierającej 95% powietrza i 5% CO₂ w temp. 37 °C, płyn odsysano i dodawano poszczególne badane związki w zakresie stężeń 0–15(20) μg/ml.

Roztwory wyjściowe zostały sporządzone przez rozpuszczenie badanych związków w 2-butoksyetanolu w stężeniu 10 ± 1 mg/ml. Przed dodaniem do dołków z komórkami, roztwór wyjściowy rozcieńczano dziesięciokrotnie za pomocą roztworu płynu hodowlanego. Jako kontrolę przyjęto zawiesinę komórek w MEM lub DMEM bez dodanego związku.

W trakcie przeprowadzania oznaczeń linie komórkowe były stabilne, zarówno w testach po 24 h, jak i po upływie 48 h.

9.6 Oznaczenia cytotoksyczności

9.6.1 Oznaczanie cytotoksyczności w teście MTT

Zasada oznaczenia opiera się na zdolności żywych komórek z nieuszkodzonymi błonami mitochondrialnymi, do redukcji nierozpuszczalnego w wodzie żółtego bromku 3-(4,5-dimetylo-1,3-tiazol-2-ylo)-2,5-difenylo-2H-tetrazolowego (MTT) do purpurowego nierozpuszczalnego w wodzie formazanu [65]

Po upływie określonego czasu inkubacji komórek (24 h lub 48 h w dośw. wstępnym) z badanymi związkami, medium hodowlane odessano i przeniesiono do małych zamykanych probówek, które przechowywano w lodówce w temp. +3 °C, do równoległe przeprowadzanego testu LDH.

Po odessaniu medium hodowlanego, do wszystkich dołków na płytce wiano po 0,5 ml roztworu MTT o stężeniu 1 mg/ml rozpuszczonego w medium (RPMI 1640) bez surowicy.

Po 75 min inkubacji ściągnięto medium i wiano po 0,2 ml mieszaniny DMSO—metanol 1 : 1 w celu dezintegracji komórek i rozpuszczenia zredukowanego MTT (formazanu), przeniesiono po 100 μ l tego roztworu na płytkę 96-dołkową i natychmiast mierzono absorbancję. Pomiaru absorbancji dokonywano na czytniku typu ELISA „GENios Plus” z oprogramowaniem „XFLUOR4 V 4,50”, przy długości fali $\lambda = 560$ nm. Próbę ślepą stanowiła mieszanina DMSO—metanol 1 : 1; od wszystkich wartości absorbancji odjęto uśrednioną wartość próby ślepej (Abs = 0,0493); wartości absorbancji prób mieściły się w przedziale od ok. 0,3 do ok. 1,2, a więc zakresie liniowości prawa Lamberta-Beera. Wyniki określono w %, jako względną cytotoksyczność wobec najmniejszego użytego w danej serii stężenia czystego rozpuszczalnika.

9.6.2 Oznaczanie cytotoksyczności w teście LDH

Test uwalniania LDH jest metodą kolorymetrycznego oznaczenia uwalniania enzymu przekształcającego pirogronian do mleczanu w obecności NADH. Dehydrogenaza mleczanowa jest uwalniana wskutek utraty integralności błony komórkowej, co może prowadzić do śmierci komórki. Test ten jest zatem miarą uszkodzenia błony komórkowej [1].

Medium pobrane po 24-ro lub 48-godzinnej (w dośw. wstępnym) inkubacji komórek z badanymi związkami przeniesiono w ilościach po 50 μ l na płytki 96-dołkowe. Do każdego dołka płytki dodano 50 μ l substratu (NADH + pirogronian + diaforaza) i inkubowano w temp. 20 °C przez 20–40 min. W celu przerwania reakcji do dołków dodano po 50 μ l 1 M kwasu octowego i natychmiast mierzono absorbancję w czytniku ELISA, przy $\lambda_{\max} = 492$ nm. Próbę ślepą stanowił roztwór substratu z medium; średnią wartość absorbancji próby ślepej odjęto od absorbancji wszystkich próbek (Abs = 0,0808); wartości absorbancji prób mieściły się w przedziale od ok. 0,3 do ok. 1,2, a więc zakresie liniowości prawa Lamberta-Beera. Nie oznaczano całkowitego uwalniania LDH. Wyniki określono jako względne uwalnianie LDH (na rysunkach oznaczone jako *LDH*) wobec najmniejszego użytego w danej serii stężenia czystego rozpuszczalnika.

9.6.3 Oznaczanie cytotoksyczności w teście TB

Błękit trypanu (TB) jest kwaśnym barwnikiem diazowym. Nie wnika on do komórek żywych, które posiadają integralną błonę komórkową, natomiast wnika do komórek mar-

twych, które wybarwia. W teście tym nie można odróżnić komórek apoptotycznych od nekrotycznych.

Po 24-h inkubacji w atmosferze zawierającej 95% powietrza i 5% CO₂ w temp. 37 °C, płyn hodowlany z badanym związkami usuwano a do dołków płytki dodawano 200 μl PBS z Ca i Mg, po czym 70 μl 0,5% roztworu błękitu trypanu (TB) i obserwowano natychmiast pod odwróconym mikroskopem (Hund-Wetzlar). Przeprowadzono również kontrolę działania samego 2-butoksyetanolu jako rozpuszczalnika w najwyższym stosowanym stężeniu.

Liczono komórki martwe — wybarwione na niebiesko — jak również żywe — nie wybarwione (łącznie 100 w polu widzenia). Cytotoksyczność związków wyrażono jako procent martwych komórek. Dla każdego ze związków wynik stanowi średnia z trzech równoległych oznaczeń.

9.7 Oznaczenia lipofilności

Lipofilność betuliny i jej pochodnych scharakteryzowano za pomocą współczynników R_{M0} metodą chromatografii cienkowarstwowej o odwróconej polarności (RP-TLC).

Oznaczenia przeprowadzono w 2 powtórzeniach na cienkowarstwowym płytce aluminiowej z odwróconą fazą: RP-18_{F254S} (Merck) o wymiarach 20 × 20 cm. Układem rozwijającym była mieszanina 1,4-dioksan–bufor octanowy Walpola (pH = 4,8), ze stężeniami 1,4-dioksanu w zakresie 60–90% (v/v) z gradacją co 5%. Bufor sporządzono przez zmieszanie 80 ml 0,2 M wodnego roztworu octanu sodowego z 420 ml 0,2 M kwasu octowego. pH buforu zmierzono pH-metrem elektronicznym HI 221 (HANNA Instruments).

Chloroformowe roztwory oznaczanych związków nanoszono na płytkę za pomocą strzykawki Hamiltona w ilości 10 μg (2 μl × 5 ± 0,5 mg/ml). Po całkowitym odparowaniu chloroformu chromatogramy rozwijano na drodze 12 cm w temp. 23 ± 1 °C.

Po wysuszeniu chromatogramy wywoływano przez spryskiwanie 20% roztworem kwasu siarkowego w metanolu i ogrzewanie w temp. 120 °C przez 5 min.

Wyznaczono środki barwnych plam i obliczono współczynniki R_f jako średnie z dwóch powtórzeń.

Współczynniki R_M obliczono według równania:

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_f} - 1\right) \quad (9.1)$$

Wartości R_M ekstrapolowano następnie do zerowego stężenia 1,4-dioksanu wg równania:

$$R_{M0} = R_M - bC \quad (9.2)$$

gdzie C jest stężeniem 1,4-dioksanu w fazie ruchomej (% v/v) a b jest zmianą wartości R_M spowodowaną wzrostem stężenia dioksanu o 1% w fazie ruchomej.

Rozdział 10

Wyniki i dyskusja

10.1 Izolacja betuliny i synteza jej pochodnych

10.1.1 Izolacja betuliny i identyfikacja głównego towarzyszącego jej w ekstrakcie z kory brzozy triterpenu

Betulinę wyizolowano z kory brzozowej zebranej z pnia 5–7 letniego drzewa, za pomocą ekstrakcji w aparacie Soxhleta. Suszenie materiału przez okres jednego miesiąca w temperaturze pokojowej pozwoliło na pozbycie się wody utrudniającej ekstrakcję rozpuszczalnikami apolarnymi. W tym czasie zaszło też prawdopodobnie częściowo utlenianie związków o charakterze fenolowym, co później zmniejszało ich ilość w ekstrakcie (ekstrakty ze świeżej kory miały znacznie intensywniejsze zabarwienie).

Lupeol stanowi bardzo trudne do oddzielenia zanieczyszczenie betuliny. Lipofilność tej cząsteczki jest wyższa niż betuliny ze względu na brak jednej grupy hydroksylowej (przy C-28). Spodziewano się zatem, że powinien on łatwiej rozpuszczać się w rozpuszczalnikach apolarnych, bądź trudniej w polarnych. W trakcie krystalizacji betuliny z metanolu, etanolu, acetonu lub 2-propanolu, lupeol ulegał ko-solwatacji z betuliną co powodowało, że bardzo trudno było go oddzielić, nawet pomimo wielokrotnie powtarzanej procedury. Dlatego korę wstępnie ekstrahowano heksanem (fr. z nafty), aby obok lupeolu usunąć najbardziej hydrofobowe składniki jak: woski, węglowodory i inne substancje o charakterze lipidowym. Dzięki tej wstępnej ekstrakcji udało się oddzielić większość lupeolu, jednak część tego związku ekstrahowana była nadal w dalszym toku izolacji betuliny do frakcji CH_2Cl_2 . Widoczne jest to na obrazie chromatograficznym (rys. 10.1) — większa względna intensywność plamy w ekstrakcie dichlorometanowym niż w heksanowym na wysokości betuliny i odpowiednio mniejsza na wysokości lupeolu.

Większa część betuliny ulegała ekstrakcji z kory dopiero przy użyciu chlorku metylenu. Optymalny czas procesu wynosił 2×10 h. Po upływie pierwszych 10 h materiał pozostawał w aparacie Soxhleta zanurzony w rozpuszczalniku na noc (ok. 12 h), dzięki czemu ulegał dogłębnej maceracji. Ponowna 10-cio godzinna ekstrakcja pozwalała na prawie całkowite wydzielenie betuliny z kory. Całkowita wydajność ekstrakcji za pomocą samego chlorku metylenu (2×10 h) wynosiła 16 g suchego ekstraktu ze 100 g suchej kory, tj. ok. 12,5 g za pierwszym i ok. 3,5 g za drugim razem. Podobny wynik uzyskuje się ekstrahując korę heksanem (5×10 h), a następnie chlorkiem metylenu (5×10 h); ok. 3 g ekstraktu we



Rys. 10.1: Chromatogram porównawczy ekstraktów kory brzozy brodawkowatej *Betula verrucosa* Ehrh. Na płytce widoczne kolejno od lewej: ekstrakt heksanowy z kory, ekstrakt chlorkowo-metylenowy z kory, betulina (**BET**), lupeol (**LUP**), allobetulina (**ALLO**). Układ rozwijający: CHCl_3 — EtOAc 8 : 1, wywołanie: H_2SO_4 (20% w MeOH), Δ (100 °C)

frakcji heksanowej i ok. 12 g w CH_2Cl_2 ¹.

Ekstrakcja kory bardziej polarnymi rozpuszczalnikami, jak np. metanol, powoduje, że rozpuszczaniu w dużej mierze ulegają również związki fenolowe i inne substancje polarne.

Zarówno w ekstrakcie heksanowym jak i dichlorometanowym, obecne były prawdopodobnie związki o charakterze fenolowym. Ekstrakty miały zabarwienie słomkowożółte, nasilające się po alkalizacji metanolowych roztworów². Najlepszym sposobem usunięcia tych zanieczyszczeń była kilkugodzinna hydroliza w 2% metanolowym roztworze KOH , a następnie krystalizacja z 2-propanolu lub mieszaniny toluen—metanol 4 : 1.

Innym skutecznym sposobem uzyskania czystej betuliny było wyczerpujące acetylowanie ekstraktu z kory, a następnie rozdział chromatograficzny na kolumnie [116]. W ten sposób wydzielono główny triterpen towarzyszący betulinie w ekstrakcie — lupeol (**LUP**) — w postaci octanu (**ACLUP**). Związki te scharakteryzowano spektroskopowo i za pomocą wyznaczonych temperatur topnienia. Dane zgodne z piśmiennictwem potwierdzają tożsamość tego związku jako lup-20(29)-en-3-ol [113, 114]. Przeprowadzenie szeregu dwuwymia-

¹Lepszym rozpuszczalnikiem byłby chloroform, ale ze względów ekologicznych zaniechano jego użycia.

²W piśmiennictwie opisywane są połączenia betuliny i innych triterpenów z kwasem kawowym [50, 52].

rowych eksperymentów NMR pozwoliło na dodatkowe potwierdzenie tożsamości lupeolu.

Diocetan betuliny (**BC2**) po chromatografii kolumnowej był prawie całkowicie pozbawiony zanieczyszczeń. Z bezbarwnego eluatu po odparowaniu rozpuszczalnika wypadł biały drobnokrystaliczny osad. W trakcie alkalicznej metanolizy roztwór może jednak przybierać lekko żółte zabarwienie, co świadczy o obecności zanieczyszczeń fenolowych, jak np. notowanych w piśmiennictwie połączeń betuliny z kwasem kawowym [50–52]. Dwukrotna krystalizacja wydzielonej betuliny, najpierw z metanolu, później z acetonu pozwoliła na usunięcie tego zanieczyszczenia — po alkalizacji metanolowy roztwór pozostaje bezbarwny.

Betulina była związkiem wyjściowym do dalszych badań, dlatego też, przeprowadzono szereg dwuwymiarowych eksperymentów NMR. Zarejestrowano widma, które stanowiły później bazę do porównań z innymi analizowanymi pochodnymi.

10.1.2 Synteza pochodnych betuliny

Z wydzielonej czystej betuliny uzyskano 18 pochodnych. Syntezy miały na celu zmodyfikowanie reaktywnych grup betuliny i określenie ich wpływu na aktywność cytotoksyczną cząsteczki. Każdą z syntez powtórzono co najmniej dwa razy, za wyjątkiem syntezy **DBB**.

W pierwszym rzędzie przeprowadzono syntezę szeregu homologów pochodnych diacylowych. Estryfikację prowadzono z użyciem odpowiednich bezwodników lub chlorków kwasowych w pirydynie. Użycie mniej cytotoksycznego rozpuszczalnika i jednocześnie katalizatora — trietyloaminy — wykluczono ze względu na niską rozpuszczalność w niej substratu i produktów reakcji.

Estryfikacja betuliny najłatwiej zachodziła za pomocą wysoce reaktywnych odczynników: bezwodnika octowego lub chlorków kwasowych. W większości przypadków nie był konieczny dodatek przenośnika grup acylowych, jak np. DMAP. Odstępstwo stanowiły syntezы dipropionianu (**BC3**) i dibenzoesanu betuliny (**DBB**). Uzyskanie tego pierwszego (**BC3**) wymagało kilkugodzinnego ogrzewania betuliny z bezwodnikiem propionowym w temperaturze wrzenia. Analogiczna synteza (**BC2**) zachodziła w zasadzie już po upływie 30 min., natomiast w przypadku syntezy **BC3** konieczne było intensywne ogrzewanie betuliny w pirydynie z chlorkiem benzoilu pod chłodnicą zwrotną i obecność katalizatora; tu użyto cieczy jonowej — bromku 1-butylo-3-metyloimidazoliowego (TBMIB).

Bis-hemiestry: **DGB** i **DFTB** otrzymano przez powolne stapianie betuliny z odpowiednim bezwodnikiem kwasowym. Reakcje przebiegały w ok. 120 °C a więc nieco powyżej t.t. bezwodników i znacznie poniżej t.t. betuliny (252–253 °C). Już po około 0,5 h ogrzewania cały triterpen ulegał rozpuszczeniu a na obrazie chromatograficznym ujawniały się dwie plamy pomiędzy betulina a jej diestrem, co świadczyło o częściowym przereagowaniu. Przeprowadzenie reakcji do końca wymagało trzech godzin.

Syntezę **DFTB** próbowano przeprowadzić zgodnie z podanym w piśmiennictwie przepisem, tj. przez ogrzewanie betuliny z bezwodnikiem *o*-ftalowym we wrzącej pirydynie z dodatkiem DMAP [111]. Sposób ten jednak okazał się trudniejszy do przeprowadzenia i mniej wydajny, z większą ilością produktów ubocznych: 3- i 28-hemiestrów oraz ciemno zabarwionych związków.

3MOB uzyskano w wyniku selektywnej hydrolizy **BC2** (za [116] z modyfikacją). Wykorzystano tu różnicę reaktywności pierwszo- i drugorzędowych grup hydroksylowych betuliny. Reakcję prowadzono w łagodnych warunkach — temp. 20 °C z użyciem 1% metanolowego roztworu wodorotlenku potasowego użytego w niewielkim nadmiarze molarnym. W wyniku reakcji powstała jednak częściowo betulina (**BET**) i jej 28-octan (**28MOB**), które łatwo oddzielono od głównego produktu za pomocą chromatografii kolumnowej.

28MOB otrzymano w wyniku estryfikacji betuliny na zimno w mieszaninie pirydyna—chlerek metylenu—2-propanol. Drugorzędowy alkohol zastosowano w znacznym nadmiarze molarnym aby zmniejszyć stopień estryfikacji również drugorzędowej grupy hydroksylowej betuliny C-3.

Redukcja wiązania podwójnego grupy izopropenyłowej betuliny zachodzi stosunkowo łatwo w układzie heterogenicznym Pd/C—H₂, pod warunkiem użycia świeżego katalizatora palladowego. **BC2** ulega całkowitej redukcji do **DODHB** już po kilku godzinach. Nie udało się powtórzyć opisaną przez *Protiva i wsp.* ([156]) homogenicznej redukcji z użyciem katalizatora Wilkinsona (chlorku tris-(trifenylfosfina)-rodu (I)).

Przeprowadzono bromowanie pozycji allilowej grupy izopropenyłowej za pomocą zmodyfikowanej metody z piśmiennictwa. Przedstawiony w [8, 47] sposób bromowania **BC2** za pomocą NBS wymaga ogrzewania przez kilka godzin w t.w. w CCl₄. Użycie innego rozpuszczalnika — 1,4-dioksanu — pozwoliło na ilościowe przeprowadzenie tej reakcji w czasie do 2 h w temp. 20 °C. W trakcie redukcji 30-bromo-dioctanu betuliny za pomocą wodoru na katalizatorze palladowym uwodornieniu wiązania podwójnego towarzyszyło odszczepienie bromu i powstaje dioctan dihydrobetuliny (**DODHB**), co wykazano za pomocą spektroskopii NMR oraz IR — zanik charakterystycznych pików przy 4,68 and 4,58 ppm od protonów przy C-29 grupy izopropenyłowej.

Hydroliza **BRDOB** 2% metanolowym roztworem KOH na gorąco powodowała odszczepienie reszt acetylowych oraz podstawienie bromu grupą metoksyłową. Budowę związku potwierdzono za pomocą szeregu dwuwymiarowych eksperymentów NMR.

Jak wiadomo z piśmiennictwa, betulina pod działaniem kwasu łatwo ulega izomeryzacji do allobetuliny (**ALLO**) [113, 116, 215]. Katalizatorem może być kwas Lewisa jak i Brønstedta, jednak ten pierwszy przeprowadza reakcję w krótszym czasie. Syntezę allobetuliny powtórzono za *Lavoie i wsp.* [113]. Katalizatorem w tej reakcji był tworzący się *in situ* kompleks żelaza powstający prawdopodobnie w wyniku odszczepienia wody z FeCl₃ · 6 H₂O na żelu krzemionkowym.

Zastosowanie trwałych w tych warunkach innych sześciokoordynacyjnych kompleksów żelaza (II) i (III) jak heksacyjanożelazian (II) potasowy (K₄[Fe(CN)]₆), heksacyjanożelazian (III) potasowy (K₃[Fe(CN)]₆) lub etylenodiaminatetraacetylożelazian (III) sodowy, nie powoduje zajścia takiej konwersji³. Brak izomeryzacji betuliny był potwierdzeniem tego, że obecność niezapełnionej powłoki walencyjnej (3d₄s) w kompleksie żelaza warunkuje jego działanie katalityczne⁴.

Tożsamość allobetuliny potwierdzono za pomocą spektroskopii NMR. Brak charakterystycznych sygnałów od protonów wiązania podwójnego grupy izopropenyłowej (H-29); oraz pojawienie się intensywnego sygnału przy wiązaniu eterowym (C-19) potwierdzają izomeryzację. Obecność tylko jednej grupy hydroksylowej wykazana została i analizy widma

³Ani żadnej innej wykrywalnej metodą TLC reakcji.

⁴Jako kwasu Lewisa.

10.2. Lipofilność betuliny i jej pochodnych

NMR ^1H produktu wyczerpującej acetylacji allobetuliny (**ACALLO**) — widoczny jest tylko jeden singlet protonów acetylowych.

Allobetulina posiada odmienny typ strukturalny od betuliny, co było podstawą do podjęcia decyzji o zarejestrowaniu widm dwuwymiarowych w celu dokonywania porównań z innymi związkami.

Temperatury topnienia niektórych z uzyskanych związków, odbiegają (niekiedy nawet znacznie, bo o ok. $10\text{ }^\circ\text{C}$) od podawanych w piśmiennictwie. Na przykład dla lupeolu wyznaczona wartość t.t. wynosiła $189\text{--}193\text{ }^\circ\text{C}$ a za [114] powinna mieścić się w granicach: $212\text{--}213\text{ }^\circ\text{C}$. Może to być spowodowane zastosowaniem różnych rozpuszczalników przy krystalizacji. Rozbieżności mogły także wynikać z różnych technik pomiaru.

Masy cząsteczkowe obliczono na podstawie wzorów sumarycznych, a także wyznaczono za pomocą spektroskopii masowej MS ESI. Nie udało się eksperymentalnie potwierdzić mas cząsteczkowych związków powyżej $751,23\text{ u.}$, tj. dla **BC12** i **BC16**. Pozostałe wyznaczone masy są zgodne z teoretycznymi w granicach 1 a.j.m.

Tożsamość i czystość uzyskanych związków została potwierdzona za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Ponadto na widmach NMR nie były widoczne — poza kilkoma przypadkami — żadne dodatkowe sygnały, które mogłyby świadczyć o obecności zanieczyszczeń. Na widmach ^{13}C liczba atomów węgla z reguły była mniejsza niż spodziewana na podstawie wzorów sumarycznych. Było to spowodowane pokrywaniem się sygnałów od niektórych atomów węgla, co ilustruje np. tabela 2 (str. 211) — nierozróżnialne sygnały węgla 8 i 14 allobetuliny. Jedynie w kilku przypadkach widoczne są sygnały od niewielkich ilości zanieczyszczeń. Na widmie ^1H betuliny widoczny jest singlet przy $2,2\text{ ppm}$, który pochodzi prawdopodobnie od acetonu. Ze względu na obecność tego sygnału, przeprowadzono analizę HPLC czystości betuliny i stwierdzono bardzo wysoką czystość związku⁵.

10.2 Lipofilność betuliny i jej pochodnych

Lipofilność jest jednym z głównych deskryptorów właściwości farmakodynamicznych, farmakokinetycznych i cytotoksycznych cząsteczki. Biorąc pod uwagę strukturę betuliny, której wzór sumaryczny przedstawia się zapisem: $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$, intuicyjnie można się spodziewać praktycznie braku jej rozpuszczalności w wodzie. Zatem wybór klasycznej metody wytrząsania do oznaczenia lipofilności był nieodpowiedni w tym wypadku. Dodatkowym kontrargumentem była trudność znalezienia dobrej metody detekcyjnej pozwalającej precyzyjnie oznaczać stężenie betuliny (lub jej pochodnych) w obydwu fazach. Betulina ma tylko jedno wiązanie podwójne. Maksimum absorpcji w UV VIS leży przy $\lambda = 210\text{ nm}$, tj. zakresie silnie przesłanianym przez liczne rozpuszczalniki. Dodatkowo spodziewana śladowa rozpuszczalność w wodzie powodowałaby zapewne obarczenie oznaczenia ilości betuliny w fazie wodnej bardzo dużym błędem, gdyż jej stężenie byłoby poza zakresem oznaczalności większości metod analitycznych (w tym UV-VIS).

Biorąc pod uwagę te fakty zamiast bezpośrednio oznaczać współczynniki podziału 1-oktanol–woda, zdecydowano na wybór metody chromatograficznej RP-TLC (ang.: Reversed Phase Thin Layer Chromatography), pozwalającej obliczyć współczynniki lipofilności

⁵Warunki: Chromatograf cieczerwowy DIONEX z detektorem (PDA 100 UV-VIS), kolumna: Hypersil BDS C-18 ($5\ \mu$, $250 \times 4,6\text{ mm}$; Thermo EC), prekolumna: Hypersil BDS C-18 ($5\ \mu$, $10 \times 4,6\text{ mm}$; Thermo EC), prędkość przepływu: 1 ml/min , objętość nastrzyku: $20\ \mu\text{l}$, detektor UV-210 nm, temperatura kolumny: $20\text{ }^\circ\text{C}$, faza ruchoma: acetonitryl–woda 86 : 14, czas analizy 20 min.

cząsteczkowej R_{M0} na podstawie uzyskanych eksperymentalnie wartości R_f . Są one dobrą miarą lipofilności cząsteczek i dobrze korelują z wyznaczanymi teoretycznie i doświadczalnie wartościami $\log P$ [94, 147].

Istnieje tylko kilka doniesień literaturowych dotyczących wyznaczania lipofilowości silnie hydrofobowych związków tą techniką. Należą tu: oznaczenie kilku hormonów płciowych, stigmasterolu, β -sitosterolu, hydrokortyzonu i cholesterolu, z wykorzystaniem faz metanol-woda lub acetonitryl-woda [157] i bardziej polarnych pochodnych związków steroidowych — kwasów żółciowych [169], a także kilka oznaczeń współczynników podziału pochodnych androstenu za pomocą HP-TLC z normalną fazą [146] oraz pochodnych dehydroepiandrosteronu (RP-18 HPTLC) [147].

Wstępne doświadczenia z użyciem klasycznych mieszanin elucyjnych: acetonitryl-woda, metanol-woda, powiodły się tylko częściowo. Wartości R_f mogły być wyznaczone tylko dla cholesterolu, betuliny i jej bardziej polarnych pochodnych, **DGB** i **DFTB**, natomiast pozostałe związki były zupełnie nierozpuszczalne w tych układach i większość z nich pozostawała na linii startowej. Dlatego zdecydowano o wyborze 1,4-dioksanu jako fazy organicznej mieszaniny elucyjnej. Jest to rozpuszczalnik aprotyczny o małym wypadkowym momencie dipolowym ($\mu = 0,45D$) i umiarkowanie niskiej zdolności przyłączania wiązań wodorowych (wartość $\beta = 0,37$, określona przez Kamlet-Tafta), a zatem dobrze nadający się do zamierzonych badań [126]. Ponadto wszystkie badane związki dobrze rozpuszczają się w nim w każdej proporcji, zatem dobrze nadawał się do przeprowadzenia wymaganych oznaczeń.

Na podstawie wyznaczonych wartości R_f wg równania 9.1 (str. 104) obliczono współczynniki R_M , które zestawiono w tabeli 10.1. Współczynniki te korelują ze zmianą stężenia dioksanu w fazie ruchomej w sposób prostoliniowy. Przykład tej zależności przedstawiono na rys.10.2.

Przy założeniu dalszej prostoliniowej zależności ekstrapolowano wyniki do zerowego stężenia frakcji organicznej za pomocą równania 9.2 (str. 104). Wyznaczone w ten sposób wartości cząsteczkowych współczynników lipofilności zestawiono w tabeli 10.2. Analiza równań regresji liniowej za pomocą testu F wykazała, że są one istotne statystycznie. Wszystkie wartości P wynikające z wartości F i danej liczby stopni swobody — tutaj 1 i $n-2$ — są mniejsze niż 0,05.

Tabela 10.1: Wartości R_M pochodnych betuliny dla fazy ruchomej 1,4-dioksan—bufor octanowy Wallpola (pH=4,8)

związek:	CHOL	BET	ALLO	DHB	DODHB	30MBET	DOB	DPB	3MOB	28MOB	DFTB	DBB	DGB
V_{fo} [%]	R_M												
90	-0,128	-0,656	-0,380	-0,568	-0,235	-0,720	-0,343	-0,235	-0,510	-0,486	-0,730	-0,222	-0,750
85	0,248	-0,404	-0,091	-0,323	-0,016	-0,491	-0,026	0,108	-0,261	-0,259	-0,515	0,082	-0,522
80	0,586	-0,172	0,222	-0,056	0,436	-0,271	0,372	0,545	0,061	0,068	-0,265	0,602	-0,284
75	0,940	0,103	0,555	0,252	0,926	-0,031	0,764	1,005	0,414	0,419	0,064	1,123	0,052
70	1,403	0,475	0,974	0,635	1,261	0,265	1,211	1,428	0,757	0,740	0,145	1,540	0,231
65	—	0,869	—	1,055	—	0,621	—	—	—	—	0,450	—	0,682
60	—	—	—	—	—	0,895	—	—	—	—	0,785	—	1,097

V_{fo} — zawartość procentowa 1,4-dioksanu w eluencie (V/V)

Tabela 10.2: Współczynniki korelacji liniowej pomiędzy wartościami R_{M0} badanych związków a stężeniem 1,4-dioksanu w fazie ruchomej obliczone na podstawie rów. 9.2

L.p.	związek	R_{M0}	b	n	r	r^2	s	F	P
1	CHOL	6,616 ± 0,202	-0,075 ± 0,002	5	0,998	0,997	0,040	888	<0,0001
2	BET	4,702 ± 0,268	-0,060 ± 0,003	6	0,993	0,987	0,072	306	<0,0001
3	ALLO	5,622 ± 0,228	-0,067 ± 0,003	5	0,997	0,995	0,045	557	0,0002
4	DHB	5,169 ± 0,274	-0,065 ± 0,003	6	0,994	0,988	0,074	337	<0,0001
5	DODHB	6,769 ± 0,417	-0,079 ± 0,005	5	0,993	0,987	0,082	229	0,0005
6	30MBET	4,112 ± 0,156	-0,054 ± 0,002	7	0,996	0,993	0,055	691	<0,0001
7	BC2	6,632 ± 0,207	-0,078 ± 0,003	5	0,998	0,997	0,041	914	<0,0001
8	BC3	7,327 ± 0,188	-0,084 ± 0,002	5	0,999	0,998	0,037	1302	<0,0001
9	3MOB	5,227 ± 0,188	-0,064 ± 0,002	5	0,998	0,996	0,037	751	0,0001
10	28MOB	5,104 ± 0,205	-0,063 ± 0,003	5	0,997	0,995	0,040	599	0,0002
11	DFTB	3,679 ± 0,174	-0,049 ± 0,002	7	0,994	0,989	0,061	455	<0,0001
12	DBB	7,929 ± 0,348	-0,091 ± 0,004	5	0,997	0,993	0,068	444	0,0002
13	DGB	4,607 ± 0,272	-0,060 ± 0,004	7	0,991	0,983	0,095	284	<0,0001

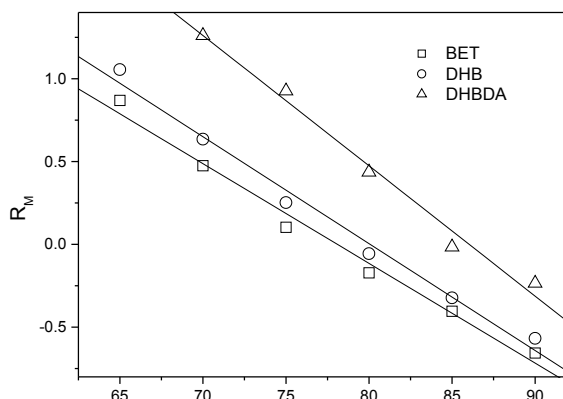
n — liczba powtórzeń; r — współczynnik korelacji; r^2 , współczynnik determinacji; s — odchylenie standardowe; F — F-test istotności; P — prawdopodobieństwo.

Dwie z badanych pochodnych posiadające wolne grupy karboksylowe — **DGB** i **DFTB** — miały tendencje do tworzenia na chromatogramach pasm. Spowodowane to było prawdopodobnie jonizacją wolnych grup karboksylowych w tych cząsteczkach. W celu uzyskania równych plam zamiast wody zastosowano 0,2 M bufor octanowy Walpola o pH = 4,8. Aby całkowicie cofnąć dysocjację przy oznaczaniu lipofilności metodą wytrząsania, zalecane jest aby pH buforu było oddalone o 3 jednostki od pK badanego związku [19]. Mimo iż kwas ftalowy ma $pK_{a1} = 2,943$ i $pK_{a2} = 5,432$, a glutarowy $pK_{a1} = 4,31$ i $pK_{a2} = 5,41$, użycie buforu octanowego o pH = 4,8 było wystarczające do wyeliminowania smużenia na płytkach.

Betulina (**BET**) ma mniejszą lipofilność niż cholesterol (**CHOL**). Wprawdzie cząsteczka triterpenu jest większa ($C_{30}H_{50}O_2$) niż steroidu ($C_{27}H_{46}O$), ale obecność dwóch grup hydroksylowych na obu końcach, ma silny wpływ zmniejszający charakter hydrofobowy tej zbudowanej z pięciu pierścieni cząsteczki.

W obrębie serii półsyntetycznych pochodnych betuliny najsilniejszy wzrost lipofilności spowodowany był przez estryfikację grup hydroksylowych betuliny kwasem benzoowym. Dibenzoesan betuliny (**DBB**) wykazywał najwyższą lipofilność spośród badanych związków. Można to częściowo wytłumaczyć przez przesłanianie grup estrowych. Polarny fragment — O—C=O — łączący cząsteczkę betuliny z pierścieniem aromatycznym jest hydrofilowy, jednak duży podstawnik benzenowy zmniejsza przestrzeń dostępną dla cząsteczek wody, które potencjalnie mogłyby oddziaływać z tym fragmentem estrowym, tworząc wiązania wodorowe. Można powiedzieć, że pierścień benzenowy wnosi znaczną hydrofobowość w sąsiedztwie grup estrowych **DBB**, silnie odpychając cząsteczki wody. Rozpuszczalność tego związku w DMSO była lepsza niż analogicznych pochodnych dioctanu betuliny (**BC2**) czy dipropionianu betuliny (**BC3**). Ten ostatni, pomimo, że posiada współczynnik R_{M0} niższy niż **DBB**, praktycznie nie rozpuszczał się w DMSO.

10.2. Lipofilność betuliny i jej pochodnych



Rys. 10.2: Zależność współczynników R_M dla związków **BET**, **DHB** i **DODHB** od stężenia 1,4-dioksanu w fazie ruchomej

Tabela 10.3: Wyznaczone (R_{M0}) i obliczone ($\log P - Pallas$, $\log P - ACD$) wartości lipofilności dla cholesterolu, betuliny i jej pochodnych

L.p.	związek	R_{M0}	$\log P$ (Pallas)	$\log P$ (ACD/3D)	$ClogP$	$\log P$ (QikProp)
1	CHOL	6,616±0,202	8,11	9,85±0,28	—	—
2	BET	4,702±0,268	6,75	9,01±0,39	—	6,06*
3	ALLO	5,622±0,228	6,36	8,92±0,47	—	6,24*
4	DHB	5,169±0,274	6,99	9,28±0,36	—	—
5	DODHB	6,769±0,417	7,11	11,07±0,39	—	—
6	30MBET	4,112±0,156	6,58	7,68±0,47	—	—
7	3MOB	5,227±0,188	6,77	9,91±0,40	—	—
8	28MOB	5,104±0,205	6,77	9,91±0,40	—	—
9	DFTB	3,679±0,174	8,94	12,71±0,48	—	—
10	DBB	7,929±0,348	8,74	14,84±0,41	—	—
11	DGB	4,607±0,272	7,20	10,35±0,53	—	—
12	BC2	6,632±0,207	6,64	10,80±0,42	—	—
13	BC3	7,327±0,188	7,41	11,87±0,42	—	—
14	BC4	—	7,83	12,93±0,42	—	—
15	BC6	—	8,62	15,05±0,42	—	—
16	BC8	—	9,36	17,18±0,42	—	—
17	BC10	—	10,06	19,30±0,42	—	—
18	BC12	—	10,76	21,43±0,42	—	—
19	BC12	—	11,42	23,55±0,42	—	—
20	BC16	—	12,01	25,68±0,42	—	—
21	BRDOB	—	6,85	10,75±0,43	—	—
22	LUP	—	7,25	10,98±0,38	—	—
23	BDS**	—	—	—	9,55	—
24	BDPH**	—	—	—	7,27	—

* za [199];

** za [20]; BDS — disiarczan betuliny; BDPH — difosforan betuliny

We wspomnianych dipodstawionych pochodnych z resztą octanową (**BC2**) lub propionianową (**BC3**), obserwowano również znaczny wzrost wartości współczynników R_M . Zachowana była tutaj znana tendencja — dłuższy łańcuch węglowy — wyższa lipofilność.

Przyłączenie łańcucha acylowego tylko o jeden atom węgla dłuższego niż propionian do betuliny, powodowało dramatyczny spadek rozpuszczalności pochodnej w mieszaninie 1,4-dioksan–bufor octanowy.

Dimaślan betuliny (**BC4**) tylko nieznacznie przemieszczał się z linii startowej, nawet przy najwyższych stężeniach rozpuszczalnika organicznego mieszaniny elucyjnej. Natomiast dikapronian betuliny (**BC6**) pozostawał na linii startowej. Dlatego też dla tego związku i pochodnych o dłuższych łańcuchach acylowych, tj.: **BC6–BC16**, nie wyznaczono współczynników R_{M0} obliczając jedynie wartości teoretyczne. Ponieważ jednak wyznaczona wartość cząsteczkowego współczynnika lipofilności (R_{M0}) związku **BC3** wynosiła $7,327 \pm 0,188$ a obliczone za pomocą programu Pallas⁶ 7,41, to pochodne o dłuższych łańcuchach można z dużym prawdopodobieństwem zakwalifikować do związków superlipofilnych ($\log P > 8$).

Dwie z uzyskanych pochodnych **DGB** i **DFTB**, z wolnymi grupami karboksylowymi, mają niższą lipofilność niż betulina. Obecność dwóch grup karboksylowych w najbliższym sąsiedztwie wiązania estrowego w **DFTB**, zmniejszała lipofilność związku prawie o 50% w porównaniu do **DBB**. W przypadku **DGB** spadek nie był tak silny, pomimo że kwas glutarowy miał tylko 3 hydrofobowe grupy $-\text{CH}_2-$ w porównaniu do sześciu $-\text{CH}-$ kwasu *o*-ftalowego.

Redukcja wiązania podwójnego w łańcuchu izopropenylovym betuliny i jej pochodnych, zmniejszała możliwość oddziaływań z cząsteczkami hydrofilnymi, co prowadziło do zwiększenia lipofilności. Efekt ten był silniejszy dla pary związków **BET–DHB** ($\Delta R_{M0} = 0,467$) niż dla ich diacetylo pochodnych **BC2–DODHB** ($\Delta R_{M0} = 0,137$). Dodatkowo był on przeciwny do przewidywanego z obliczeń $\log P$ –*Pallas*: odpowiednio $\Delta \log P$ 0,24 (**BET–DHB**) i 0,47 (**BC2–DODHB**). Natomiast dane uzyskane z programu ACDLogP były bliższe do danych doświadczalnych: $\Delta \log P$ 0,57 (**BET–DHB**) i 0,27 (**BC2–DODHB**).

Acetylacja jednej grupy hydroksylowej betuliny miała niewielki wpływ na wzrost lipofilności. Porównując monoestry betuliny **3MOB** był bardziej lipofilny niż **28MOB**, co sugeruje, że pierwszorzędowa grupa hydroksylowa była przesłaniana przez hydrofobowy szkielet węglowodorowy cząsteczki. Zatem drugorzędowa grupa hydroksylowa (C-3) była bardziej dostępna dla cząsteczek polarnych. Te dwie pozycje grup hydroksylowych były nierozróżnialne dla programów liczących $\log P$.

Utrata wiązania podwójnego i przekształcenie pierwszorzędowej grupy hydroksylowej w eterową w allobetulinie, miały spodziewany wpływ na wzrost lipofilności ($\Delta R_{M0} = 0,92$). Co ciekawe programy niepoprawnie przewidywały spadek lipofilności, tj. o $\Delta \log P = -0,39$ (*Pallas*) $\Delta \log P = -0,09$ (*ACD*), co jest nawet sprzeczne z intuicją, gdyż utrata grupy hydroksylowej na rzecz eterowej powinna zmniejszyć zdolność tworzenia wiązań wodorowych i co za tym idzie zwiększyć lipofilność. Natomiast *Thibeault i wsp.* za pomocą programu QikProp (*Schrödinger, USA*) uzyskali dodatnią wartość $\Delta \log P = 0,18$ [199].

⁶Na podstawie wyników obliczeń $\log P$ za pomocą programu ACD 3D, wszystkie badane związki wliczając w to cholesterol, są superlipofilne.

Wartości współczynników lipofilności uzyskane za pomocą obliczeń opartych na rozważaniach teoretycznych, o czym wcześniej wspomniano, z reguły odbiegają od danych empirycznych. Odstępstwa są większe dla dużych, złożonych struktur, co jest oczywiste, ze względu na niemożność uwzględnienia przez programy komputerowe wszystkich wewnątrz- i zewnątrz-molekularnych oddziaływań cząsteczki.

Kształt i stopień skomplikowania pięciocyklicznych triterpenów typu lupanu, w tym betuliny, jest duży. Cząsteczka betuliny ma niepłaskie pierścienie (w konformacjach krzesłowych), co zwiększa ilość możliwych oddziaływań cząsteczkowych. Zapewne dlatego uzyskane za pomocą obliczeń wartości $\log P$ różnią się pomiędzy programami. Wyniki te są zawyżone, co sugerować może, że w cząsteczce następuje kontrakcja⁷ hydrofobowości. Innymi słowy, połączenie zbioru fragmentów cząsteczkowych w całość, daje mniejszą wypadkową hydrofobowość niż suma hydrofobowości poszczególnych elementów.

Wydaje się przy tym mało prawdopodobne, aby programy nie uwzględniały hydrofilowego przyczynku grup hydroksylowych. Reasumując, uzyskane wartości współczynników R_{M0} , mogą być bardziej wiarygodnymi reprezentacjami lipofilności.

10.3 Cytotoksyczność betuliny i jej pochodnych

10.3.1 Oznaczenia cytotoksyczności na komórkach ludzkich NCI-H292 i ARPE-19 w testach MTT i LDH

Do oznaczenia cytotoksyczności betuliny i jej pochodnych zastosowano dwa rodzaje metod: bezpośrednią — polegającą na liczeniu komórek żywych i martwych (wybarwionych), oraz pośrednią — wykorzystującą pomiar spektrofotometryczny stężenia produktu redukcji związku chemicznego przez komórki z funkcjonalnymi mitochondriami (żywe). Pomocniczo w tym drugim przypadku, przeprowadzono pomiar uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH), konstytutywnego enzymu cytozolowego, obecnego we wszystkich typach komórek. Ponadto w metodzie pośredniej obserwowano obraz mikroskopowy komórek po podaniu badanych związków, co pozwoliło na lepsze zrozumienie uzyskanych wyników pomiarów.

W przeprowadzonych testach betulina, i niektóre z jej pochodnych, wykazywały wysoką cytotoksyczność na badanych liniach komórkowych.

Cytotoksyczność betuliny i jej półsyntetycznych pochodnych w testach MTT i LDH na liniach ludzkiego gruczolakoraka płuc (NCI-H292) i komórek nabłonka upigmentowanego oka (ARPE-19) przedstawiono na wykresach 10.3–10.33. Dla porównania oznaczono cytotoksyczność cholesterolu na obu liniach oraz doksorubicyny (**DOX**) na linii NCI-H292. Wykresy przedstawiają na ogół średnie wartości z dwóch niezależnych eksperymentów po 4 powtórzenia w każdym; tj. średnie z ośmiu wyników.

Wyniki oznaczeń cytotoksyczności w teście z błękitem trypanu na komórkach mysich: czerniaka (B16), mięsaka (XC) i prawidłowych fibroblastów (3T3), zobrazowano na wykresach 10.39–10.42 (str. 142–145), gdzie podano wartości średnie z trzech równoległych powtórzeń.

W doświadczeniu wstępnym zastosowano przyjęte *a priori* duże stężenia betuliny: w zakresie 10–40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i zastosowano dwa różne rozpuszczalniki, dimetylosulfotlenek (DMSO)

⁷Zwiększenie upakowania molekularnego.

oraz 2-butoksyetanol. Ten pierwszy rozpuszczalnik w stężeniu $2 \mu\text{l/ml}$ (0,2%) w oznaczeniach po 24 h jest niecytotoksyczny dla komórek NCI-H292, co obrazuje rysunek 10.4(a) (str.120). Przy wyższych stężeniach — aż do $16 \mu\text{l/ml}$ (1,6%) — wykazuje niewielką cytotoxyczność (rys. 10.4(b)).

2-Butoksyetanol jest niecytotoksyczny tylko w niskich stężeniach — ok. 0,1% (rys. 10.3.1). Pomimo istotnej cytotoxyczności tego rozpuszczalnika w stężeniach powyżej 0,1% w medium, znaczącą jego zaletą jest zdolność solubilizacji związków silnie lipofilnych. Roztwory wyjściowe pochodnych betuliny sporządzane do testów cytotoxyczności w DMSO, miały stężenie w granicach 1–4 mg/ml. Uzyskanie wyższych stężeń w prawie wszystkich przypadkach — oprócz **DGB** i **DFTB** — było praktycznie niemożliwe. Natomiast większość z tych związków bardzo dobrze rozpuszcza się w butoksyetanolu, dając bez problemu roztwory o stężeniach 10 mg/ml. Dzięki temu możliwe było osiągnięcie niskiego stężenia końcowego 2-butoksyetanolu — 0,1% — w niewielkim stopniu cytotoxycznego dla komórek.

W obrazie mikroskopowym komórek poddanych działaniu betuliny w 2-butoksyetanolu, widoczne jest bardzo silne działanie tego związku, już przy najmniejszym użytym stężeniu, tj. $5 \mu\text{g/ml}$ ($11,3 \mu\text{M}$) (rys. 10.6(a), str.122). Czysty rozpuszczalnik (kontrola) ma niewielką cytotoxyczność (rys. 10.3.1). Na obrazie mikroskopowym komórek poddanych działaniu betuliny w stężeniu $20 \mu\text{g/ml}$ ($45,2 \mu\text{M}$) (rys. 10.3.1) widocznych było więcej komórek, niż na zdjęciu komórek poddanych działaniu czystego 2-butoksyetanolu w stężeniu 0,75% (rys. 10.3.1), lecz jednak wszystkie komórki poddane działaniu triterpenu były martwe.

Ponieważ oznaczenie MTT jest wiarygodną, powszechnie stosowaną metodą określenia cytotoxyczności dla związków triterpenowych typu lupanu (vide tab.4.1, str. 25), nie wydawało się konieczne oznaczanie całkowitego uwalniania LDH. Wprawdzie pozwoliłoby na obliczenie cytotoxyczności w tym teście, ale wartości uzyskane za jego pomocą charakteryzowałyby się znacznymi odchyleniami. Szczególnie w przypadku linii ARPE-19 oraz w oznaczeniu z DMSO po 48 h (rys. 10.3(d)) powtarzalność oznaczeń wewnątrz serii była niska, co zmniejsza wiarygodność wyników uzyskanych w teście LDH. Mogło to być np. spowodowane inhibicją enzymu przez DMSO — w oznaczeniu z butoksyetanolem wartości były wyższe (rys. 10.5(d)), ale i tak niższe niż po 24 h (rys. 10.5(c)). Świadczyć to może o częściowej inaktywacji LDH.

Cytotoxyczności znanego cytostatyku dokсорubicyny (**DOX**) w teście MTT i LDH były ze sobą dobrze skorelowane (rys. 10.38(b)). Niższym wartościom przeżywalności w teście MTT odpowiadało większe uwalnianie LDH.

Cytotoxyczność betuliny w teście MTT po 48 h (rys. 10.3(b)) różniła się niewiele, ale w sposób istotny statystycznie od cytotoxyczności obserwowanych po 1 dobie (rys. 10.3(a)) z DMSO jako rozpuszczalnikiem. Natomiast w metodzie z 2-butoksyetanolem jako rozpuszczalnikiem, przeżywalność komórek po 48 h (rys. 10.5(b)) była pozornie większa niż po 24 h (rys. 10.5(a)). W oznaczeniu MTT wyższym wartościom absorbancji odpowiada większe stężenie barwnego formazanu powstałego w wyniku redukcji przez żywe komórki z nieuszkodzonymi błonami lipidowymi mitochondriów; większa wartość — niższa cytotoxyczność. Przypuszczać zatem można, że w przypadku 48 h oznaczenia cytotoxyczności betuliny w 2-butoksyetanolu, dochodzi do uruchomienia jakiegoś procesu, powodującego redukcję MTT do purpurowego formazanu. Wskutek tego cytotoxyczności mogły być zaniżone. Prawdopodobnie można tu wykluczyć solubilizację formazanu przez 2-butoksyetanol i błąd spowodowany przez jego usuwanie wraz z medium hodowlanym, gdyż dla wyższych

10.3. Cytotoksyczność betuliny i jej pochodnych

stężeń betuliny — 20 i 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ — i co za tym idzie ilości tego rozpuszczalnika w medium, otrzymane wartości po 48 h były większe niż po 24 h.

Powyższe fakty oraz niższa wiarygodność metody LDH po 48 h, zdecydowały o przeprowadzaniu pozostałych oznaczeń po upływie 24 h.

Na obu badanych liniach komórek ludzkich w zakresie stężeń 1–8 μM betulina wykazywała wysoką cytotoksyczność. W teście MTT uzyskane wartości dla linii nowotworowej (NCI-H292) wynoszą ponad 50% (rys. 10.7) a dla prawidłowej (ARPE-19) ponad 60% (rys. 10.9). Wyższe stężenie betuliny powodowało wzrost uwalniania LDH z komórek linii NCI-H292 (rys. 10.7(b)); natomiast wyniki tego testu dla komórek ARPE-19 są mało wiarygodne ze względu na duże rozrzuty wartości. Obraz mikroskopowy komórek nie wykazywał większych różnic w całym zakresie stężeń 1–8 μM , gdyż większość komórek przy najniższym zastosowanym stężeniu była już uszkodzona. Komórki były obkurczone a nieliczne rozerwane.

Fundamentalne znaczenie dla działania cytotoksycznego betuliny ma grupa hydroksylowa w pozycji 3. Pochodna betuliny z zablokowaną tą grupą — **3MOB** — nie wykazuje cytotoksyczności w całym, badanym zakresie stężeń, zarówno na ludzkiej linii nowotworowej (NCI-H292), jak i prawidłowej (ARPE-19). W obrazie mikroskopowym obu linii niewidoczne były jakiegokolwiek zmiany wyglądu komórek (rys. 10.14 i 10.12). Również test LDH nie wykazywał w granicach błędu zwiększonego uwalniania enzymu (rys. 10.11(b), 10.13(b)). Natomiast w teście MTT tylko w przypadku linii nowotworowej następuje pozorny wzrost przeżywalności z wartościami 1–1,3, tj. 100–130% (rys. 10.11(a)). Ponieważ MTT jest redukowany głównie w mitochondriach, takie wyniki mogą świadczyć o nasileniu procesów oksydoredukcyjnych w tych organellach. Nasilenie oddychania komórkowego lub/i rozpręgnięcie fosforylacji oksydatywnej było prawdopodobnie wywołane przez **3MOB**.

Co ciekawe, podobny efekt, pozorny wzrost przeżywalności komórek linii nowotworowej NCI-H292 (rys. 10.15(a)) z wartościami w granicach 100–130% oraz 95–100% dla prawidłowej (rys. 10.17(a)), obserwowano również w przypadku innego monoestru betuliny — **28MOB**. W granicach błędu zjawisko to jest identyczne jak dla **3MOB**. Jednak przy najwyższym stężeniu **28MOB** (8 μM) zaznacza się jego niewielka cytotoksyczność — 30% \pm 8% — wobec komórek linii NCI-H292 oraz znaczna — 46% \pm 6% — dla komórek ARPE-19. Ze zwiększeniem cytotoksyczności **28MOB** skorelowany był również wzrost poziomu uwalnianego LDH. Był on niższy — 1,97 \pm 0,19 dla komórek NCI-H292 (rys. 10.15(b)) — i wyższy 3,5 \pm 0,89 dla komórek ARPE-19 (rys. 10.17(b)).

Zablokowanie obydwu grup hydroksylowych betuliny przez estryfikację stosunkowo dużym objętościowo podstawnikiem — kwasem benzoesowym — powoduje całkowite zniesienie cytotoksyczności w badanych liniach ludzkich w zakresie 1–8 μM związku **DBB**. Widoczne jest to zarówno w obrazie mikroskopowym (rys. 10.20 NCI-H292 i 10.22 ARPE-19), jak i obydwu testach cytotoksyczności (rys. 10.19 NCI-H292 i 10.21 ARPE-19).

Estryfikacja grup hydroksylowych kwasem octowym w **BC2** była łatwiejsza do przeprowadzenia, ale związek ten bardzo słabo rozpuszczał się w DMSO. Pomimo, że lipofilność dibenzoesanu betuliny (**DBB**) była o ponad jednostkę wyższa niż dioctanu betuliny (**BC2**) — odpowiednio $R_{M0}^{DBB} = 7,92$ i $R_{M0}^{DOB} = 6,63$ (tab. 10.3, str. 113) — to dibenzoesan betuliny był lepiej rozpuszczalny, dzięki obecności dodatkowych wiązań podwójnych w dwóch pierścieniach aromatycznych.

Bis(hemifitalan)betuliny (**DFTB**) w stężeniach 1–4 μM , podobnie jak monoestry betuliny, nasila procesy mitochondrialne bardziej w komórkach linii nowotworowej, nie wykazując

cytotoksyczności (rys. 10.24, 10.19 NCI-H292 i 10.26, 10.25ARPE-19).

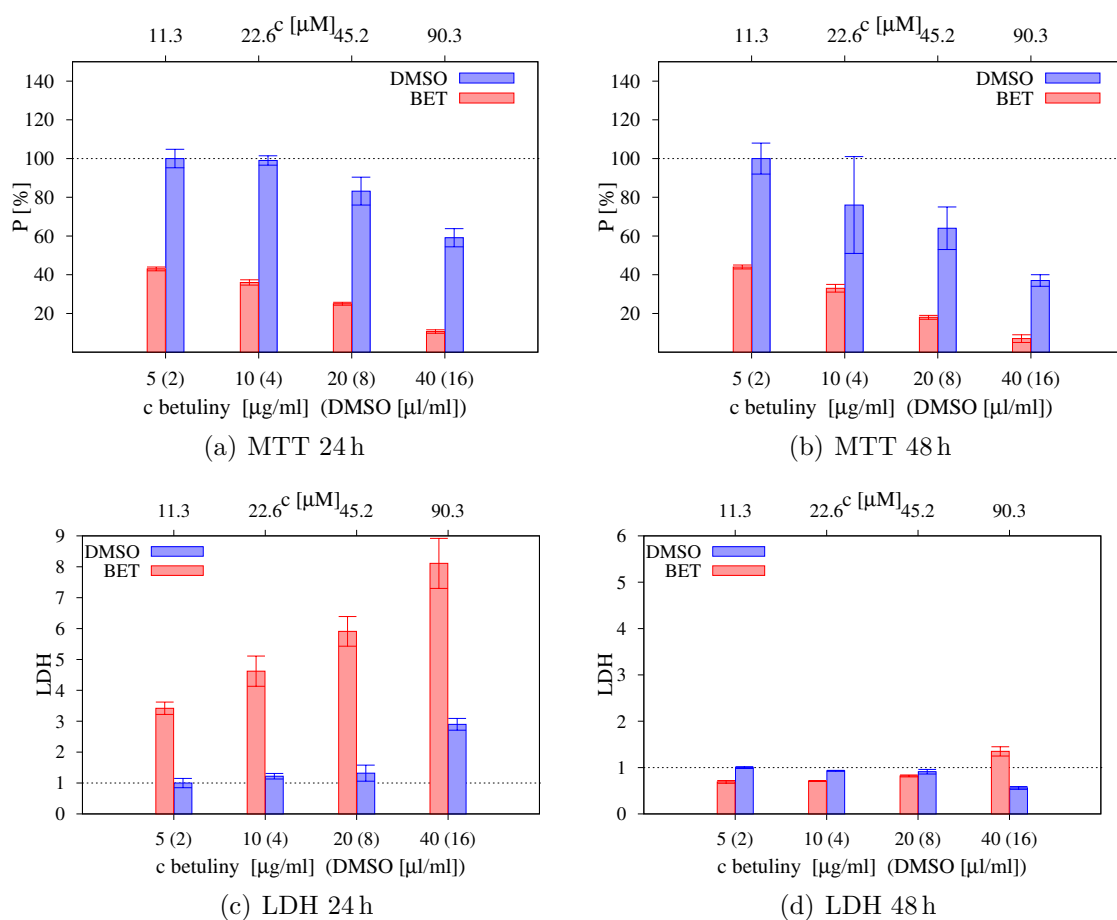
Cytotoksyczność bis(hemiglutaranu)betuliny (**DGB**) kształtowała się podobnie jak w przypadku **DFTB**. W zakresie stężeń 1–4 μM następował pozorny wzrost przeżywalności komórek linii nowotworowej (rys. 10.27), natomiast przy stężeniu 8 μM związek był cytotoksyczny dla komórek obydwu linii (61 ± 13 NCI-H292 i $54 \pm 4\%$ ARPE-19). Wyniki testu LDH wykazują wzrost uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (rys. 10.27 i 10.29(b)), potwierdzając cytotoksyczność związku **DGB** przy tym stężeniu. Dodatkowo w obrazie mikroskopowym widać uszkodzenie komórek większe dla linii NCI-H292 (rys. 10.3.1) niż dla ARPE-19 (rys. 10.3.1).

30-Metoksybetulina (**30MBET**) miała działanie cytotoksyczne nieznacznie silniejsze niż betulina (**BET**). W całym badanym zakresie stężeń komórki linii ARPE-19 były bardziej wrażliwe na ten związek niż komórki NCI-H292 (przeżywalność 41% ($\pm 3\%$)–23% (± 2) i 40% ($\pm 4\%$)–35% ($\pm 4\%$)). Na podstawie obrazu mikroskopowego (rys. 10.32 i 10.34) oraz testu LDH (rys. 10.31 i 10.33), z analizy wynika, że pochodna metoksyłowa ma znacznie silniejsze działanie cytotoksyczne na linię ARPE-19 niż NCI-H292. Tymczasem betulina działa silniej cytotoksycznie na linię nowotworową.

Cholesterol (**CHOL**) wykazywał pozornie cytotoksyczne działanie na obydwie linie komórkowe. Oznaczone w teście MTT wartości przeżywalności plasują się w przedziałach 60–70% dla komórek linii NCI-H292, oraz 35–40% dla ARPE-19. Wyniki te nie znajdują potwierdzenia w teście LDH (rys. 10.37(b) i 10.35(b)), ani w obrazie mikroskopowym komórek (rys. 10.36). Obniżenie wartości przeżywalności może być spowodowane wzrostem sztywności (uszczelnieniem) błon lipidowych, wskutek czego MTT trudniej dostaje się do mitochondriów żywych komórek. Brak możliwości analizy obrazu mikroskopowego lub dodatkowego oznaczenia cytotoksyczności, sugerowałoby znaczną cytotoksyczność cholesterolu w tym zakresie stężeń.

Przy najwyższym stężeniu (8 μM) cytotoksyczność związków **28MOB**, **DFTB** oraz **DGB** była podobna. Przeżywalność komórek wyznaczona testem MTT mieściła się w zakresie 50–70%. Spośród nich najsilniejsze uwalnianie LDH wywoływane było przez **28MOB** w przypadku linii prawidłowej ($3,5 \pm 1$) i **DGB** ($2,7 \pm 0,7$) w przypadku nowotworowej. Obraz mikroskopowy komórek również potwierdzał cytotoksyczne działanie tych związków.

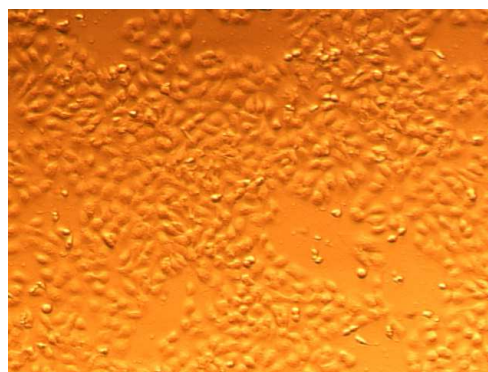
10.3. Cytotoksyczność betuliny i jej pochodnych



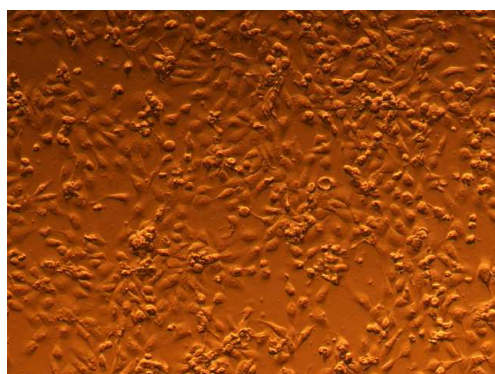
Rys. 10.3: Cytotoksyczność betuliny (**BET**) na komórki linii NCI-H292 w teście MTT po 24 h (a) i 48 h (b) oraz w teście LDH po 24 h (c) i 48 h (d); rozpuszczalnik dimetylosulfotlenek (DMSO)



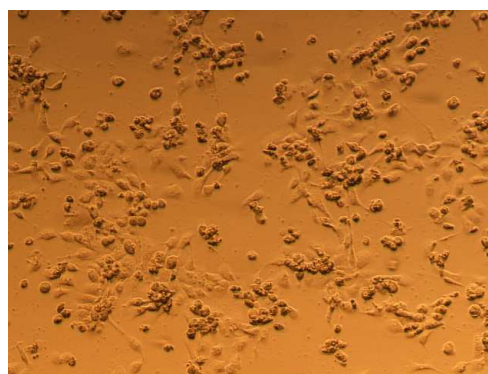
(a) DMSO 0,2%



(b) DMSO 1,6%



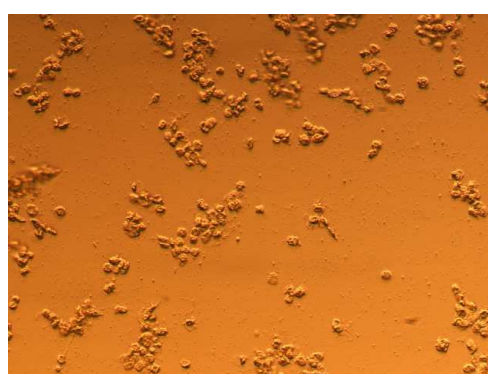
(c) betulina 5 µg/ml (11,3 µM);
DMSO 0,2%



(d) betulina 10 µg/ml (22,6 µM); DMSO
0,4%



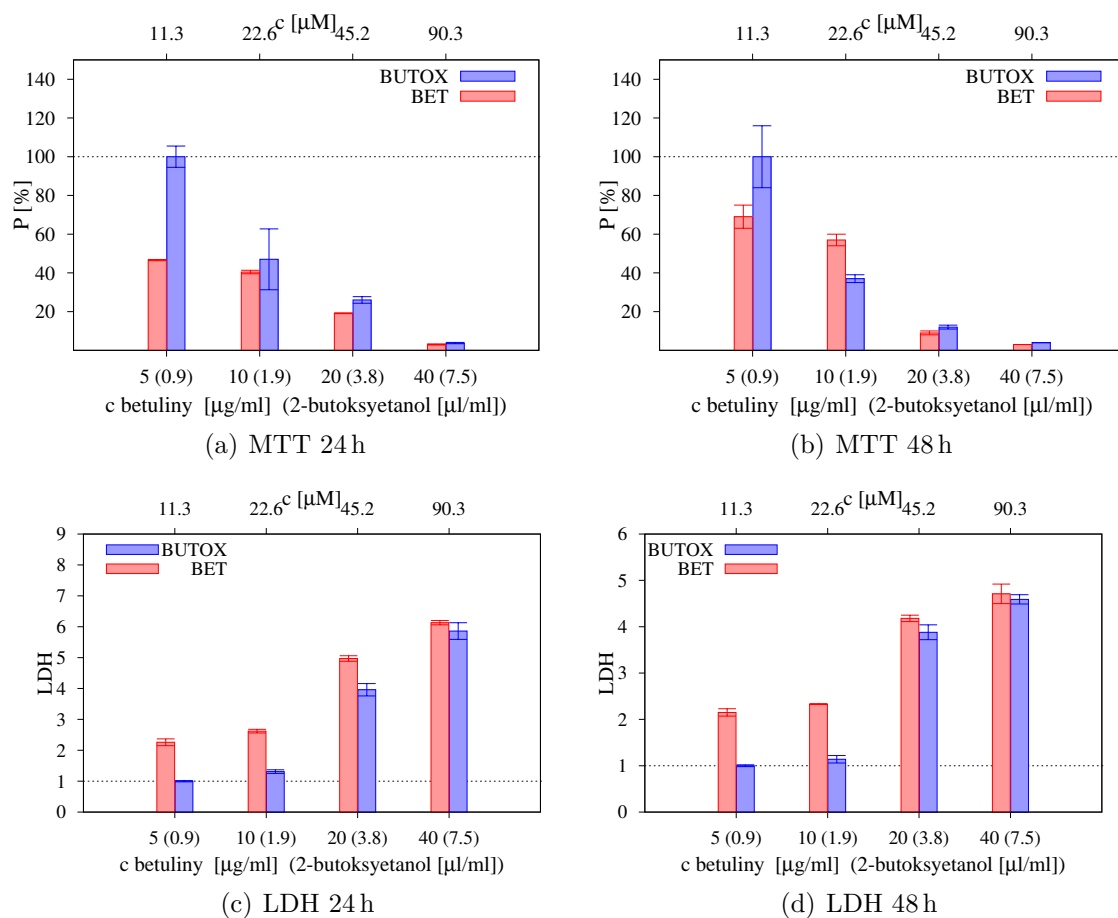
(e) betulina 20 µg/ml (45,2 µM); DMSO
0,8%



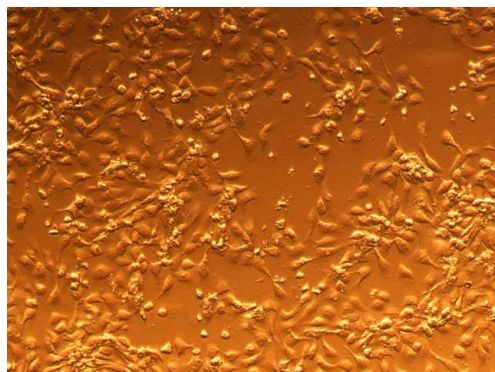
(f) betulina 40 µg/ml (90,3 µM); DMSO
1,6%

Rys. 10.4: Obraz mikroskopowy komórek linii NCI-H292 po podaniu samego DMSO w dwóch różnych stężeniach (a) i (b) oraz różnych stężeń betuliny (**BET**) w DMSO (c)–(f), po 24 h

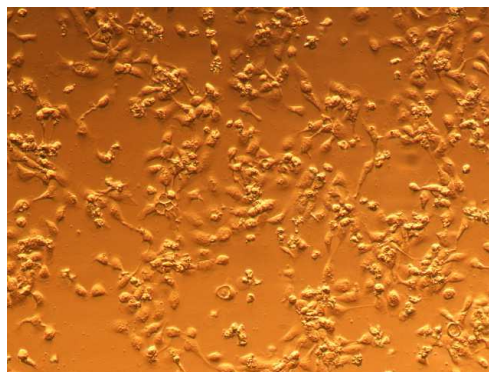
10.3. Cytotoksyczność betuliny i jej pochodnych



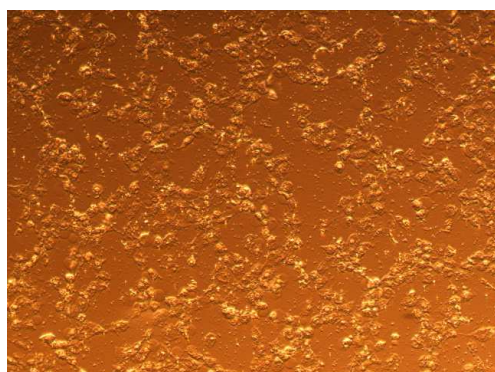
Rys. 10.5: Cytotoksyczność betuliny (**BET**) na komórki linii NCI-H292 w teście MTT po 24 h (a) i 48 h (b), oraz w teście LDH po 24 h (c) i 48 h (d); rozpuszczalnik 2-butoksyetanol (BUTOX)



(a) betulina 5 µg/ml (11,3 µM); 2-butoksyetanol 0,09%



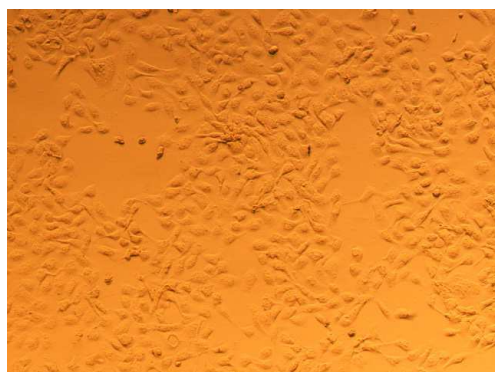
(b) betulina 10 µg/ml (22,6 µM); 2-butoksyetanol 0,19%



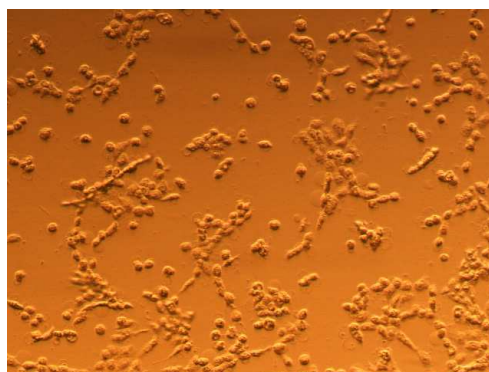
(c) betulina 20 µg/ml (45,2 µM); 2-butoksyetanol 0,38%



(d) 2-butoksyetanol 0,09%



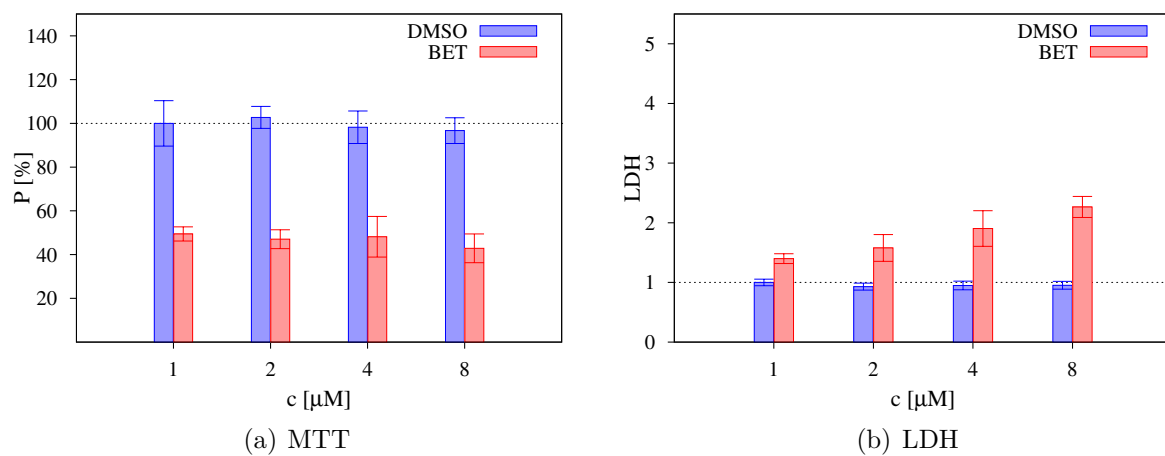
(e) 2-butoksyetanol 0,19%



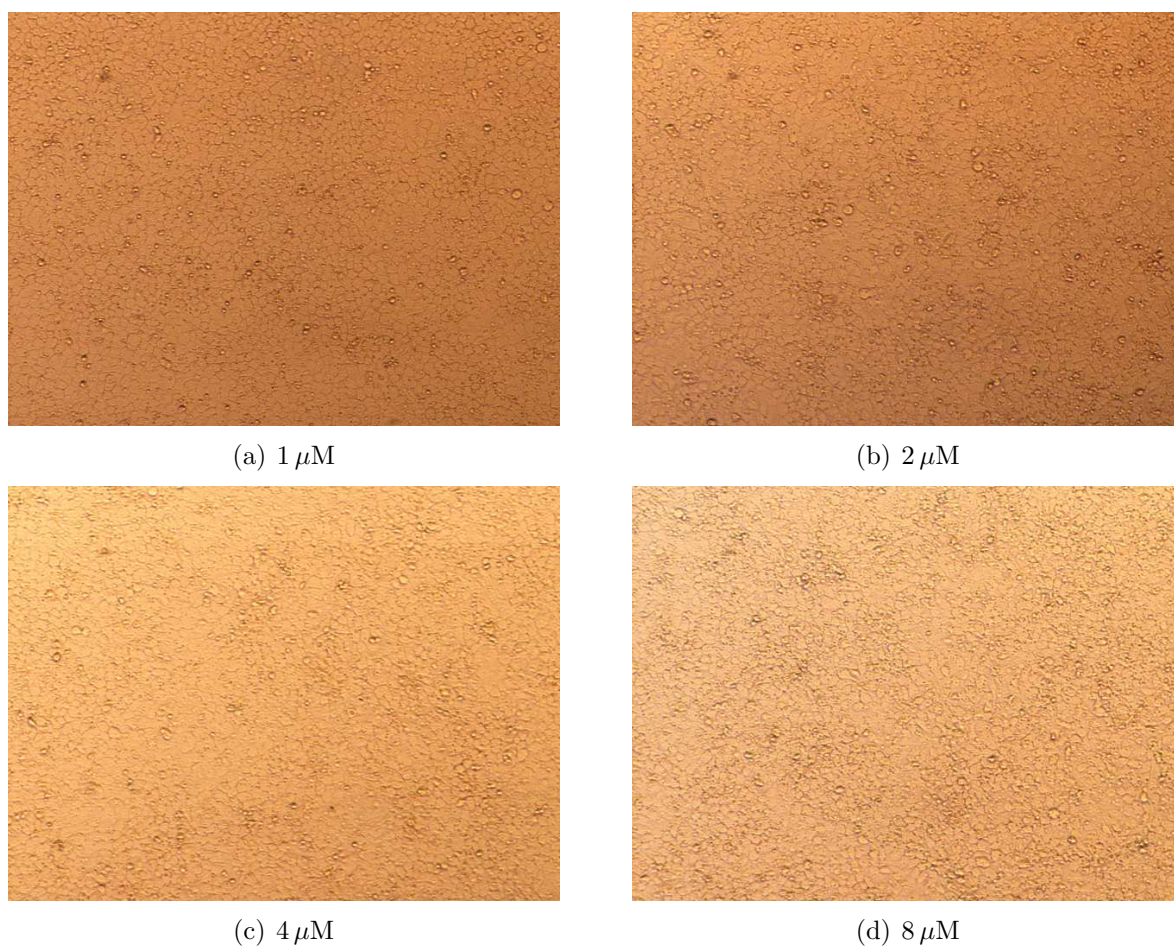
(f) 2-butoksyetanol 0,75%

Rys. 10.6: Obraz mikroskopowy komórek linii NCI-H292 po podaniu różnych stężeń betuliny (**BET**) w 2-butoksyetanolu (a–c) i samego rozpuszczalnika (d–f) po 24 h

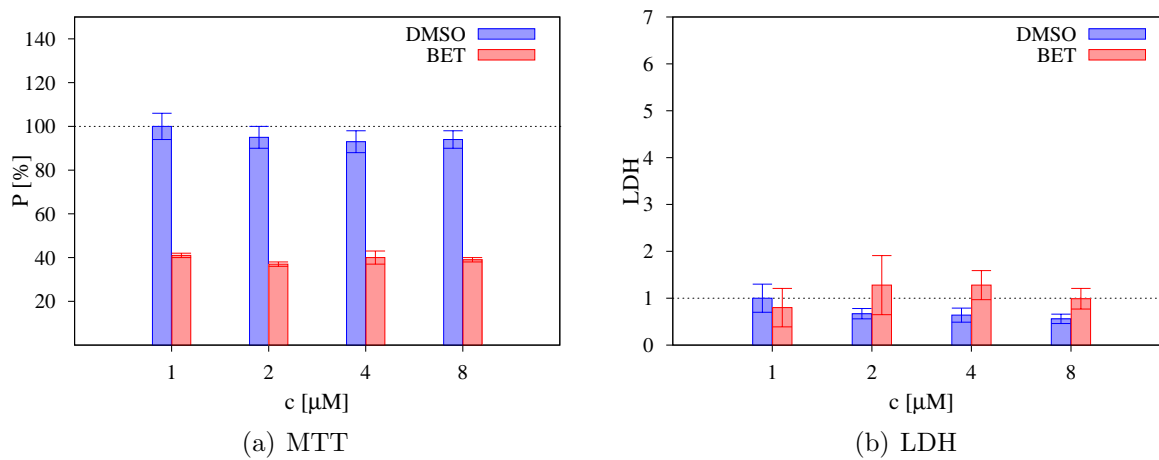
10.3. Cytotoksyczność betuliny i jej pochodnych



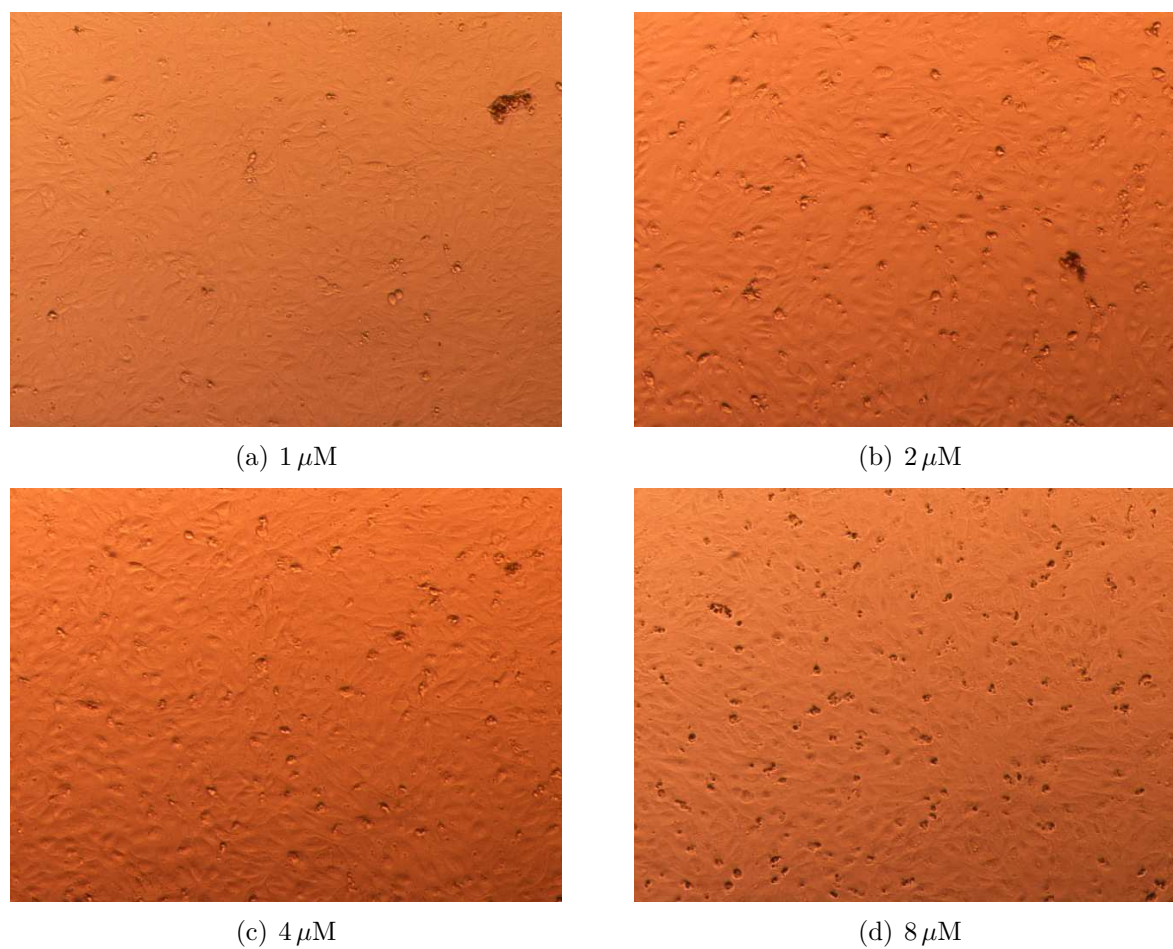
Rys. 10.7: Cytotoksyczność **BET** w teście MTT (a) i LDH (b) wobec komórek linii NCI-H292



Rys. 10.8: Obraz mikroskopowy komórek linii NCI-H292 po 24 h ekspozycji na betulinę (**BET**)

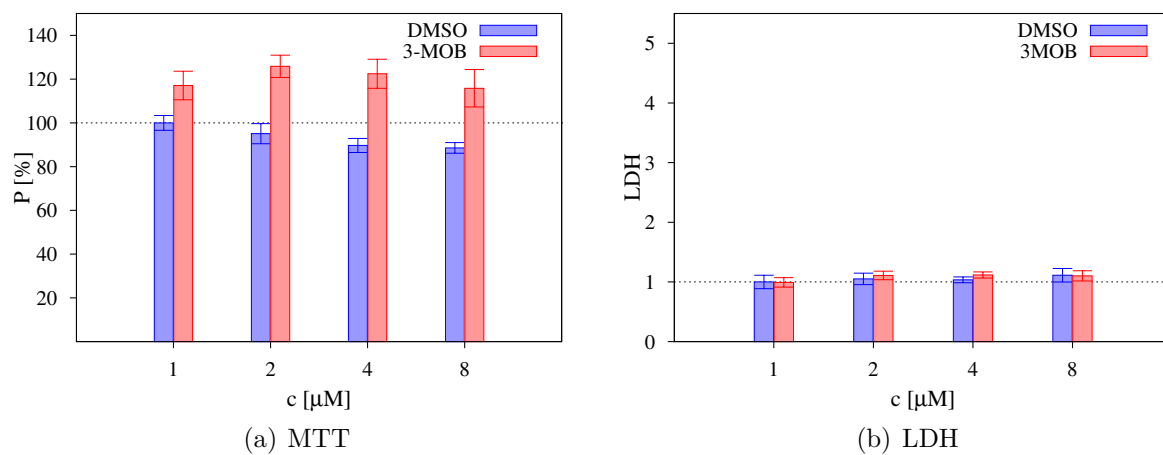


Rys. 10.9: Cytotoksyczność **BET** w teście MTT (a) i LDH (b) na komórki linii ARPE-19 po 24 h

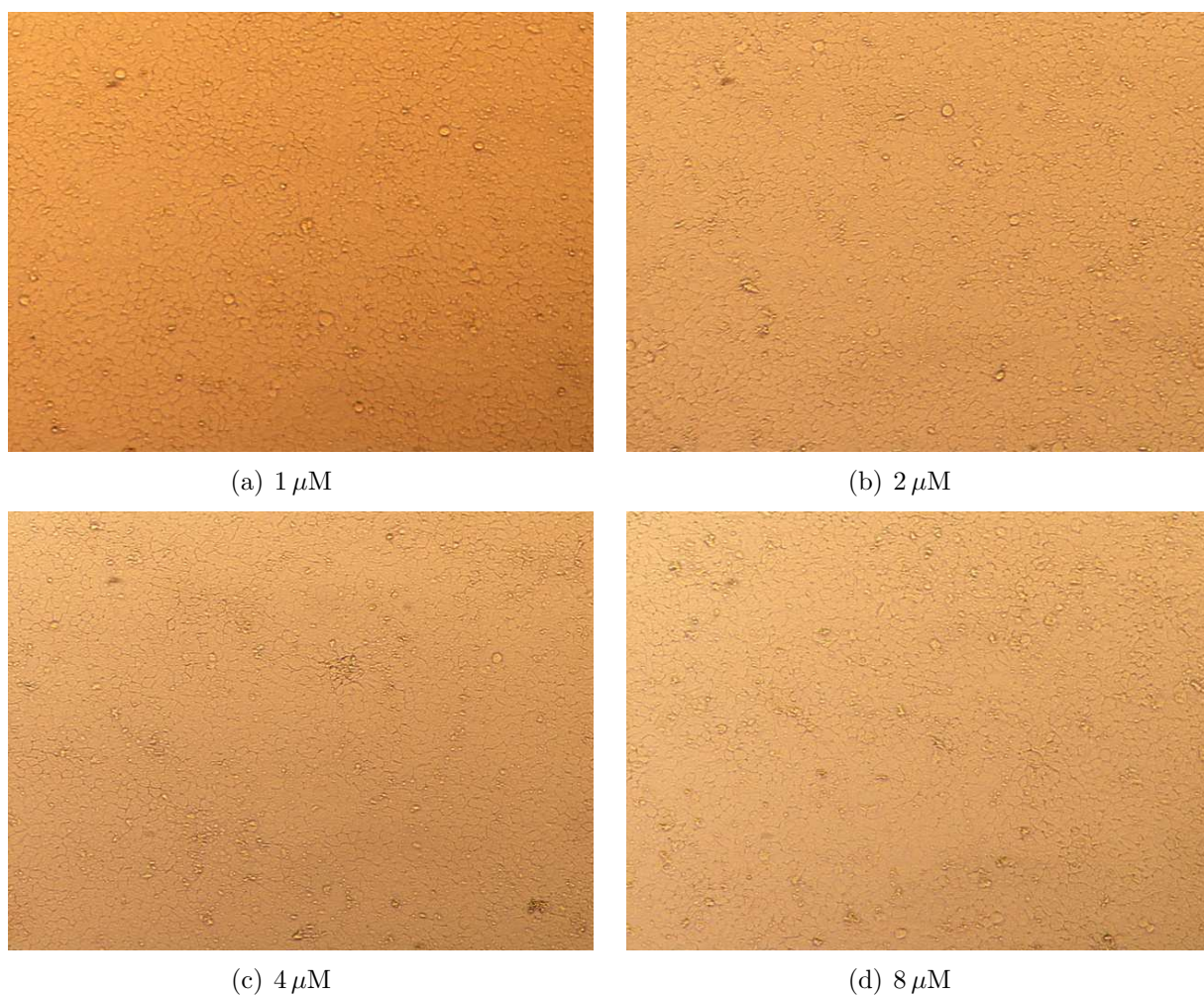


Rys. 10.10: Obraz mikroskopowy komórek linii ARPE-19 po 24 h ekspozycji na **BET**

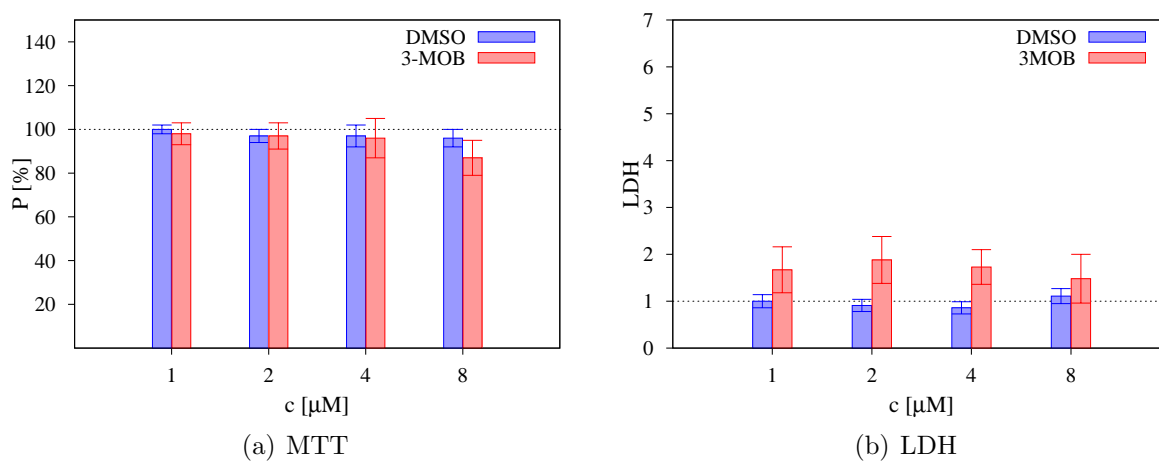
10.3. Cytotoksyczność betuliny i jej pochodnych



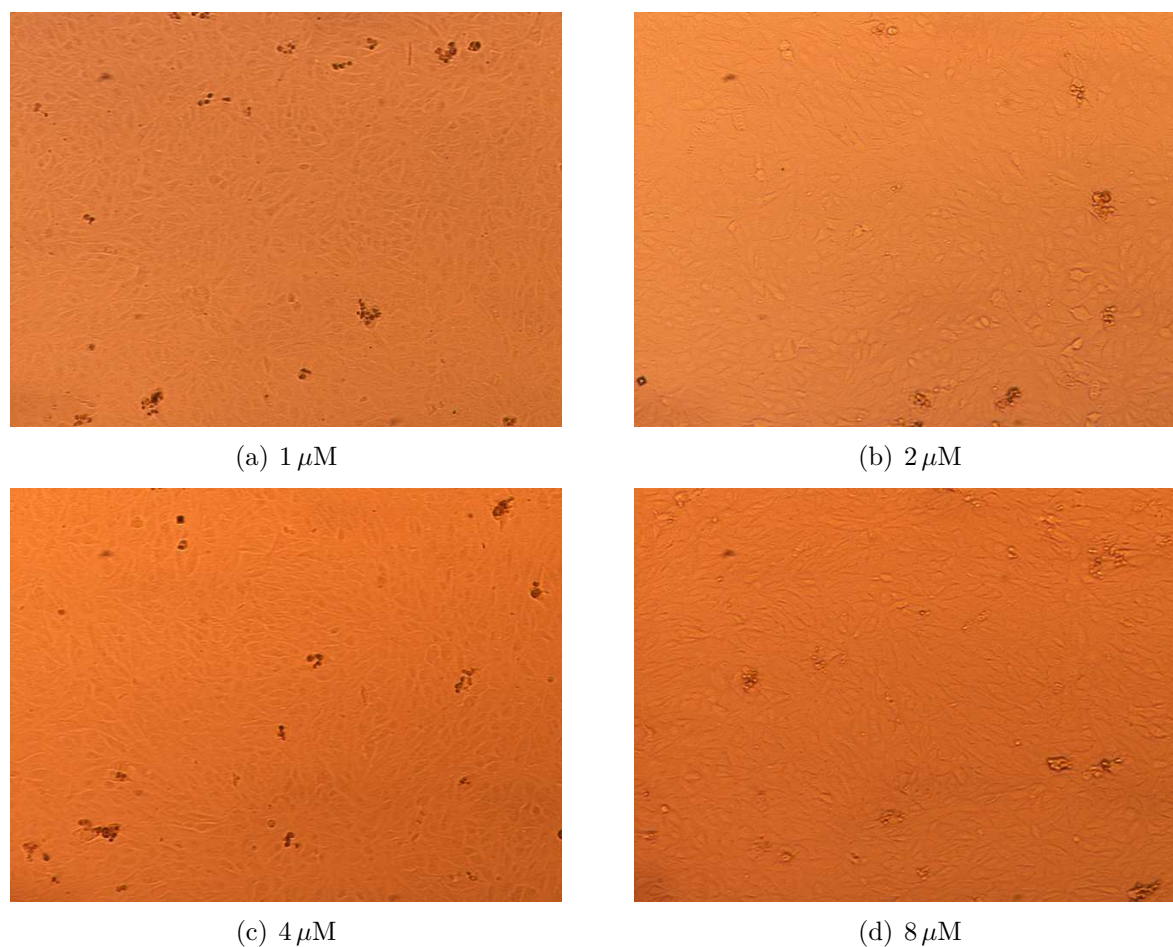
Rys. 10.11: Cytotoksyczność **3MOB** w teście MTT (a) i LDH (b) wobec komórek linii NCI-H292



Rys. 10.12: Obraz mikroskopowy komórek linii NCI-H292 po 24 h ekspozycji na **3MOB**

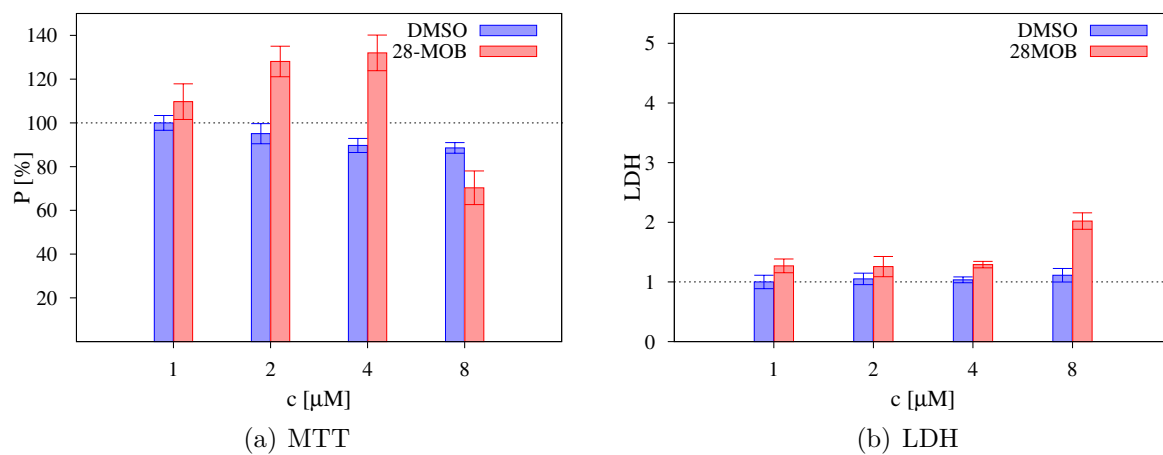


Rys. 10.13: Cytotoksyczność **3MOB** w teście MTT (a) i LDH (b) na komórki linii ARPE-19 po 24 h

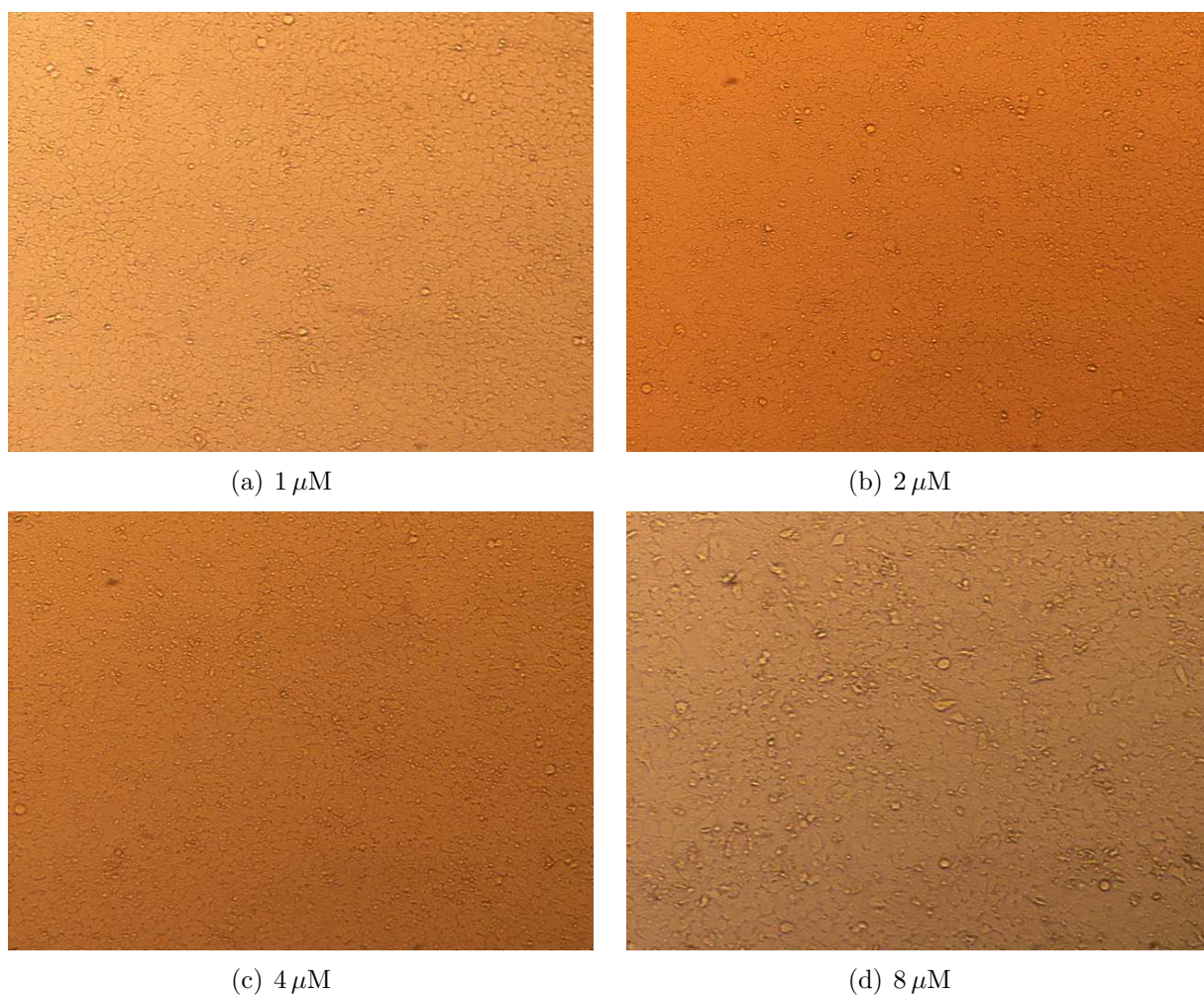


Rys. 10.14: Obraz mikroskopowy komórek linii ARPE-19 po 24 h ekspozycji na **3MOB**

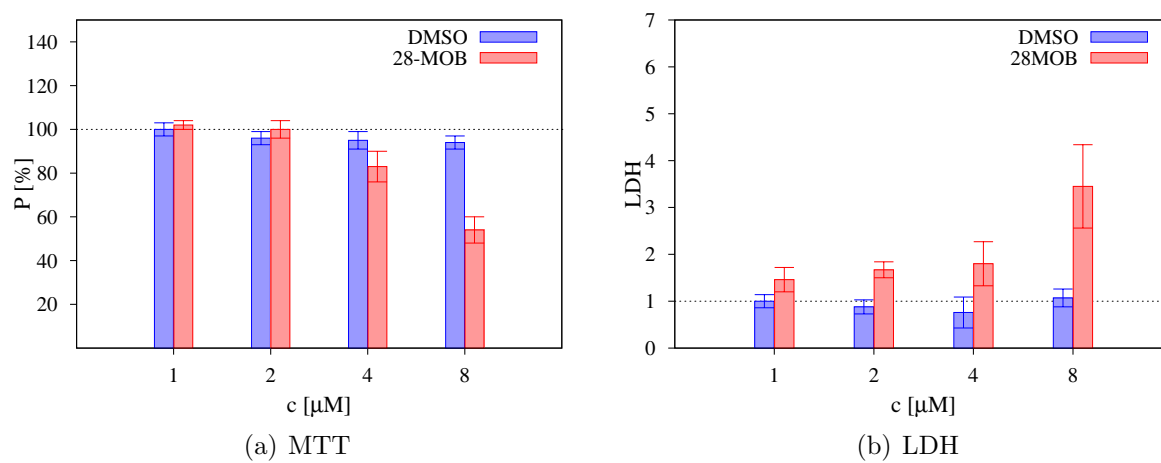
10.3. Cytotoksyczność betuliny i jej pochodnych



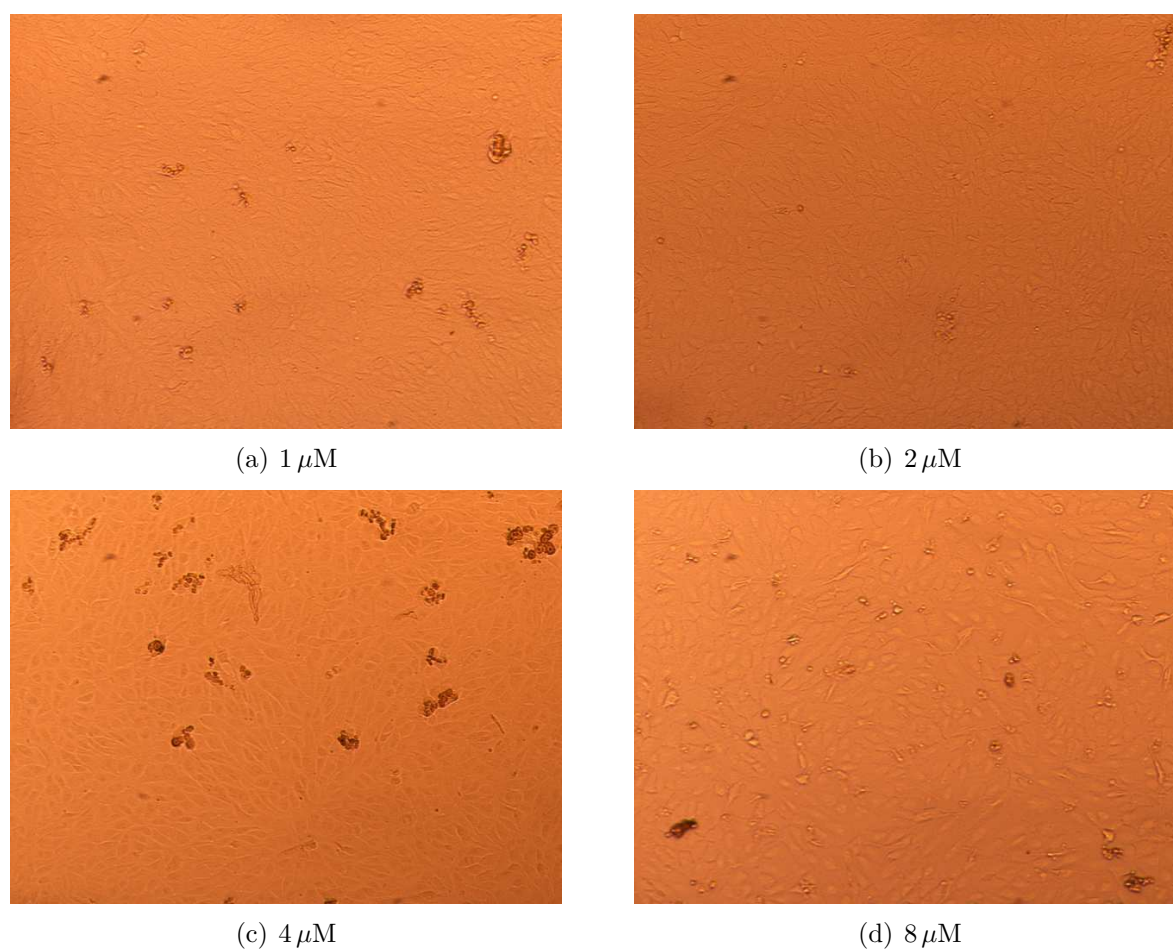
Rys. 10.15: Cytotoksyczność **28MOB** w teście MTT (a) i LDH (b) wobec komórek linii NCI-H292



Rys. 10.16: Obraz mikroskopowy komórek linii NCI-H292 po 24 h ekspozycji na **28MOB**

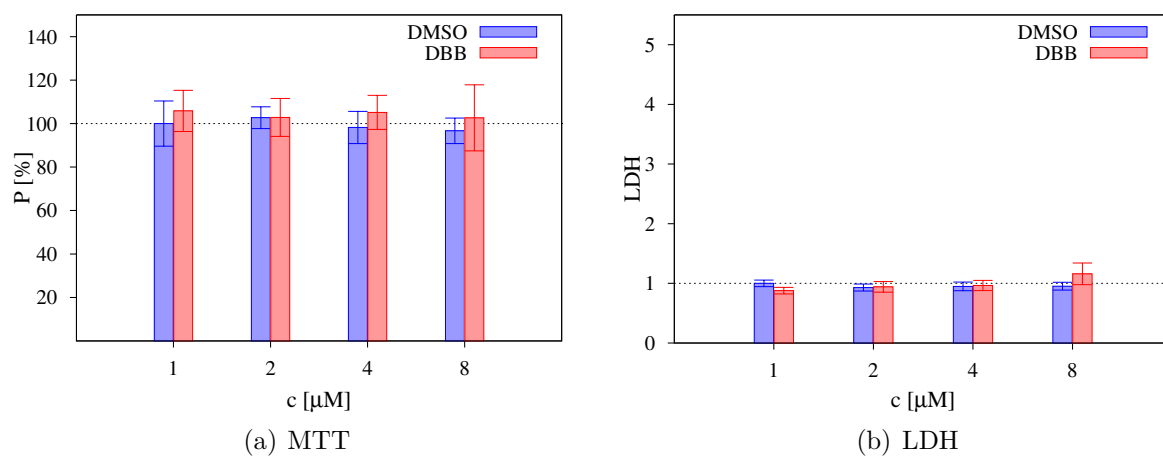


Rys. 10.17: Cytotoksyczność **28MOB** w teście MTT (a) i LDH (b) na komórki linii ARPE-19 po 24 h

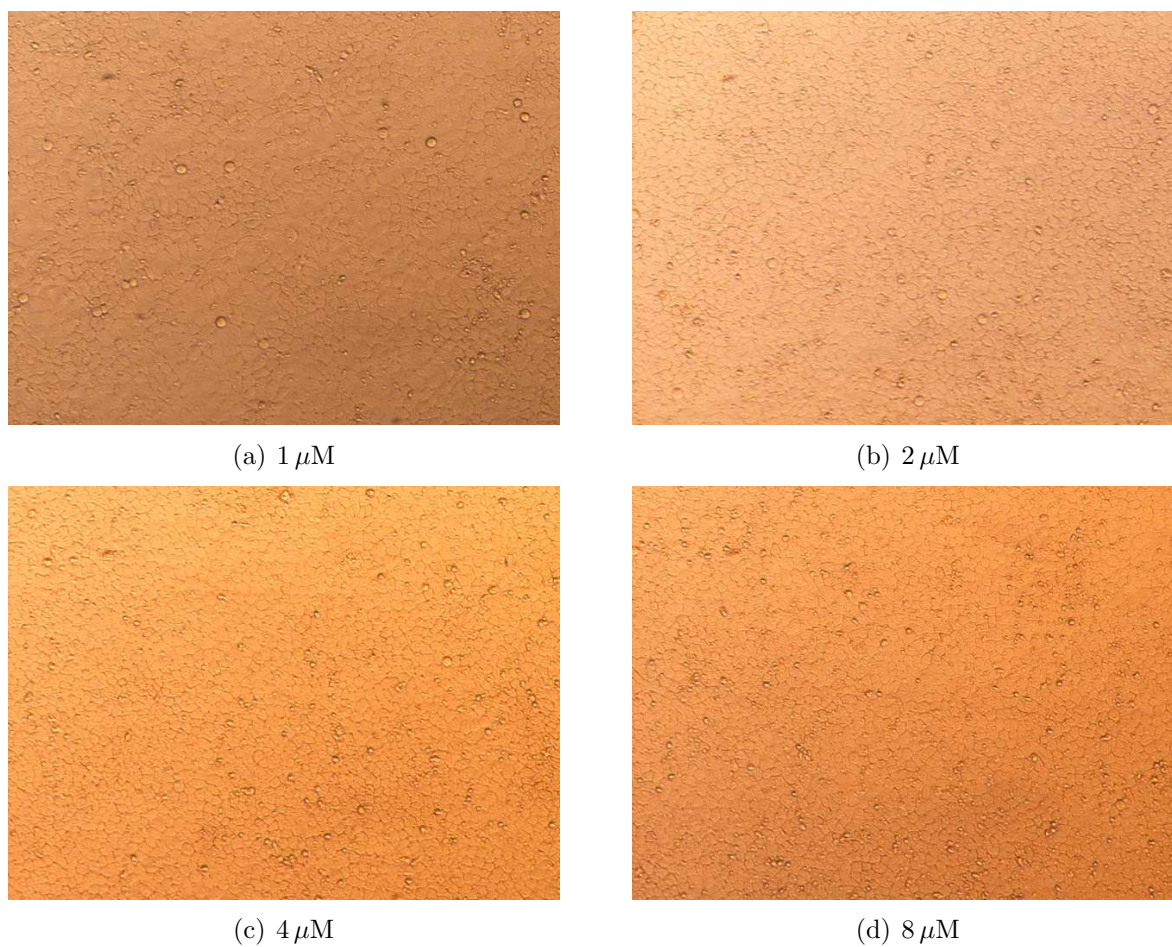


Rys. 10.18: Obraz mikroskopowy komórek linii ARPE-19 po 24 h ekspozycji na **28MOB**

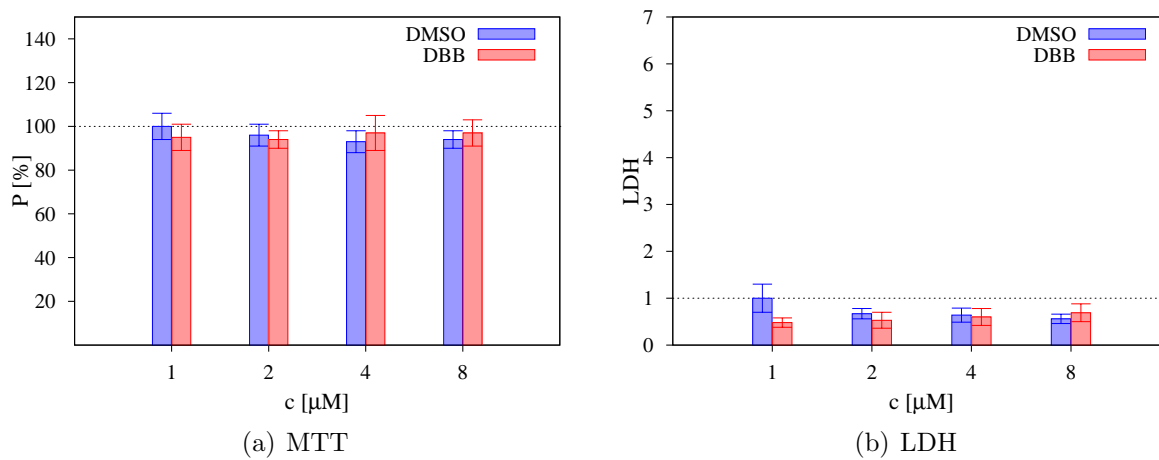
10.3. Cytotoksyczność betuliny i jej pochodnych



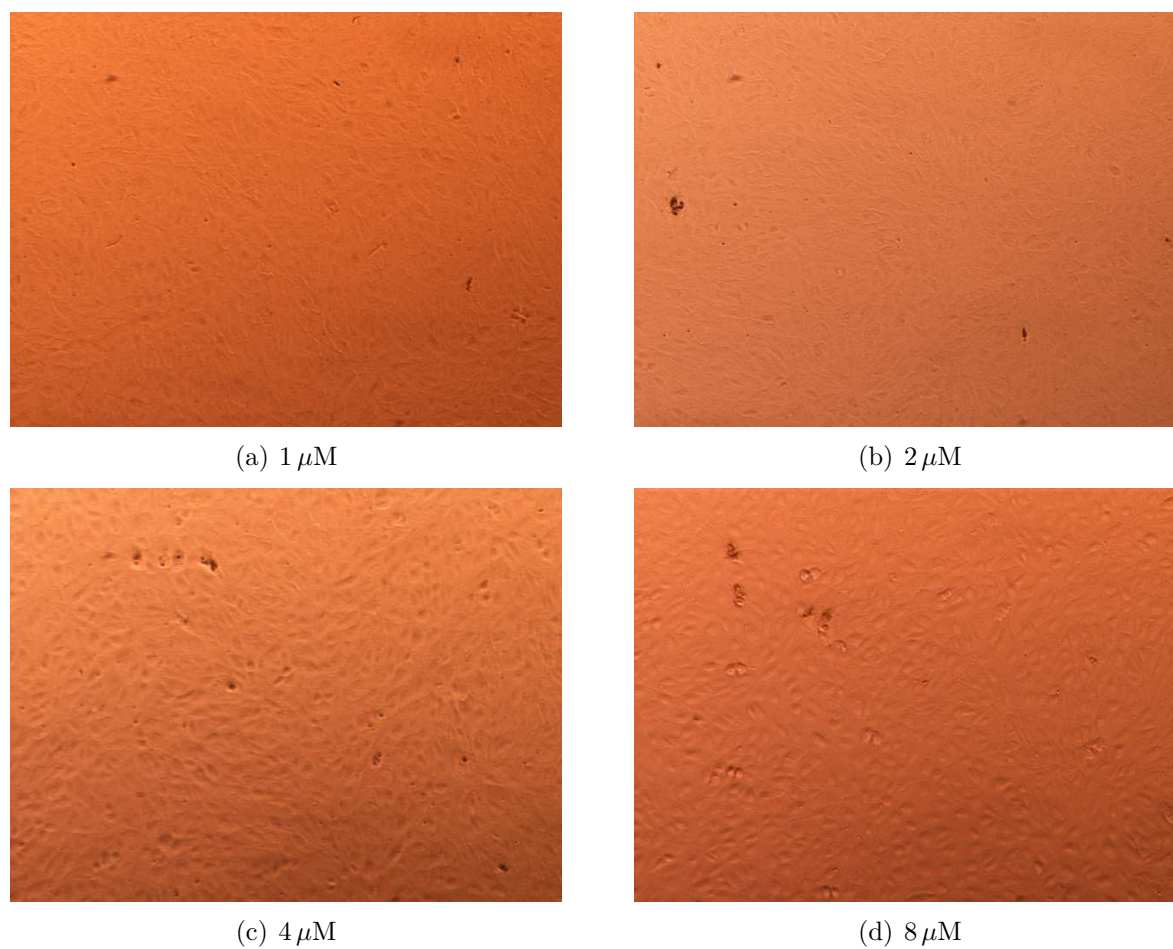
Rys. 10.19: Cytotoksyczność **DBB** w teście MTT (a) i LDH (b) wobec komórek linii NCI-H292



Rys. 10.20: Obraz mikroskopowy komórek linii NCI-H292 po 24 h ekspozycji na **DBB**

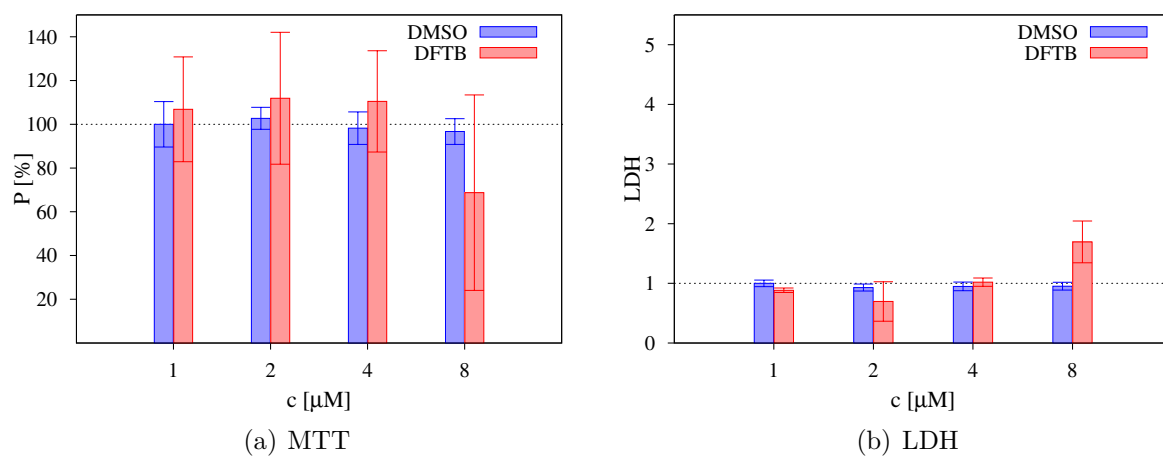


Rys. 10.21: Cytotoksyczność **DBB** w teście MTT (a) i LDH (b) na komórki linii ARPE-19 po 24 h

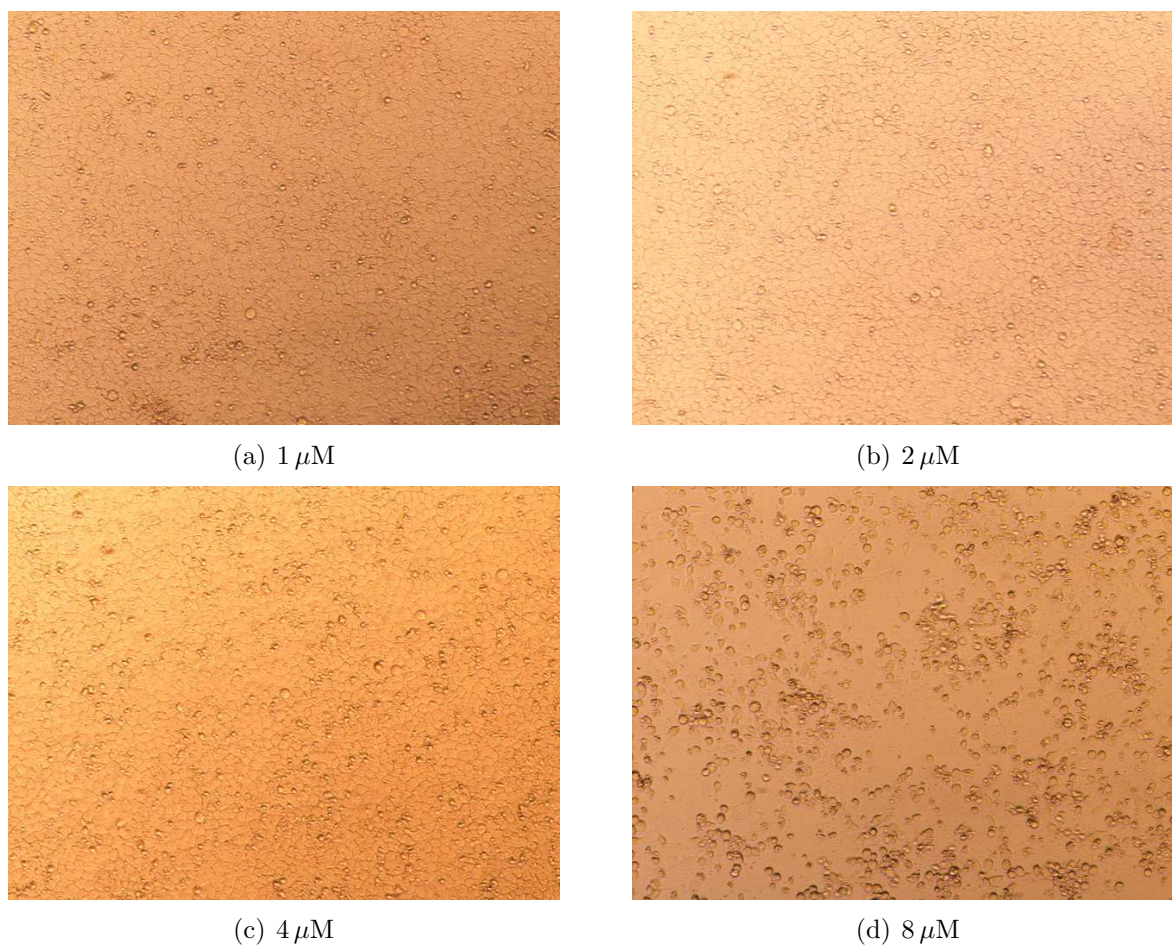


Rys. 10.22: Obraz mikroskopowy komórek linii ARPE-19 po 24 h ekspozycji na **DBB**

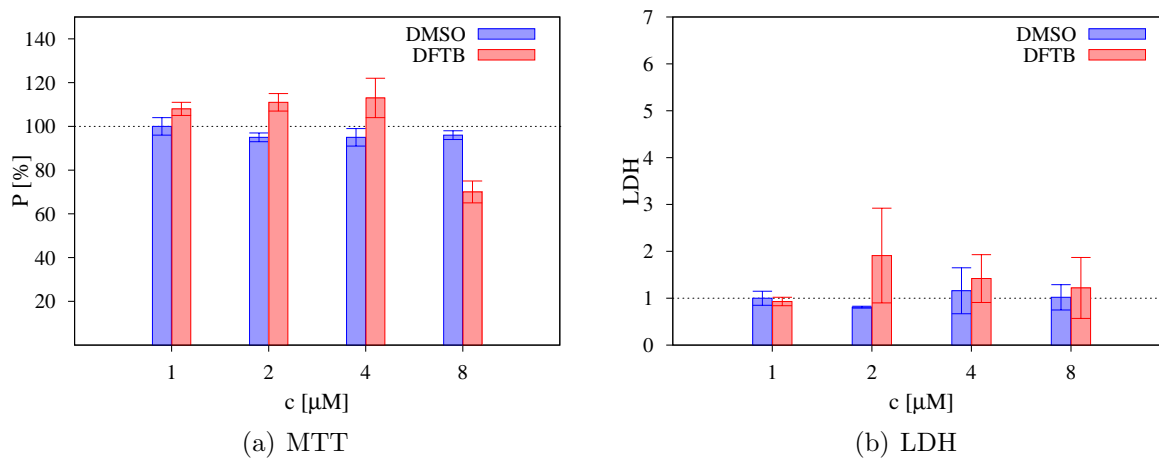
10.3. Cytotoksyczność betuliny i jej pochodnych



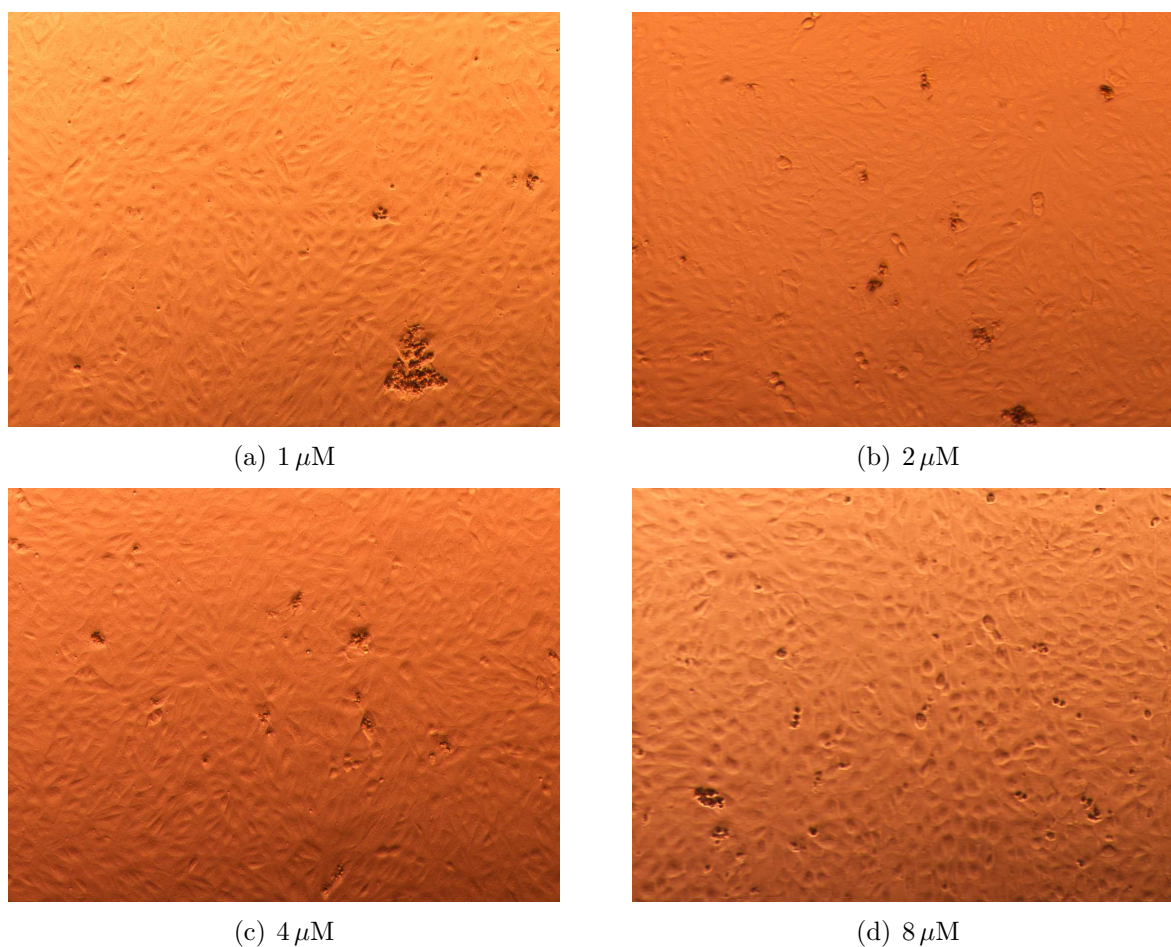
Rys. 10.23: Cytotoksyczność **DFTB** w teście MTT (a) i LDH (b) wobec komórek linii NCI-H292



Rys. 10.24: Obraz mikroskopowy komórek linii NCI-H292 po 24 h ekspozycji na **DFTB**

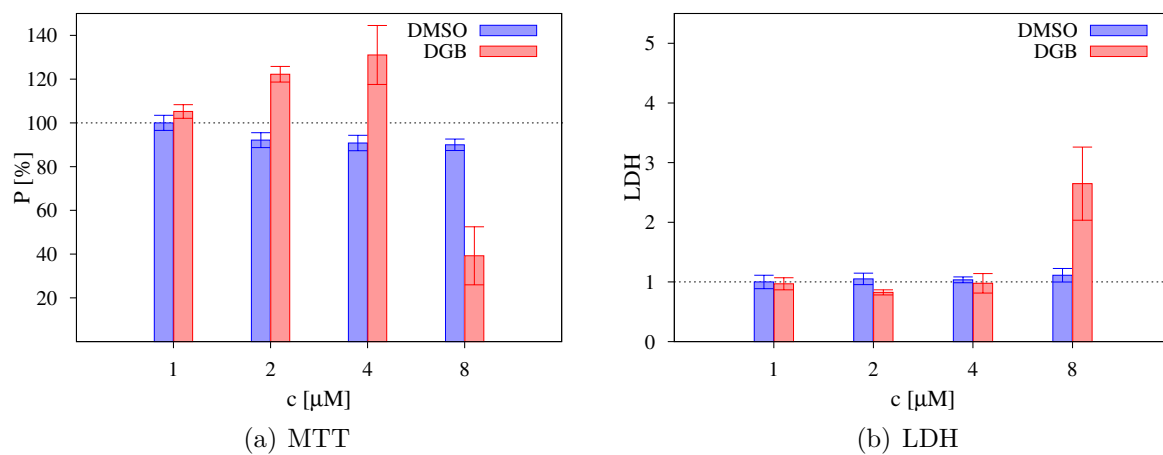


Rys. 10.25: Cytotoksyczność **DFTB** w teście MTT (a) i LDH (b) na komórki linii ARPE-19 po 24 h

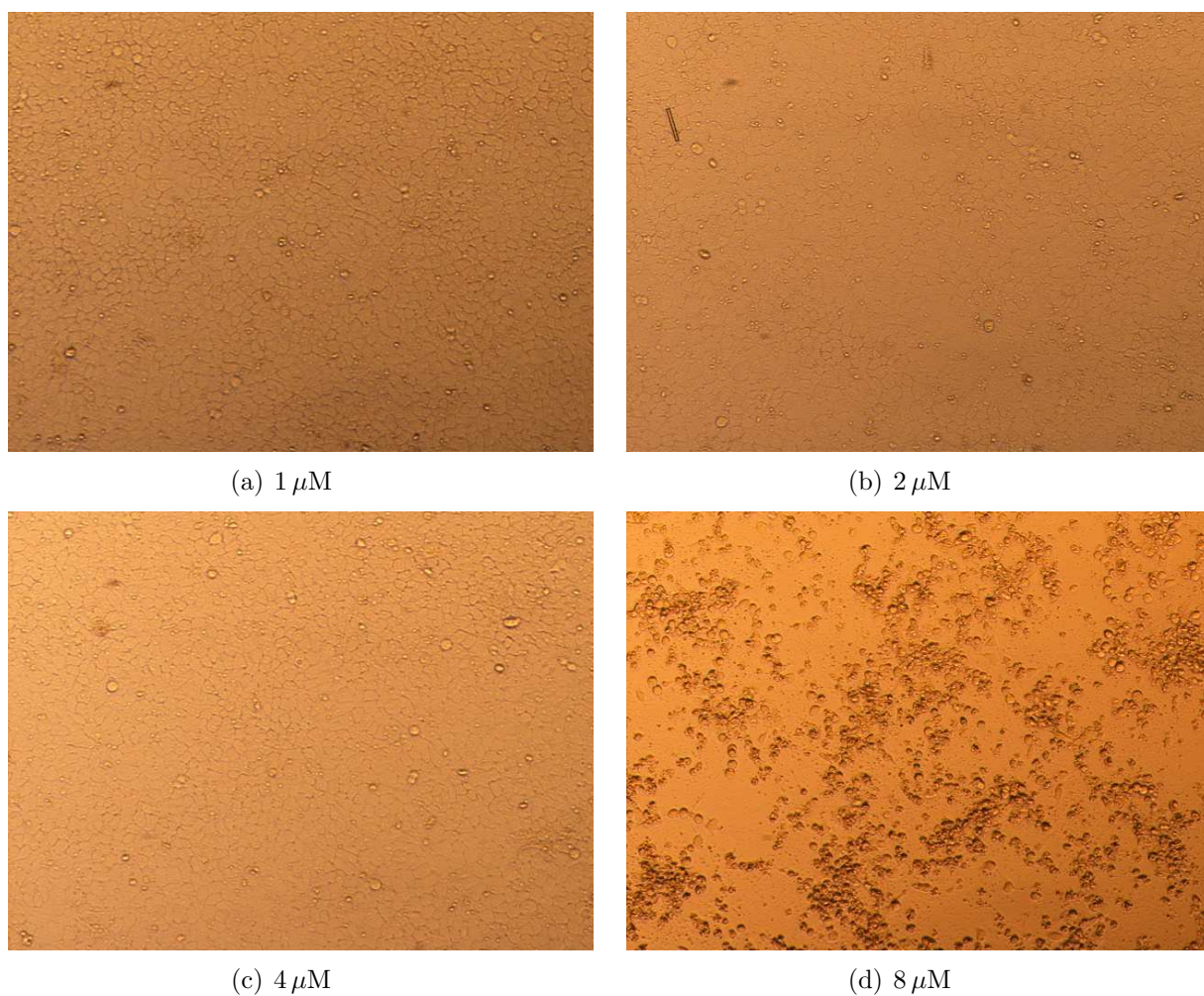


Rys. 10.26: Obraz mikroskopowy komórek linii ARPE-19 po 24 h ekspozycji na **DFTB**

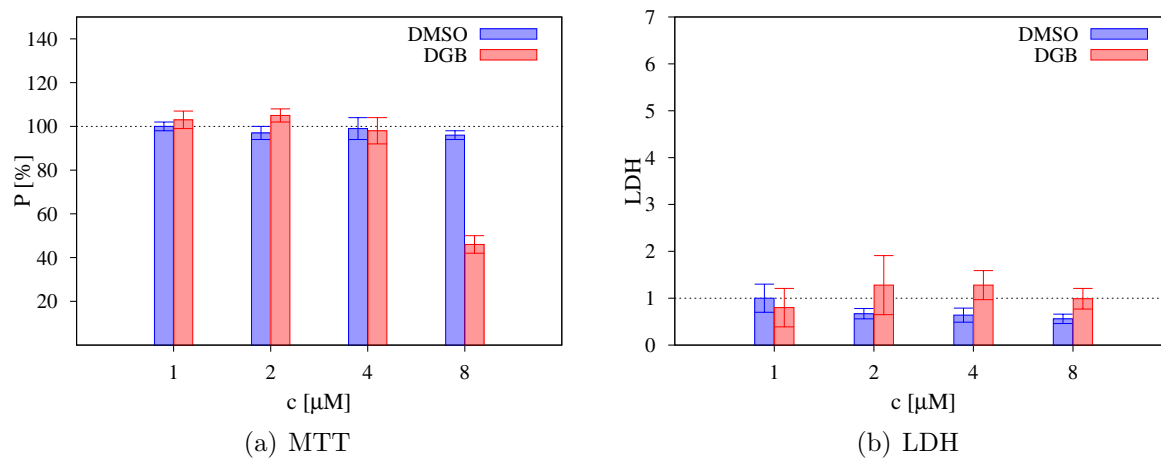
10.3. Cytotoksyczność betuliny i jej pochodnych



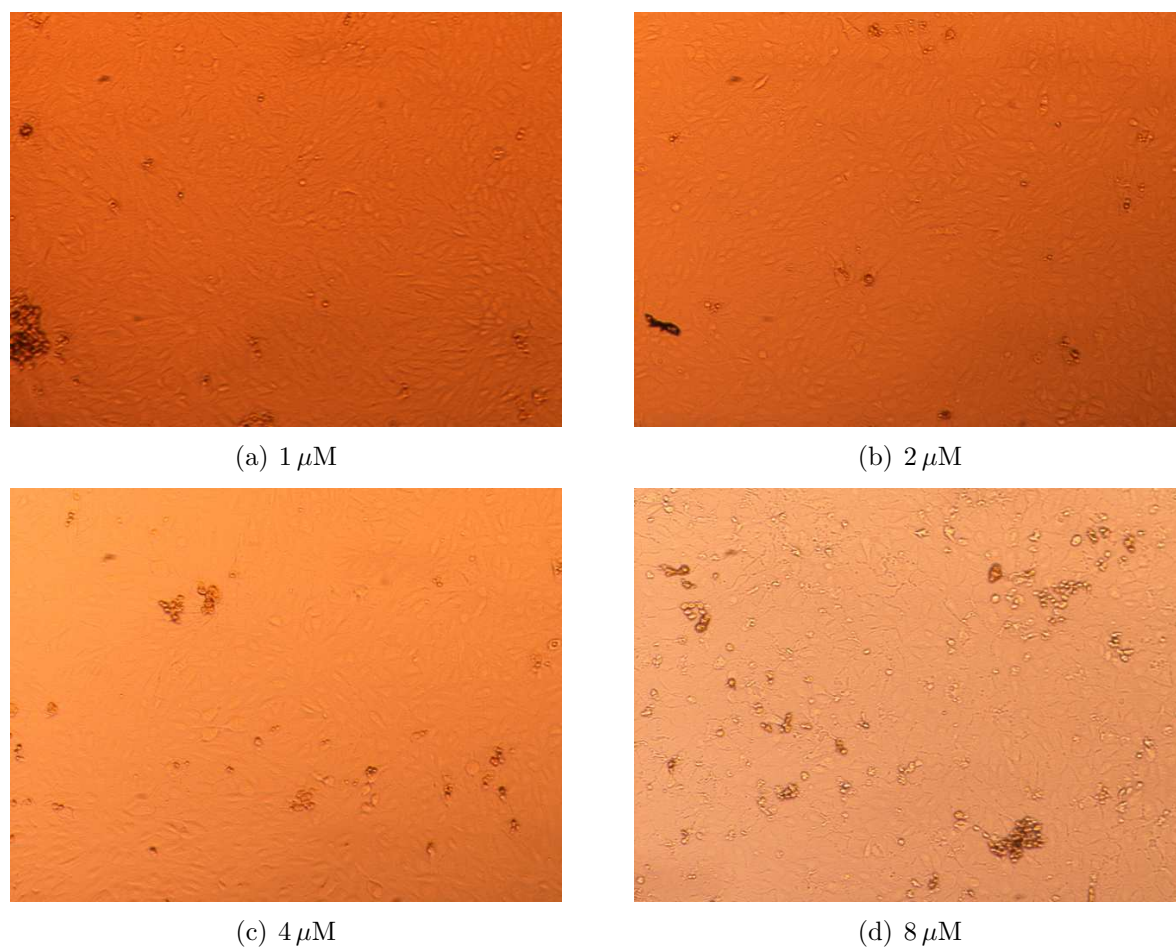
Rys. 10.27: Cytotoksyczność **DGB** w teście MTT (a) i LDH (b) wobec komórek linii NCI-H292



Rys. 10.28: Obraz mikroskopowy komórek linii NCI-H292 po 24 h ekspozycji na **DGB**

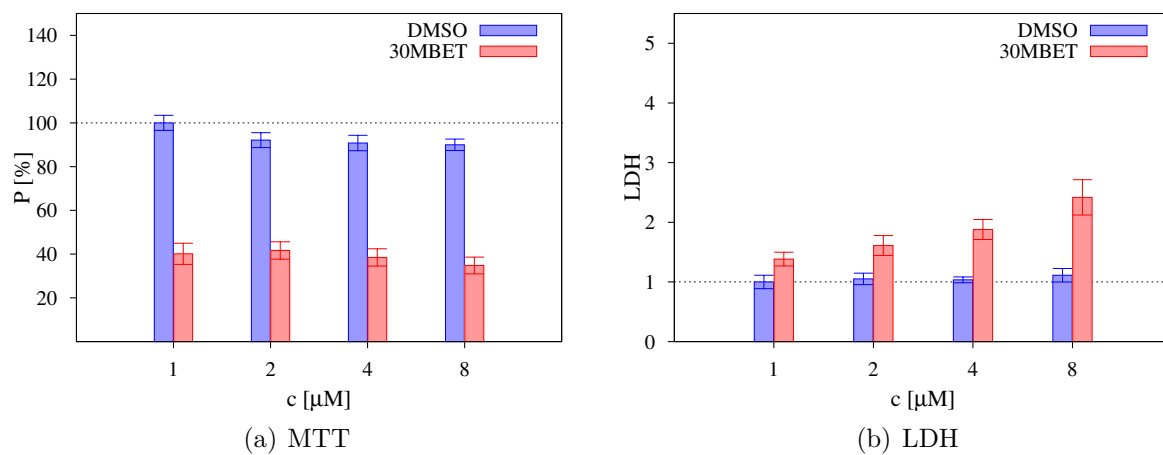


Rys. 10.29: Cytotoksyczność **DGB** w teście MTT (a) i LDH (b) na komórki linii ARPE-19 po 24 h

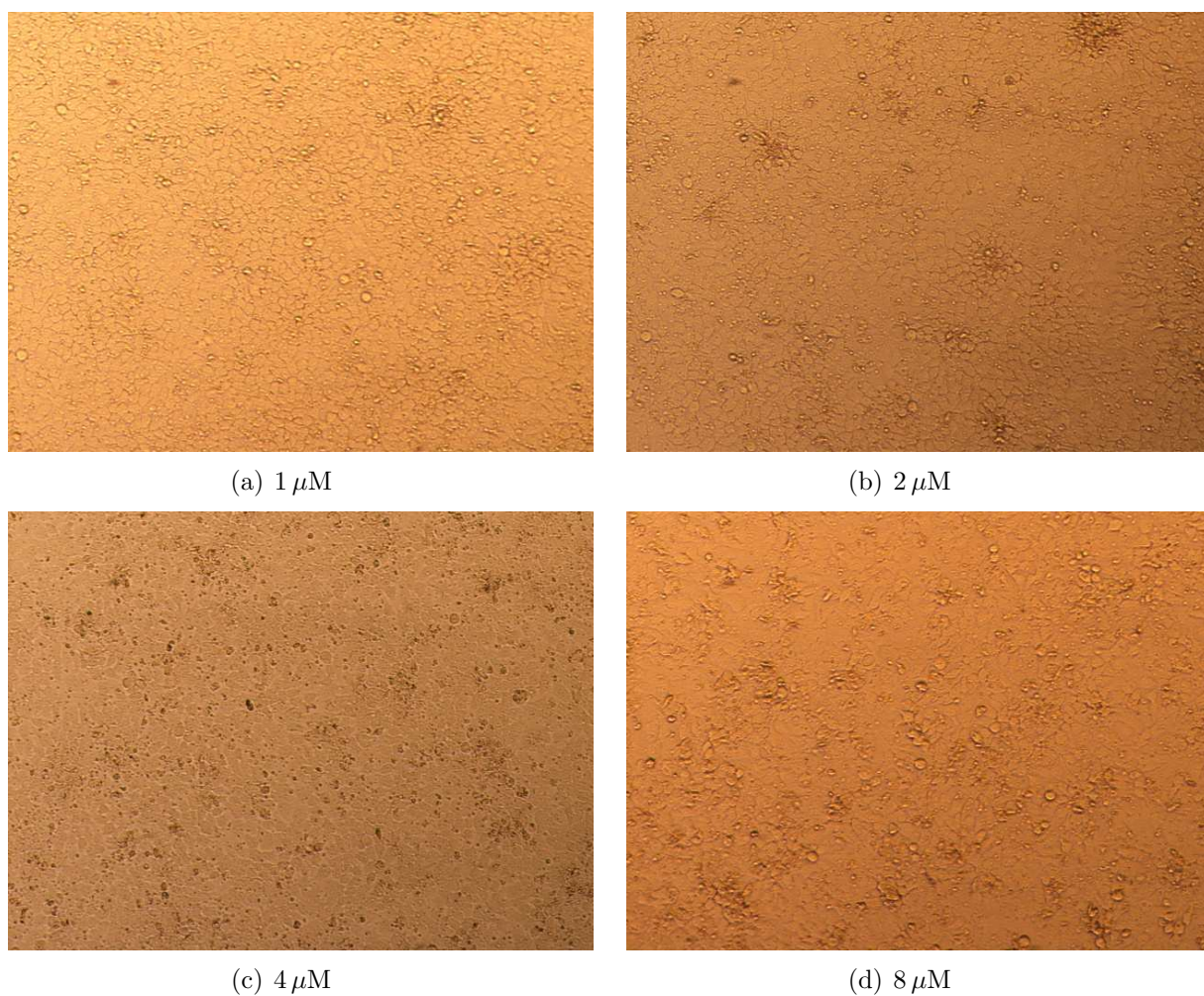


Rys. 10.30: Obraz mikroskopowy komórek linii ARPE-19 po 24 h ekspozycji na **DGB**

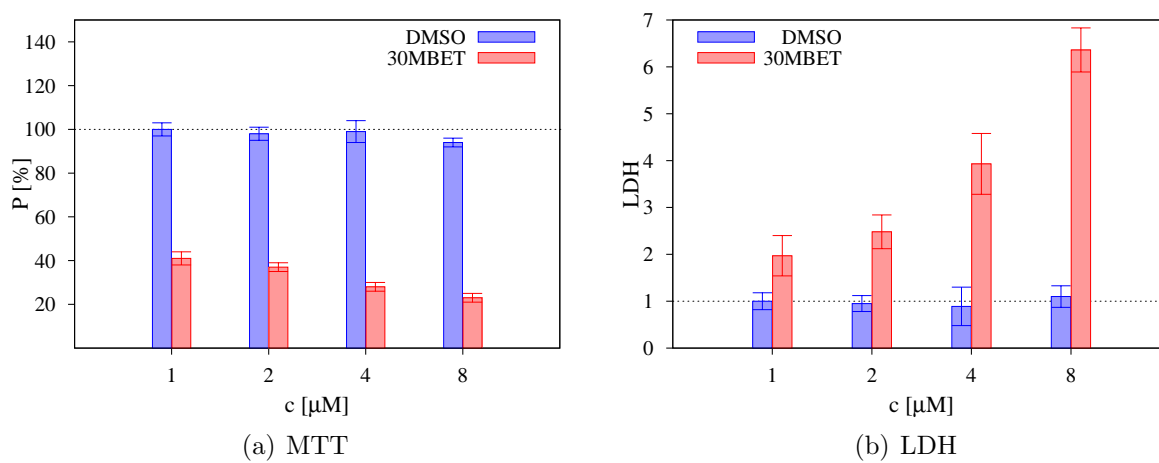
10.3. Cytotoksyczność betuliny i jej pochodnych



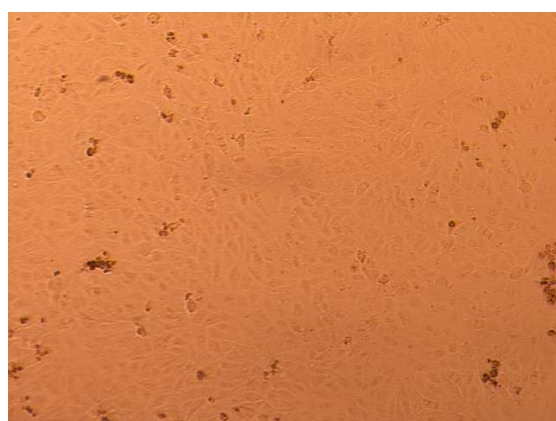
Rys. 10.31: Cytotoksyczność **30MBET** w teście MTT (a) i LDH (b) wobec komórek linii NCI-H292



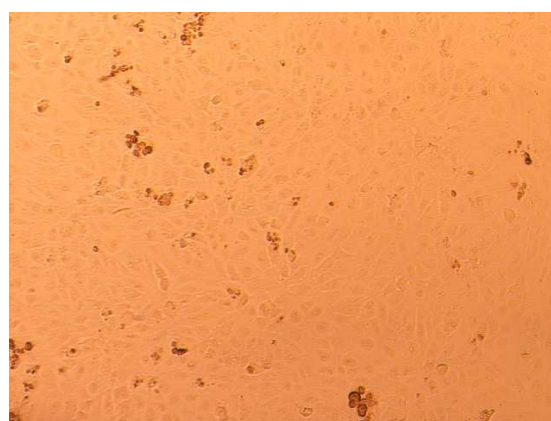
Rys. 10.32: Obraz mikroskopowy komórek linii NCI-H292 po 24 h ekspozycji na **30MBET**



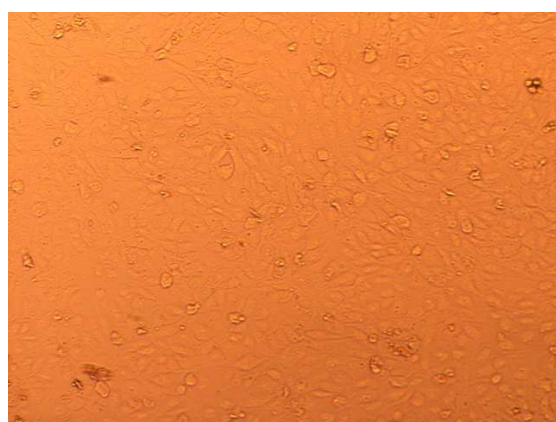
Rys. 10.33: Cytotoksyczność **30MBET** w teście MTT (a) i LDH (b) na komórki linii ARPE-19 po 24 h



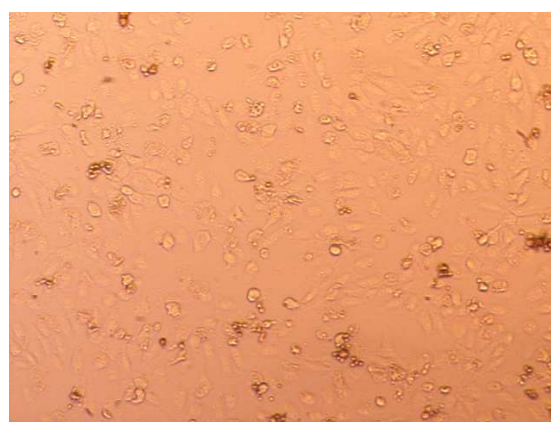
(a) 1 µM



(b) 2 µM



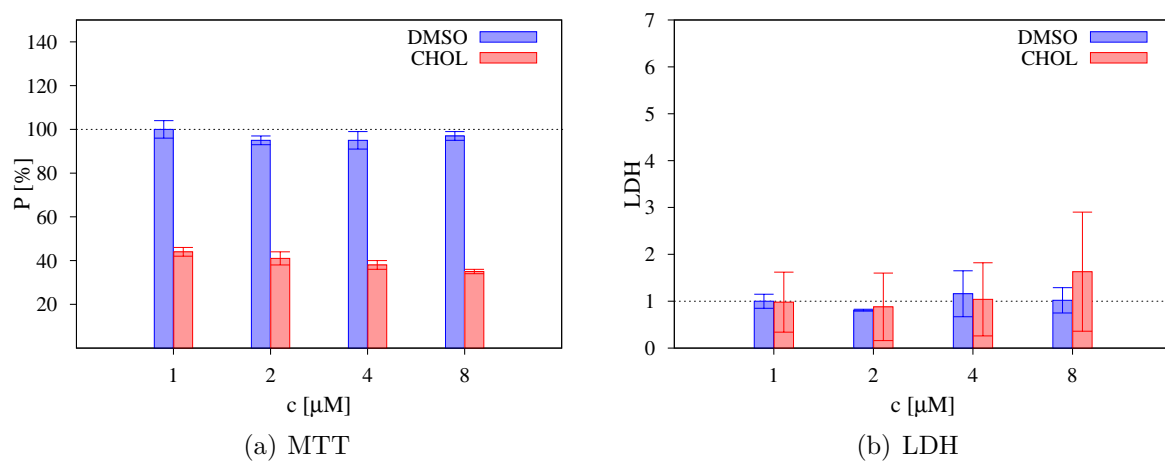
(c) 4 µM



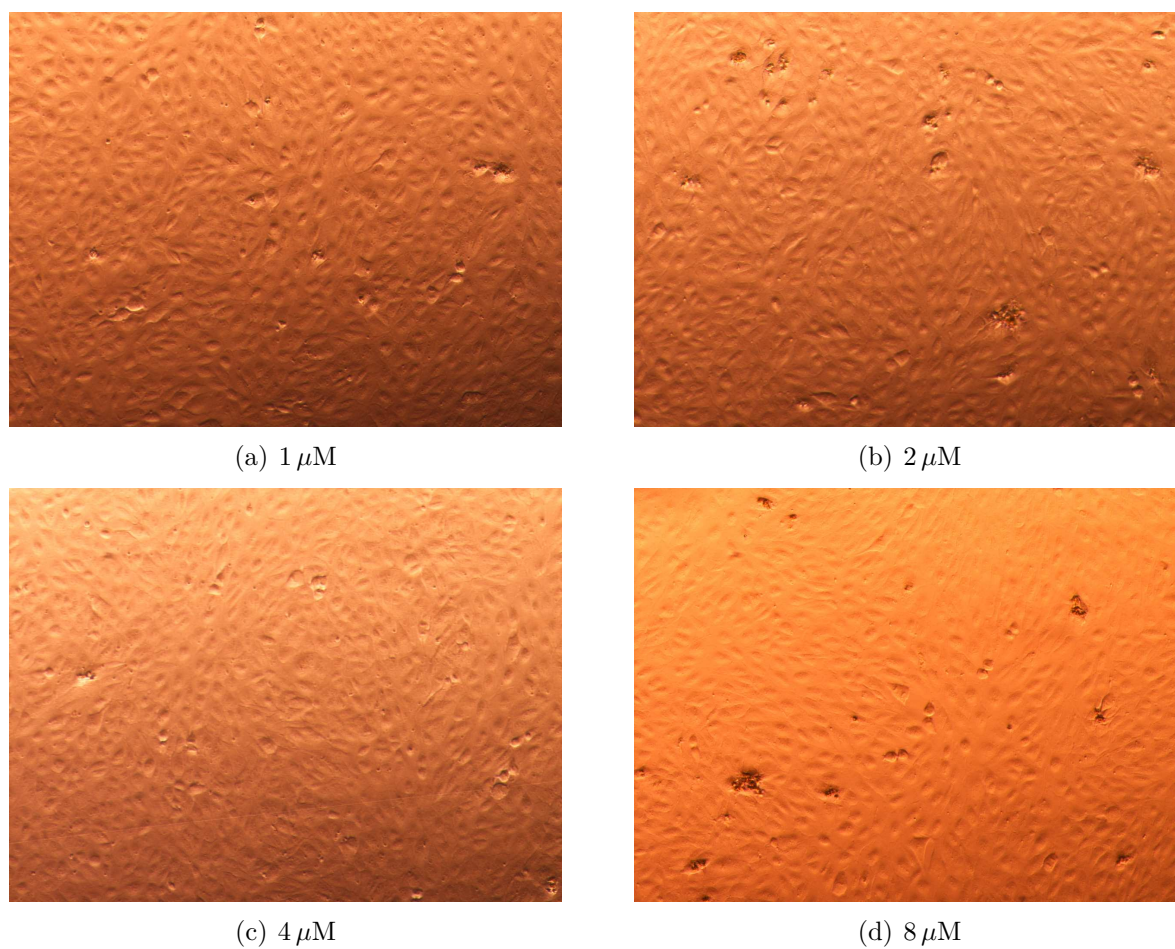
(d) 8 µM

Rys. 10.34: Obraz mikroskopowy komórek linii ARPE-19 po 24 h ekspozycji na **30MBET**

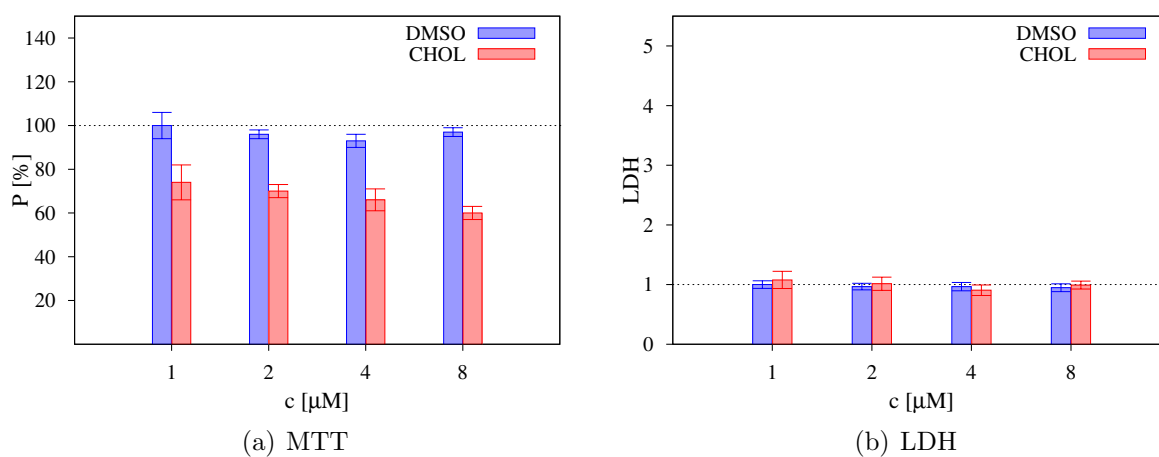
10.3. Cytotoksyczność betuliny i jej pochodnych



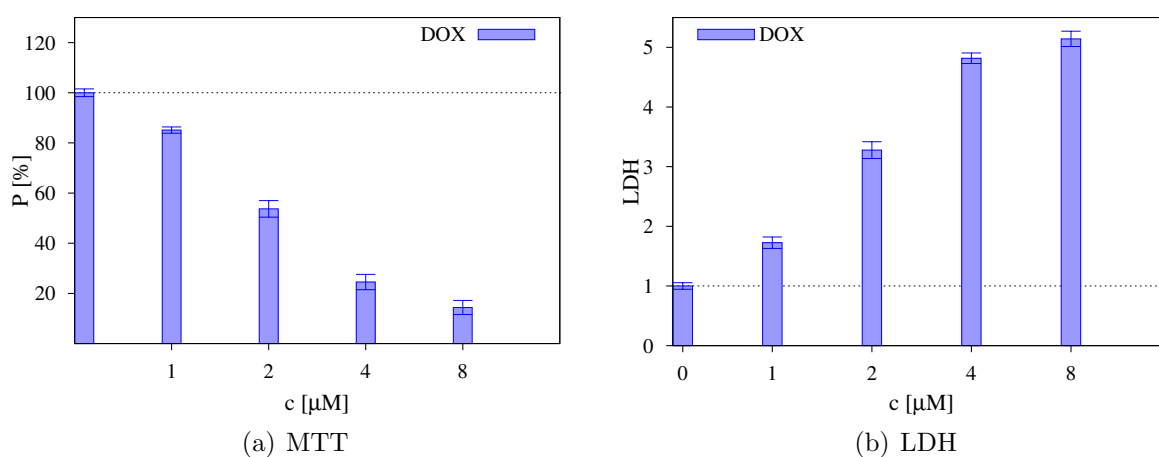
Rys. 10.35: Cytotoksyczność **CHOL** w teście MTT (a) i LDH (b) na komórki linii ARPE-19 po 24 h



Rys. 10.36: Obraz mikroskopowy komórek linii ARPE-19 po 24 h ekspozycji na **CHOL**



Rys. 10.37: Cytotoksyczność **CHOL** w teście MTT (a) i LDH (b) wobec komórek linii NCI-H292



Rys. 10.38: Cytotoksyczność **DOX** w teście MTT (a) i LDH (b) na komórki linii NCI-H292 po 24 h

10.3.2 Oznaczenia cytotoksyczności na komórkach zwierzęcych: B16, XC i 3T3 w teście TB

Badanie testem błękitu trypanu (TB) pozwala na bezpośrednie określenie cytotoksyczności związków różnicując komórki na zabarwione (martwe) i niezabarwione (żywe). Metoda ta była powtarzalna. Przy dużych ilościach oznaczeń dogodniejsze byłoby stosowanie technik automatyzujących analizę obrazu a nie bezpośrednie zliczanie komórek pod mikroskopem.

Zależność cytotoksyczności od stężeń badanych związków przedstawiono na wykresach 10.39–10.42 (str. 142–145). Z odcinków prostoliniowych metodą graficzną oszacowano wartości EC_{50} , które podano w tabeli 10.4.

Zarówno surowy ekstrakt heksanowy jak i dichlorometanowy z kory brzozy *Betula verrucosa* Ehrh, wykazują zbliżony efekt cytotoksyczny na komórki badanych linii. Cytotoksyczność tych ekstraktów była jednocześnie około dwukrotnie niższa niż głównego ich składnika — betuliny (tab. 10.4). W przeliczeniu na betulinę wartości mikromolarne EC_{50} różnią się jeszcze bardziej i wynoszą dla komórek linii B16: $6,32 \pm 0,45$ (ekstrakt heksanowy) i $5,20 \pm 0,45$ (dichlorometanowy), oraz $10,84 \pm 0,45$ dla komórek XC (w obu przypadkach). Zarówno ekstrakty, jak i wyizolowane czyste (główne) składniki — **BET** i **LUP** — nie wykazują działania cytotoksycznego na komórki prawidłowych mysich fibroblastów 3T3.

Cytotoksyczność samej betuliny badano w kilku niezależnych eksperymentach. Wyniki z doświadczeń po 24 i 48 h, wskazują, że była ona zależna zarówno od dawki, jak i czasu działania. Ponadto efekt był silniejszy wobec komórek nowotworowych w porównaniu do komórek prawidłowych, gdzie przy najwyższym zastosowanym stężeniu — $15 \mu\text{g/ml}$ ($33,88 \mu\text{M}$) — po 24 h przeżywalność komórek wynosiła 95%, oraz ponad 90% po upływie kolejnej doby.

Cholesterol (**CHOL**) wykazywał selektywne działanie cytotoksyczne na komórki nowotworowe. Lupeol (**LUP**) posiadający tylko jedną grupę hydroksylową w pozycji 3, a zatem najbardziej zbliżony strukturalnie do **CHOL** ze wszystkich badanych związków, wykazywał podobne do niego działanie cytotoksyczne. Podobnie jak dla **CHOL** i **BET** było ono selektywne, tj. związki były praktycznie nietoksyczne dla komórek prawidłowych (3T3). Siła działania **LUP** była około $3,5 \times$ słabsza niż betuliny **BET**. Wartości EC_{50} **LUP** i **CHOL** nie różnią się między sobą w granicach błędu. Fakt ten sugeruje, że obecność dodatkowej domeny hydrofilowej w cząsteczce betuliny, wnosi znaczący wpływ na efekt cytotoksyczny z jednocześnie zachowaną selektywnością wobec komórek nowotworowych.

Obecność wiązania podwójnego nie ma większego wpływu na cytotoksyczność betuliny (**BET**). Związki **DHB**, **BET** i **ALLO** wykazywały podobną cytotoksyczność wobec komórek linii B16 a **BC2** wykazywał około 2,9-krotnie niższą cytotoksyczność niż betulina. Jednocześnie cytotoksyczność pochodnych diestrowych wzrastała wraz z długością łańcucha węglowego grup estrowych i związek **BC16** wykazywał 1,9-krotnie silniejszą cytotoksyczność niż betulina. Związek ten wykazywał najsilniejsze działanie ze wszystkich badanych pochodnych.

W przypadku komórek XC, cytotoksyczność diestrow wzrastała podobnie, ale związki o łańcuchach dłuższych niż w **BC8**, wykazywały działanie nieznacznie od niego słabsze.

Największą cytotoksyczność wobec komórek linii XC wykazywał związek **BC8**. W granicach błędu była ona podobna do **ALLO** i **DHB** a jednocześnie silniejsza niż **BET**.

Polarna pochodna **DGB**, wykazywała jedną z niższych cytotoksyczności wobec komórek B16 oraz stosunkowo niską wobec XC. Cytotoksyczność innej polarnej pochodnej — **DFTB** — była dwukrotnie wyższa w stosunku do komórek linii B16, w porównaniu do **DGB**.

Tabela 10.4: Wartości EC₅₀ oszacowane na podstawie danych oznaczeń cytotoksyczności w teście TB, po 24 h (o ile nie podano inaczej)

L.p.	związek	EC ₅₀ [μ M]			EC ₅₀ [μ g/ml]		
		B16	XC	3T3	B16	XC	3T3
1	CHOL	10,60±0,52	17,33±0,52	—	4,10±0,20	6,70±0,20	—
2	BET	3,84±0,45	5,42±0,45	—	1,70±0,20	2,40±0,20	—
3	BET*	3,50±0,45	4,18±0,45	EC ₀₅ 33,88	1,55±0,20	1,85±0,20	EC ₀₅ 15,00±0,20
4	BET**	2,94±0,45	3,61±0,45	EC ₁₀ 33,88±0,45	1,30±0,20	1,60±0,20	EC ₀₈ 15,00±0,20
5	DHB	4,94±0,45	4,05±0,45	—	2,20±0,20	1,80±0,20	—
6	ALLO	4,07±0,45	3,39±0,45	—	1,80±0,20	1,50±0,20	—
7	LUP	10,08±0,47	14,53±0,47	—	4,30±0,20	6,20±0,20	—
8	30MBET	12,27±0,42	8,04±0,42	—	5,80±0,20	3,80±0,20	—
9	3MOB	16,50±0,41	14,03±0,41	—	8,00±0,20	6,80±0,20	—
10	28MOB	17,12±0,41	7,84±0,41	—	8,30±0,20	3,80±0,20	—
11	DFTB	8,12±0,27	4,74±0,27	—	6,00±0,20	3,50±0,20	—
12	DBB	6,14±0,31	3,69±0,31	—	4,00±0,20	2,40±0,20	—
13	DGB	14,01±0,30	8,94±0,30	—	9,40±0,20	6,00±0,20	—
14	BRDOB	3,14±0,33	6,44±0,33	EC ₄₅ 24,76±0,32	1,90±0,20	3,90±0,20	EC ₄₅ 15,00±0,20
15	BC2	11,01±0,38	5,69±0,38	—	5,80±0,20	3,00±0,20	—
16	BC3	8,29±0,36	6,85±0,36	—	4,60±0,20	3,80±0,20	—
17	BC6	5,79±0,31	4,07±0,31	EC ₁₀ 23,47±0,30	3,70±0,20	2,60±0,20	EC ₁₀ 15,00±0,20
18	BC8	4,75±0,29	3,45±0,29	—	3,30±0,20	2,40±0,20	—
19	BC10	2,93±0,27	5,99±0,27	EC ₁₅ 19,97±0,27	2,20±0,20	4,50±0,20	EC ₁₅ 15,00±0,20
20	BC12	2,72±0,25	3,96±0,25	EC ₂₅ 18,57±0,25	2,20±0,20	3,20±0,20	EC ₂₅ 15,00±0,20
21	BC16	2,07±0,22	4,35±0,22	1,96±0,22	1,90±0,20	4,0±0,20	1,80±0,20
22	BC16**	1,52±0,22	2,72±0,22	1,52±0,22	1,40±0,20	2,50±0,20	1,40±0,20
23	K1FCH[†]	—	—	—	2,80±0,20	4,80±0,20	EC ₀₅ <15,00±0,20
24	K1FHex[‡]	—	—	—	2,30±0,20	4,80±0,20	EC ₀₅ <15,00±0,20
25	KOL^{‡‡}	3,76±0,08	6,26±0,13	52,58±0,25	1,50±0,03	2,50±0,05	21,00±1,00

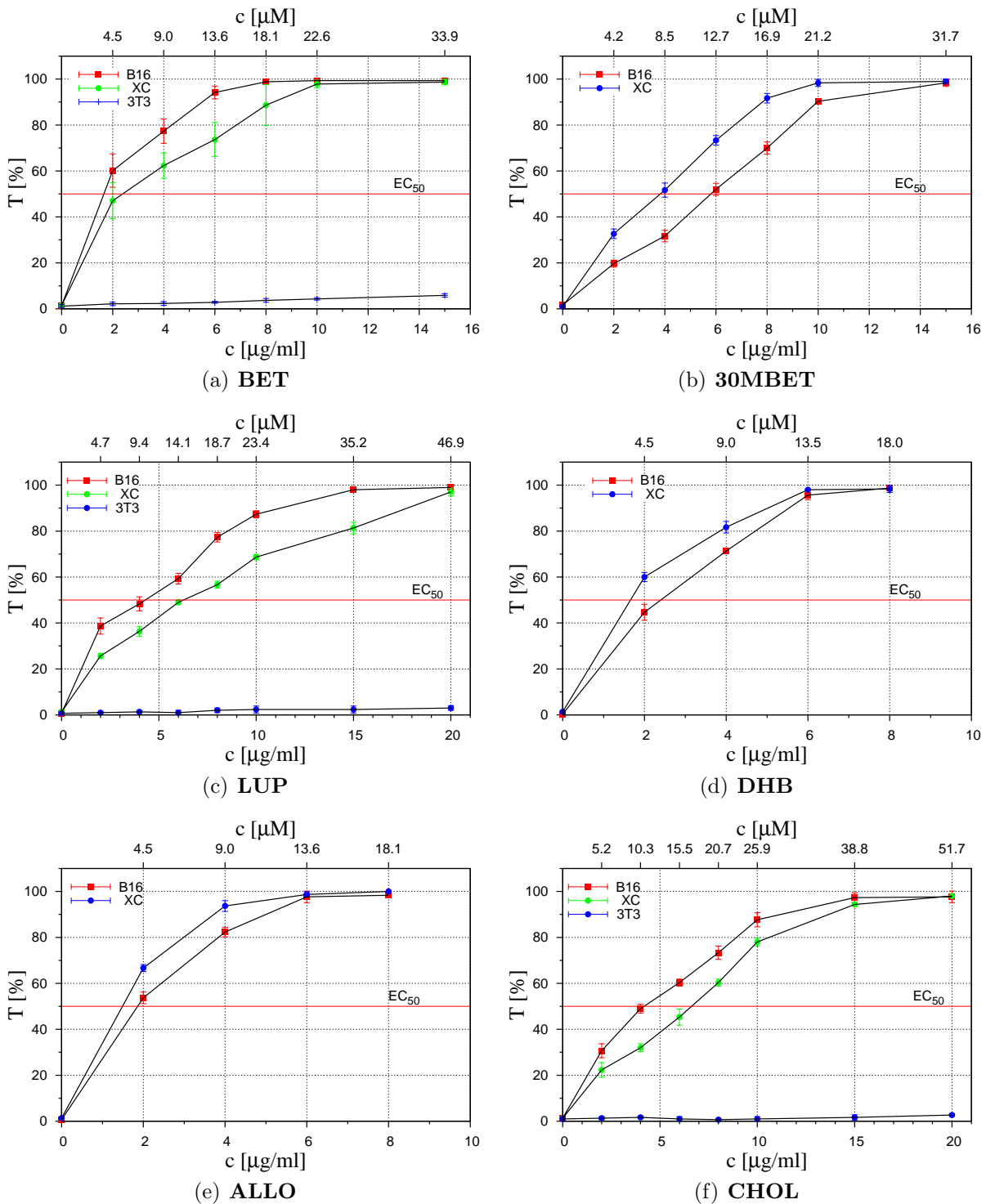
* oznaczenie dla niskiego zakresu stężeń betuliny (0,5–2 μ M),

** oznaczenie po 48 h,

† ekstrakt heksanowy z kory brzozy *Betula verrucosa* Ehrh,

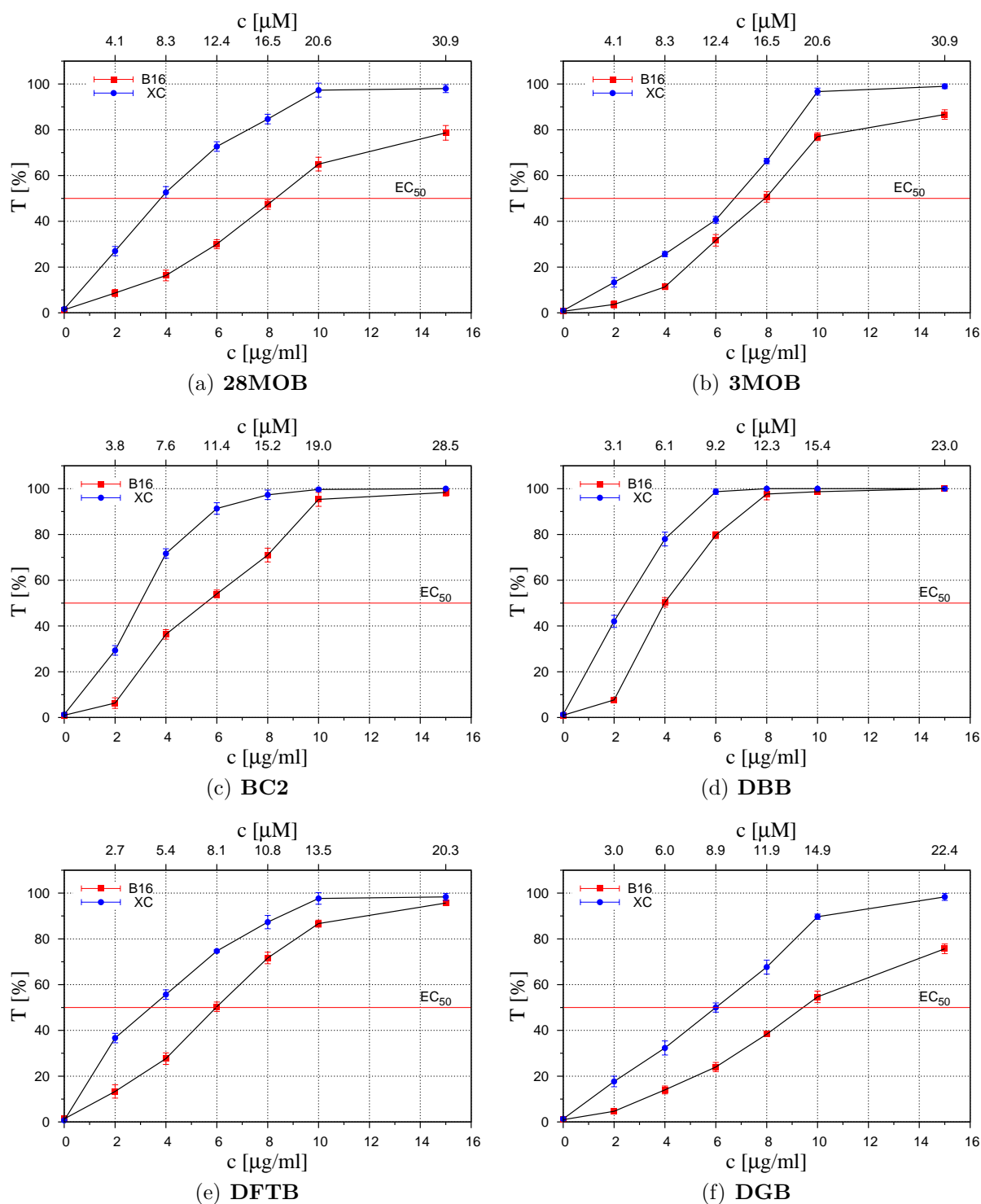
‡ ekstrakt CH₂Cl₂ z kory brzozy *Betula verrucosa* Ehrh,

‡‡ kolchicyna w DMSO

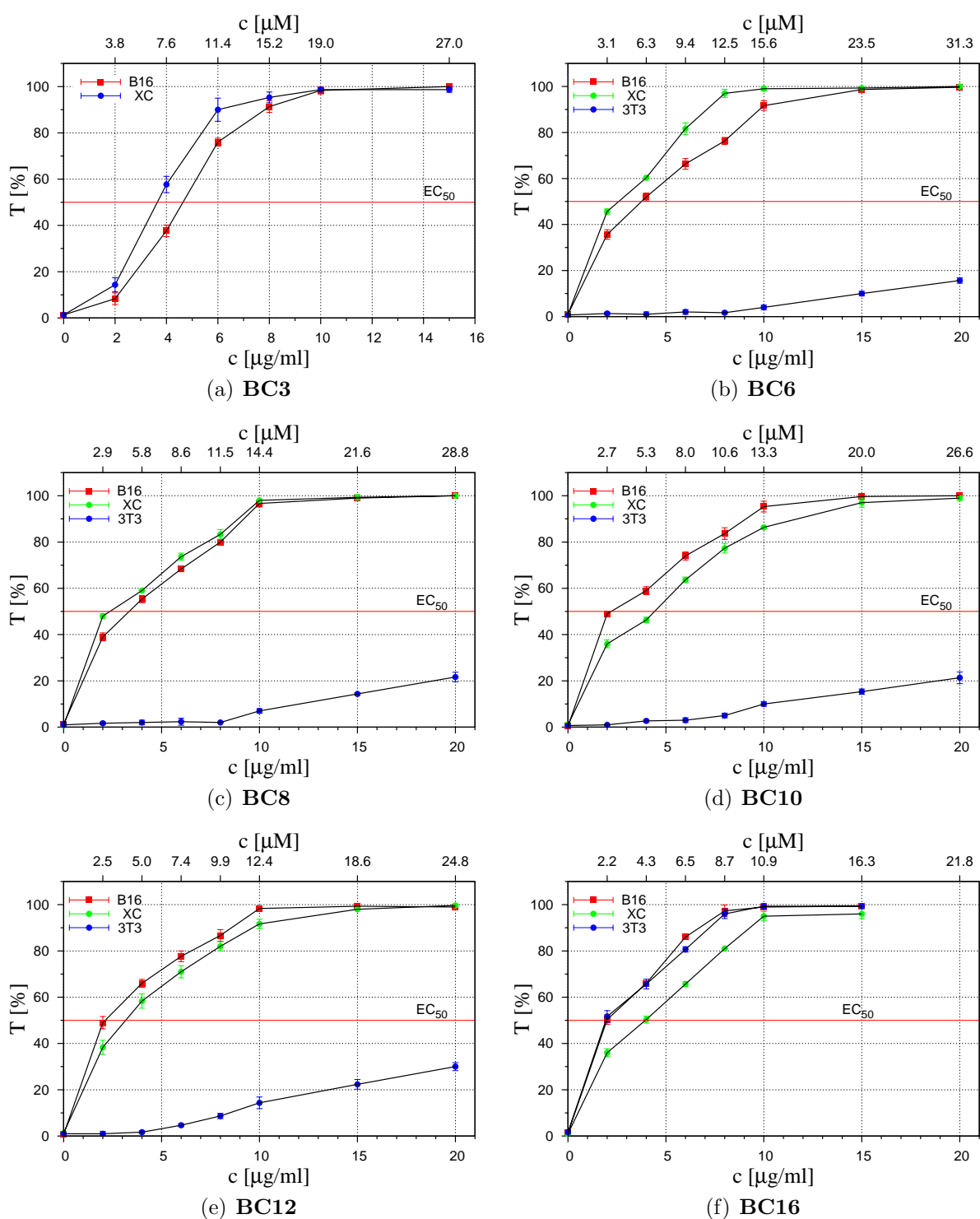


Rys. 10.39: Cytotoksyczność w teście z błękitem trypanu po 24 h: betulina (a), 30-metoksybetulina (b), lupeol (c), dihydrobetulina (d), allobetulina (e), cholesterol (f)

10.3. Cytotoksyczność betuliny i jej pochodnych

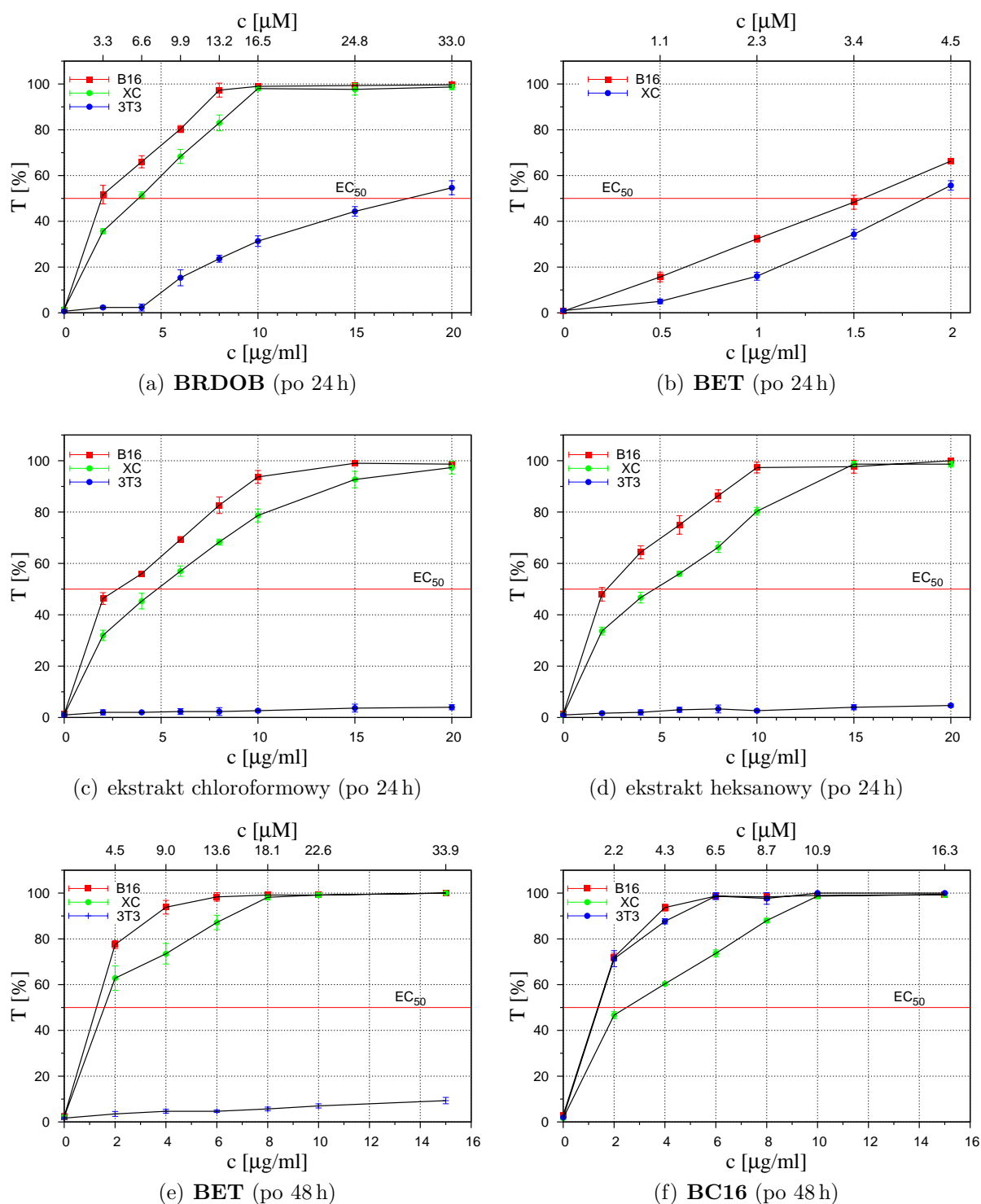


Rys. 10.40: Cytotoksyczność w teście TB po 24 h — 28-octan betuliny (**28MOB**) (a), 3-octan betuliny (**3MOB**) (b), dioctan betuliny (**BC2**) (c), dibenzoesan betuliny (**DBB**) (d), bis(hemiftalan)betuliny (**DFTB**) (e), bis(hemiglutaran)betuliny (**DGB**) (f)



Rys. 10.41: Cytotoksyczność w teście TB po 24h: dipropionian betuliny (**BC3**) (a), dikapronian betuliny (**BC6**) (b), dikaprylan betuliny (**BC8**) (c), dikaprynian betuliny (**BC10**) (d), dilaurynian betuliny (**BC12**) (e), dipalmitynian betuliny (**BC16**) (f)

10.3. Cytotoksyczność betuliny i jej pochodnych



Rys. 10.42: Cytotoksyczność w teście TB: 30-bromo-dioctanu betuliny (**BRDOB**) (a), betuliny (**BET**) (b), ekstraktu chloroformowego (c) i heksanowego (d) z kory brzozej — po 24 h oraz betuliny (**BET**) (e), i dipalmitynianu betuliny (**BC16**) (f) — po 48 h

10.4 Zależność cytotoksyczności betuliny i jej pochodnych od lipofilności

Zależność cytotoksyczności związków wyznaczona metodą TB, od ich wyznaczonej (R_{M0}) i obliczonej ($\log P$) lipofilności przedstawiono na wykresach 10.43–10.46.

Na podstawie tych wykresów można zaobserwować pewne uogólnienia dotyczące zależności cytotoksyczności pochodnych betuliny od ich budowy i lipofilności.

Ponieważ, jak wcześniej wspomniano, teoretycznie wyznaczone współczynniki lipofilności ($\log P$) nie zawsze są zgodne z doświadczeniem, dyskusja będzie oparta w głównej mierze na wyznaczonych eksperymentalnie wartościach R_{M0} .

Istnieje wyraźna zależność cytotoksyczności diestrów betuliny od obliczonych wartości $\log P - Pallas$ dla komórek linii B16. Ze wzrostem lipofilności spadają wartości EC_{50} a zatem rośnie cytotoksyczność związków. Przebieg tej zależności ma kształt hiperboli i przypomina przebieg funkcji wykładniczej: $y = 10^{-x}$. W celu potwierdzenia tej hipotezy narysowano zależność w skali logarytmicznej (rys. 10.47, str. 151).

Za pomocą metody najmniejszych kwadratów⁸ określono współczynniki w równaniu:

$$\log(EC_{50}) = a \log P Pallas + b, \quad (10.1)$$

gdzie: $a = -0,14 (\pm 0,01)$ i $b = 1,96 (\pm 0,09)$ ⁹, oraz macierz korelacji:

	a	b
a	1,000	
b	-0,983	1,000

świadcząca o dobrym dopasowaniu.

Przy założeniu parabolicznego przebiegu zależności EC_{50} od obliczonych wartości $\log P - Pallas$ dla komórek linii B16, dość dobrym modelem byłaby funkcja $y = ax^2 + bx + c$ (rys. 10.48, str. 151).

Za pomocą regresji nieliniowej¹⁰ obliczono współczynniki równania:

$$y = a(EC_{50})^2 + b(EC_{50}) + c, \quad (10.2)$$

gdzie: $a = 0,29 (\pm 0,05)$ ¹¹, $b = -6,96 (\pm 0,84)$ i $c = 44,51 (\pm 3,79)$, macierz korelacji:

	a	b	c
a	1,000		
b	-0,996	1,000	
c	0,983	-0,995	1,000

Na podstawie powyższych modeli można stwierdzić, że cytotoksyczność diestrów betuliny była proporcjonalna do długości łańcucha węglowego w zakresie dioctan–dipalmitynian.

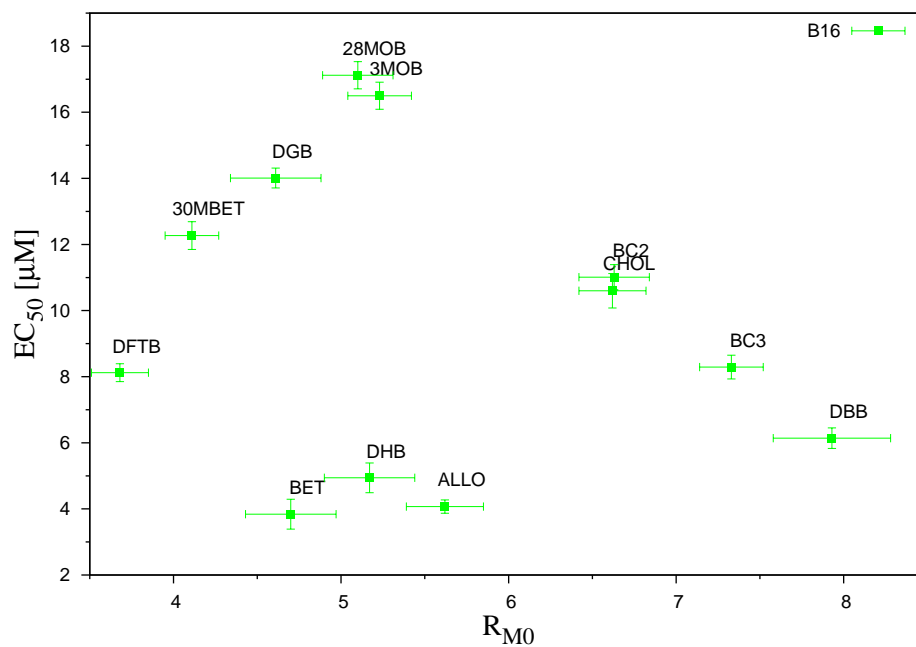
⁸Za pomocą programu Gnuplot po 5 iteracjach.

⁹W nawiasach podano odchylenia standardowe dla 5 stopni swobody.

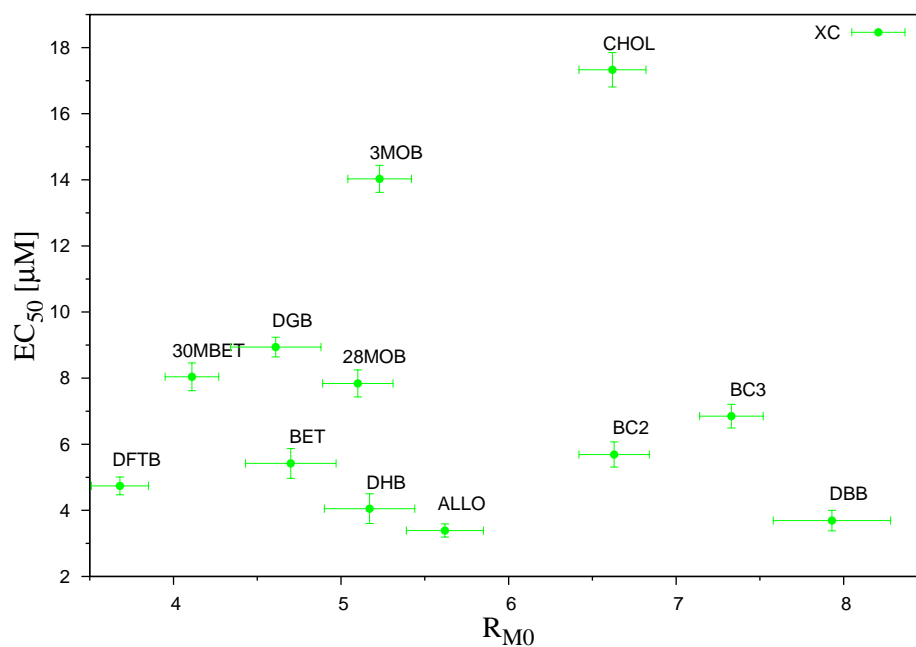
¹⁰Za pomocą programu Gnuplot po 7 iteracjach.

¹¹W nawiasach podano odchylenia standardowe dla 4 stopni swobody.

10.4. Zależność cytotoksyczności betuliny i jej pochodnych od lipofilności

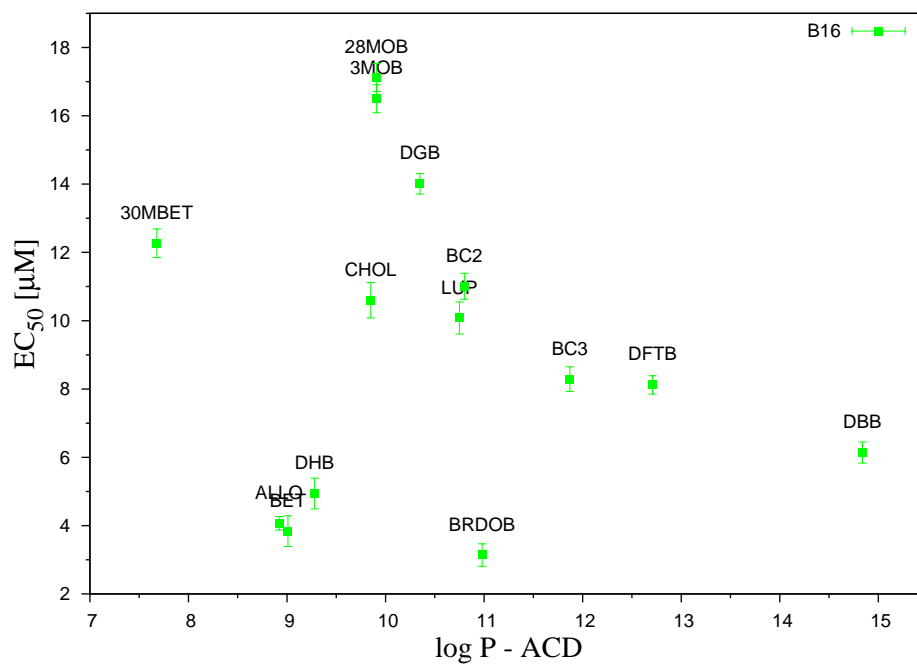


(a)

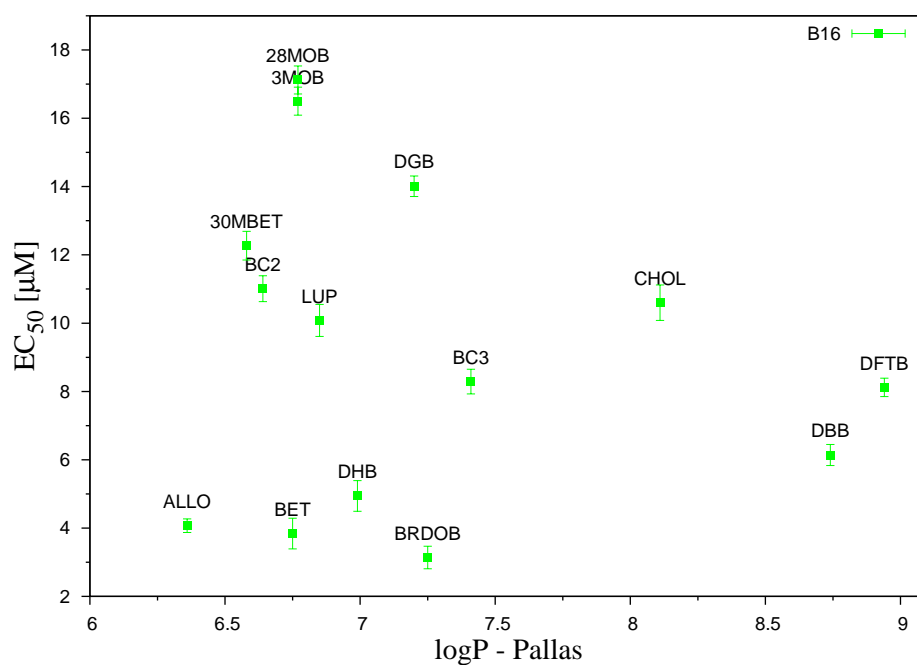


(b)

Rys. 10.43: Zależność EC_{50} od wyznaczonych eksperymentalnie współczynników lipofilności cząsteczkowej R_{M0} dla komórek linii B16 (a) i XC (b). Oznaczenie cytotoksyczności metodą TB, po 24 h



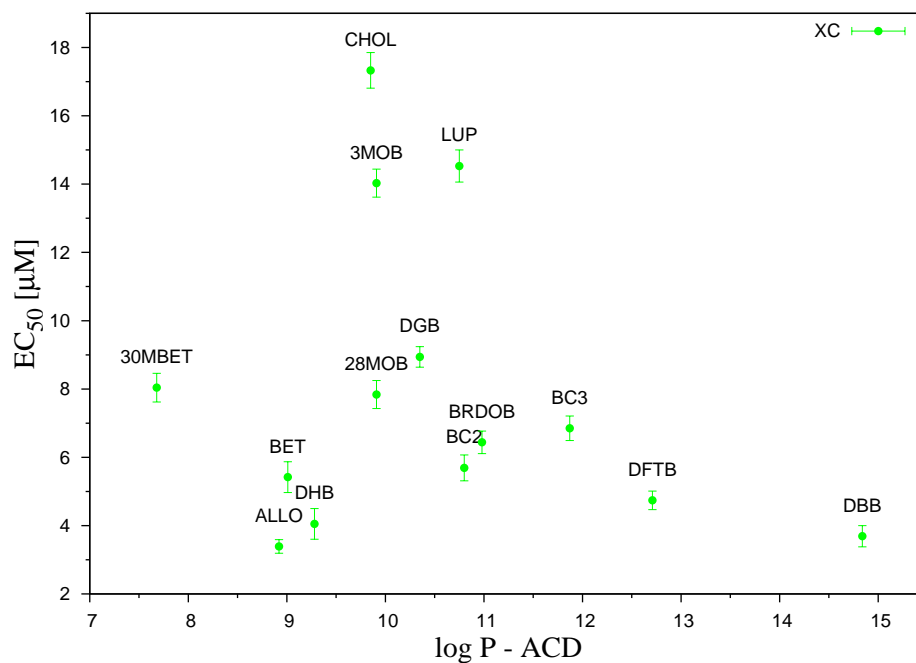
(a)



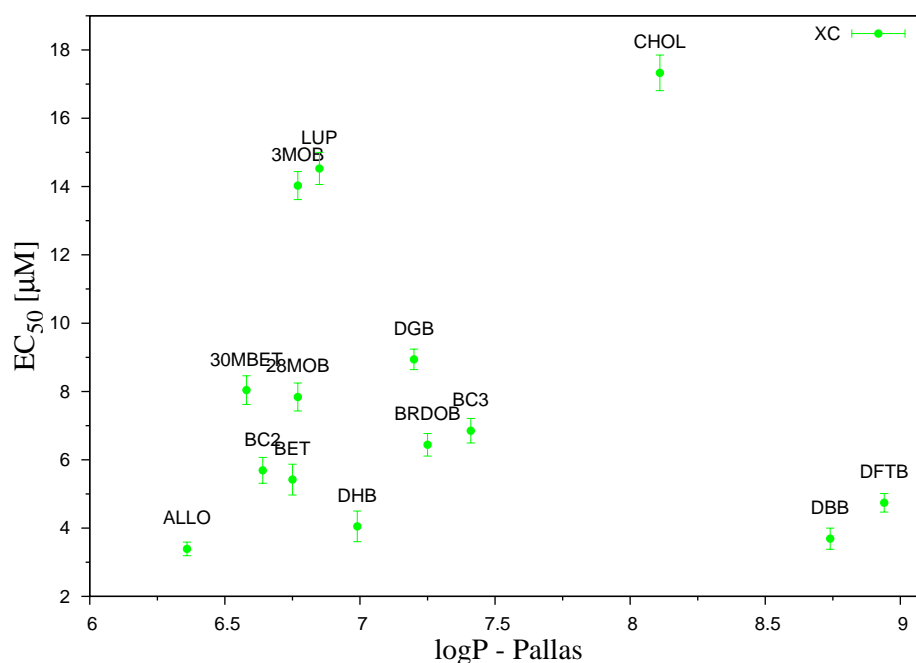
(b)

Rys. 10.44: Zależność EC_{50} od obliczonych wartości $\log P - \text{ACD}$ (a) i $\log P - \text{Pallas}$ (b) dla komórek linii B16. Oznaczenie cytotoksyczności po 24 h metodą TB

10.4. Zależność cytotoksyczności betuliny i jej pochodnych od lipofilności

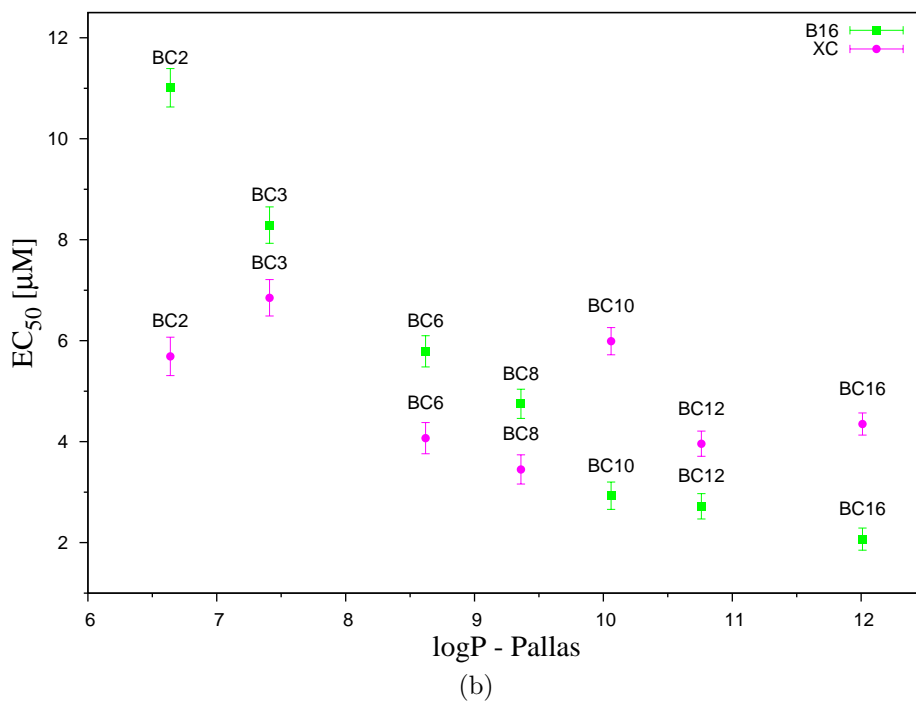
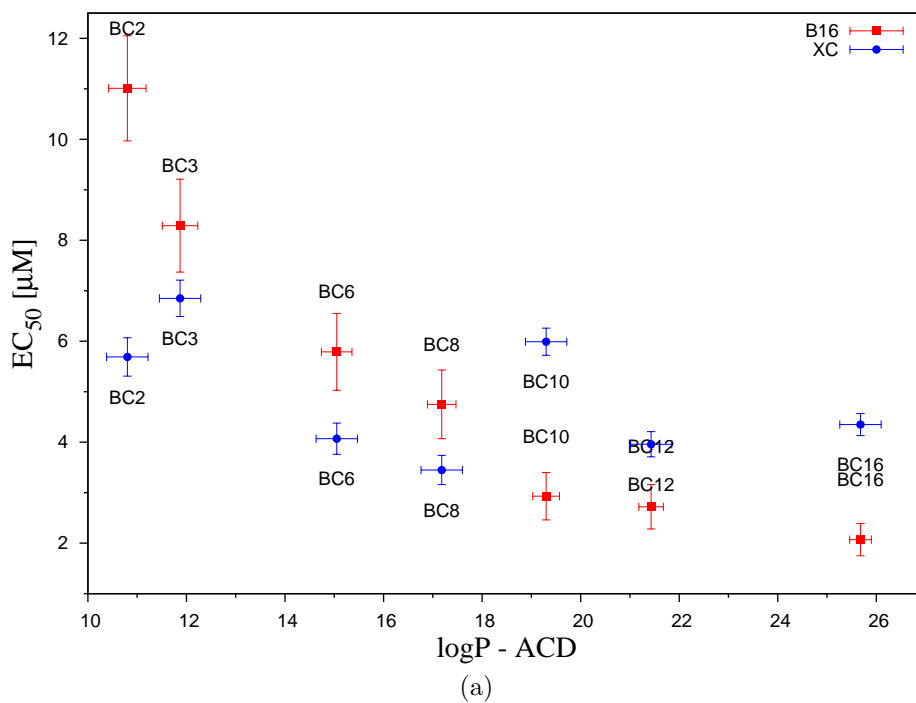


(a)



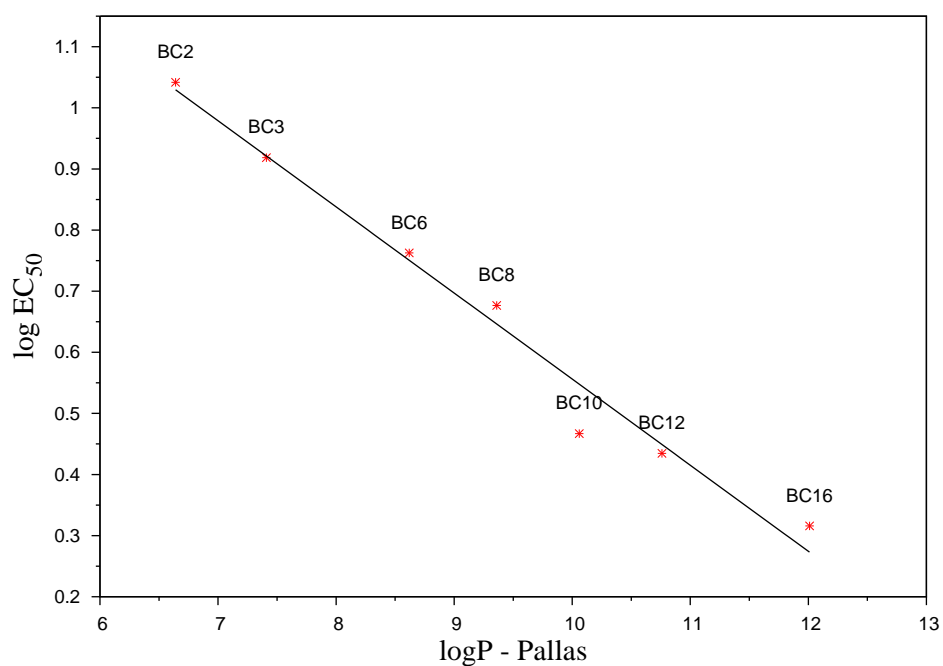
(b)

Rys. 10.45: Zależność EC_{50} od obliczonych wartości $\log P - ACD$ (a) i $\log P - Pallas$ (b) dla komórek linii XC. Oznaczenie cytotoksyczności po 24 h metodą TB

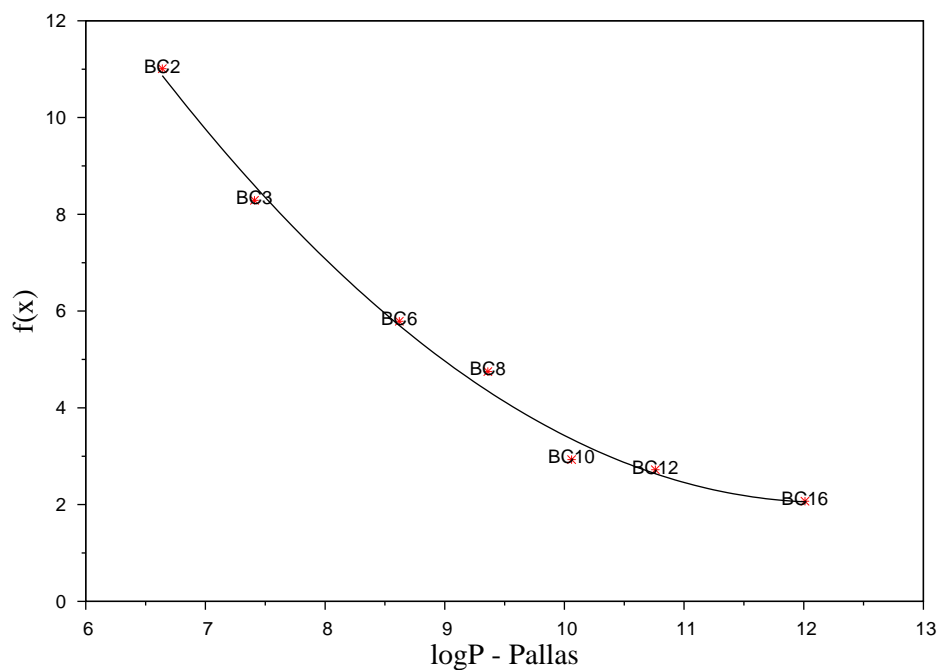


Rys. 10.46: Zależność EC_{50} diestrowych pochodnych betuliny dla linii komórkowych B16 i XC, od obliczonych współczynników lipofilności $\log P - ACD$ (a), i $\log P - Pallas$ (b). Oznaczenie cytotoksyczności po 24 h metodą TB

10.4. Zależność cytotoksyczności betuliny i jej pochodnych od lipofilności



Rys. 10.47: Zależność logarytmu dziesiątego EC_{50} diestrów betuliny wobec komórek linii B16 od $\log P - Pallas$



Rys. 10.48: Zależność paraboliczna toksyczności diestrów betuliny wobec komórek linii B16 od $\log P - Pallas$; gdzie $f(x) = a(EC_{50})^2 + b(EC_{50}) + c$

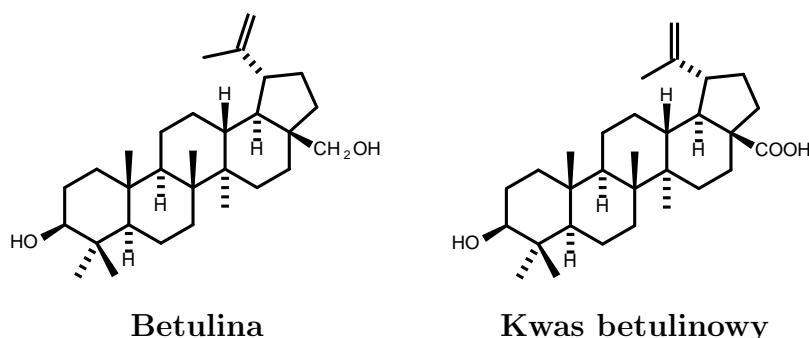
10.5 Rozważania końcowe

Jednym z najciekawszych pytań jakie można postawić w trakcie dyskusowania powyższych wyników brzmi:

„JAKI JEST MECHANIZM DZIAŁANIA CYTOTOKSYCZEGO BETULINY I POKREWNYCH JEJ TRITERPENÓW”?

Cechą charakterystyczną komórek nowotworowych jest ich intensywna proliferacja. Przemiany energetyczne w nich są zatem nasilone a centrami tych przemian są mitochondria, i od ich prawidłowego działania zależy los komórki. W szeroko prowadzonych w wielu ośrodkach badaniach nad mechanizmem działania kwasu betulinowego — oksypochoonej betuliny — ustalono, że triterpen ten ma selektywne działanie cytotoksyczne dla komórek nowotworowych. Już przy niskich stężeniach, w zakresie 2–10 μM , powoduje uruchomienie programu samobójczej śmierci komórek — apoptozy. Organellą docelową działania tego związku naturalnego (i być może również innych spokrewnionych z nim triterpenów) jest właśnie mitochondrium [57, 58, 216].

Betulina i kwas betulinowy wykazują znaczne podobieństwo strukturalne, różniąc się jedynie podstawnikiem przy węglu C-17 (rys.10.49). Ponieważ szkielety cząsteczkowe tych związków są bardzo duże, można nawet powiedzieć, że stopień ich niepodobieństwa jest znikomy i przyjąć hipotezę, że mechanizm działania kwasu betulinowego i betuliny może być zbliżony jeśli nie identyczny¹².



Rys. 10.49: Porównanie betuliny i kwasu betulinowego

Obecność cholesterolu jest witalnie istotna dla każdej żywej komórki. Jego interakcje z układami lipidowymi są badane od wielu lat. Wiadomo na ich podstawie, że oddziaływania pomiędzy lipidami w płynnych błonach są wrażliwe na stężenie tego steroidu. Poziom cholesterolu wpływa również na absorpcję leków przez komórki [14].

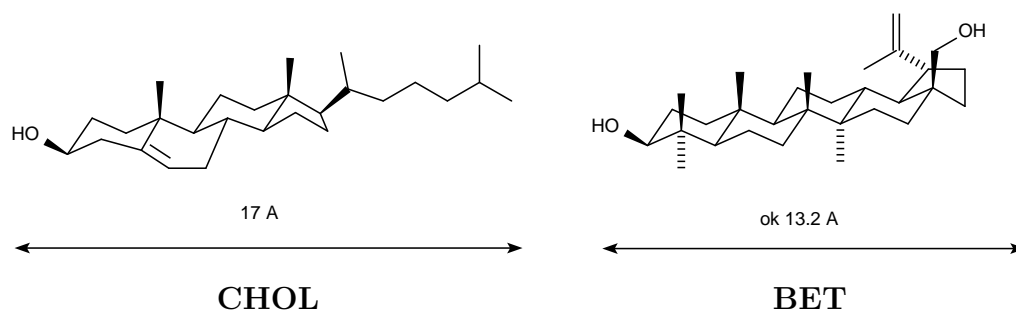
Jedną z najważniejszych funkcji strukturalnych cholesterolu jest modulowanie płynności błon lipidowych. Ich płynność jest głównie funkcją składu chemicznego komponujących ją fosfolipidów i właśnie stężenia cholesterolu [35]. Parametry te, tj. skład chemiczny i płynność zmieniają się na przykład w zależności od zewnętrznych warunków fizycznych komórki¹³. Szkielet połączonych ze sobą pierścieni węglowodorowych cholesterolu jest

¹²Grupa hydroksymetylowa betuliny może być utleniona przez cytochrom do aldehydowej i następnie kwasowej.

¹³Zjawisko to określa się terminem homeowiskozy adaptacyjnej; komórki hodowane w niższych temperaturach mają odmienny skład chemiczny błon, wliczając w to różnice stężeń cholesterolu, od komórek hodowanych w wyższych temperaturach [35].

sztynny. Wkomponowując się pomiędzy elastyczne fosfolipidy błony, modyfikuje wzajemne ich oddziaływania, modulując w ten sposób dynamikę dwuwarstwy.

Już samo porównanie konformacji cholesterolu i betuliny pozwala na wskazanie istotnych podobieństw tych molekuł (rys. 10.50).



Rys. 10.50: Porównanie konformacji cholesterolu (**CHOL**) i betuliny (**BET**), długość cząsteczek wyrażona w Ångstremach (geometria i rozmiary za [84, 163])

Wyznaczone współczynniki lipofilności cząsteczkowych dodatkowo potwierdzają ich analogie, przynajmniej na poziomie jednowymiarowych reprezentacji powinowactwa do lipidów, jakimi są współczynniki R_{M0} , proporcjonalne wg równania 7.7 (str. 77) do $\log P$.

Szlak biosyntetyczny betuliny i cholesterolu jest identyczny aż do utworzenia 2,3-epoksykwalenu. Również produkty pośrednie cyklizacji 2,3-epoksykwalenu, różnią się jedynie konfiguracją w kilku miejscach [148, 174, 209]. Ponadto istnieją hipotezy, sugerujące ewolucyjne wyłonienie się steroidów z triterpenów [143].

Powyższe fakty nasuwają przypuszczenie, że betulina w układach lipidowych, może zachowywać się w sposób podobny do cholesterolu lub innych steroidów.

Pojawiające się w piśmiennictwie doniesienia potwierdzają możliwość oddziaływań triterpen—lipidy. Monohydroksy triterpeny pentacykliczne wpływają na dynamikę i właściwości strukturalne sztucznej dwuwarstwy lipidowej dipalmitoilofosfatydylocholiny (DPPC-B), a niektóre z triterpenów, jak np. α -amyryna ulegają wbudowywaniu w dwuwarstwę w tak samo wysokich stężeniach jak cholesterol, i wykazują wpływ na przejścia fazowe tej dwuwarstwy [163].

Podatność związków steroidopodobnych do wbudowywania się w sztuczne błony lipidowe wielowarstwowych liposomów (ang.: multilamellar liposomes) dipalmitoilofosfatydylocholiny uzależniona jest silnie od ich budowy. Cholesterol i α -amyryna mogą stanowić aż do 50 mol% liposomów, natomiast lupeol najwyżej 12 mol% a tarakserol tylko 5 mol% [163].

Kwasy tłuszczowe, jak np. kwas stearynowy (KS), wpływają na uporządkowanie cząsteczek kwasu oleanolowego (KO). Badania monowarstwy zbudowanej z tych składników wykazały, że KS powoduje tworzenie mikrodomen — obszarów o zwiększonej ilości — KO. Uporządkowanie triterpeny jest w nich wysokie. Główne osie cząsteczek KO zorientowane są równolegle, zarówno względem siebie, jak i do łańcuchów KS. Kwas oleanolowy bez dodatku kwasu tłuszczowego tworzy nieuporządkowane skupiska, co dodatkowo podkreśla ich tendencje do wzajemnego oddziaływania [198].

Zatem hipoteza istnienia wzajemnych oddziaływań triterpen—komórkowe lipidy błonowe, mających charakter porządkujący lub destabilizujący ułożenie lipidowych składników błony, nie wydaje się bezzasadna.

Błony stanowią nie tylko barierę oddzielającą komórkę od środowiska ale i *locum* dla białek. Dlatego innymi możliwymi punktami wrażliwymi na działanie betuliny mogą być białka. Oddziaływanie triterpenu może być na nie bezpośrednie lub pośrednie. Oddziaływanie bezpośrednie mogłoby być związane z łączeniem się betuliny z białkiem, co mogłoby prowadzić do aktywacji lub inhibicji jego aktywności. Działanie pośrednie z kolei, następować mogłoby w wyniku modyfikowania płynności błony, co pociągałoby za sobą zmianę zachowania i funkcjonowania białek w niej zanurzonych; znana jest wrażliwość wielu białek błonowych na fizyczne zmiany dwuwarstwy [141].

Jeśli poziom cholesterolu w cytoplazmie staje się zbyt wysoki, to jest on transportowany do siateczki wewnątrzplazmatycznej (reticulum endoplazmatycznego), gdzie jest magazynowany w postaci estrów z długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi.

Estryfikacja jest przeprowadzana przez acylo-koenzym A acylo-transferazę cholesterolu (ACAT). Cholesterol jest transportowany do reticulum tylko, gdy jego poziom w postaci niezwiązanej osiągnie w komórce pewną krytyczną wartość. Próg czułości jest z kolei regulowany przez zawartość sfingomieliny w komórkach [141].

Istnieje zatem kilka możliwości oddziaływania tutaj betuliny:

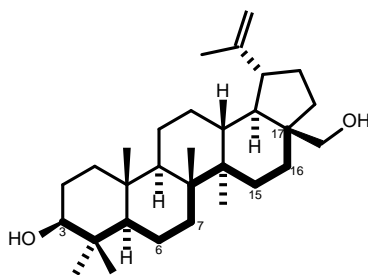
- jako „pseudocholesterolu”, którego stężenie jest „zliczane” razem ze stężeniem steroidu, przez co wywołany jest sygnał przekroczenia poziomu krytycznego cholesterolu, uruchamiający jego magazynowanie w reticulum,
- inhibitora ACAT, blokującego ten enzym, co finalnie doprowadza do nadmiernego nagromadzenia cholesterolu w komórce i jej śmierci,
- substancji, która wpływając bezpośrednio lub pośrednio na sfingomielinę, zaburza całą sieć kontrolowanych przez nią subtelnych regulacji stężenia cholesterolu w komórce.

Cholesterol kontroluje również wiele innych komponentów błonowych, wpływając m.in. na homeostazę fosfolipidów cholinowych. Wzrost jego stężenia ponad pewne progowe wartości¹⁴ staje się cytotoksyczny dla komórki. Dlatego też podanie cholesterolu komórkom wywołuje odpowiedź adaptatywną, polegającą na zwiększeniu aktywności cytydylotransferazy cholinowej (CTP). Wzrost aktywności tego enzymu prowadzi z kolei do podniesienia stężenia fosfatydylocholine w dwuwarstwie. Pomiar aktywności tego enzymu (lub poziomu fosfatydylocholine) po podaniu betuliny w porównaniu do kontroli, być może przyczyniłby się do wyjaśnienia aktywności tego triterpenu. Wspólnym farmakoforem aktywności cy-

totoksycznej betuliny i cholesterolu może być fragment hydrofobowy pomiędzy atomami C3–C17, zaznaczony pogrubioną linią na rys. 10.51.

Dodatkowo przemawiają za tym dane z publikacji dotyczących biotransformacji betuliny. Przekształcenia betuliny i pokrewnych związków przez mikroorganizmy prowadzą do zmniejszenia lipofilności. Do szkieletu cząsteczki wprowadzane są funkcje tlenowe lub podlega ona glikozylacji [21, 22, 103, 108] Mają one prawdopodobnie na celu zmniejszenie cytotoksyczności. Zatem modyfikacje obniżające charakter hydrofobowy związku powodują zmniejszenie ich cytotoksyczności i ułatwiają usunięcie z organizmu. Modyfikacje dotyczą głównie pozycji: C-3, C-7, C-16 oraz niekiedy C-23.

¹⁴Wartości te są odmienne dla różnych typów komórek.



Rys. 10.51: Betulina z zaznaczonym domniemanym fragmentem farmakoforowym

Dlatego wydaje się że obecność hydrofobowej domeny rozciągającej się pomiędzy C3-C-17 warunkuje toksyczne działanie związku lub zdolność jego przyłączania się do receptora(ów). Pierścień A, często ulega otwarciu, co sugeruje jego istotną rolę. Grupa izopropenylova może podlegać enzymatycznej (stereoselektywnej) hydroksylacji, natomiast grupa hydroksymetylenowa przekształceniu do hydroksylowej. Większość z tych przekształceń znajduje się na domniemanej linii farmakoforowej.

Za rolę grupy hydroksylowej jako nośnika właściwości cytotoksycznych dodatkowo przemawia fakt, że w komórce cholesterol przechowywany jest w reticulum w postaci połączeń z kwasem stearynowym lub palmitynowym (3-estry). Byłby to więc sposób na blokowanie tej grupy.

Wraz ze wzrostem lipofilności diestrów betuliny rośnie ich cytotoksyczność. Jednocześnie zmniejsza się selektywność tego działania i związki stają się coraz bardziej cytotoksyczne dla komórek prawidłowych. Może to wynikać z rosnących właściwości lipotropowych lub/i ich silnego wpływu destabilizującego błonę lipidową komórki. Ten ostatni efekt może być związany z wahadłowymi asymetrycznymi ruchami długich łańcuchów acetylowych w stosunku do sztywnej struktury szkieletu triterpenowego betuliny. W ten sposób zanurzona w dwuwarstwie cząsteczka np. (BC-16) rozpychałaby swoimi grupami palmitoilowymi sąsiadujące z nią łańcuch hydrofobowe fosfatydylocholicy. Powodowałoby to miejscowe rozerwanie ciągłości błony komórkowej.

Jeszcze inną prawdopodobną hipotezą działania betuliny jest działanie mitochondriotropowe. Cząsteczka betuliny i wiele z jej pochodnych spełnia warunki klasycznego związku o zdolności do selektywnego oddziaływania z błonami mitochondrialnymi. Jak wiadomo z piśmiennictwa błony lipidowe zbudowane głównie z kardiolipiny, mają bardzo niski poziom cholesterolu¹⁵.

Gradient cholesterolu w różnych błonach lipidowych jest utrzymywany za pomocą wyspecjalizowanych, stosunkowo mało jeszcze znanych białek jak np. SCP-2 (sterol carrier protein) czy kaweoliny [155, 172]. Jest to kolejny potencjalny punkt uchwytu działania betuliny i innych triterpenów. Mogą one być inhibitorami kompetycyjnymi tych białek — blokując je znowu zaburzałyby metabolizm cholesterolu.

Zgodnie z teorią *aktywacyjno—agregacyjną* Changeaux receptory zanurzone w błonie znajdują się w stanie równowagi pomiędzy formą aktywną i nieaktywną. Zaburzenia dwuwarstwy mogą być przenoszone na enzym wpływając na przesunięcie tej równowagi regulując ją dodatnio lub ujemnie [178].

¹⁵Ich działanie może być zatem zaburzone przez nadmiar cholesterolu i stąd prawdopodobnie wynika cytotoksyczność tego związku dla komórki po przekroczeniu pewnych wartości progowych.

Przedstawione są tu tylko nieliczne z wielu potencjalnych możliwości oddziaływania betuliny ze składnikami dwuwarstwy lipidowej lub z czynnikami ją modyfikującymi. Innymi możliwościami są np.: modulacja przejść fazowych dwuwarstwy, oddziaływanie z tratwami lub kaweolami, wpływ na metabolizm ceramidów, itp. Rozważania te wykraczają jednak poza ramy niniejszej pracy.

Rozdział 11

Podsumowanie i wnioski

Z kory brzozy *Betula verrucosa* Ehrh wyizolowano frakcję triterpenową, z której wydzielono betulinę. Głównym składnikiem ekstraktu z kory brzozy, towarzyszącym krystalicznej betulinie był lupeol. Triterpen ten oddzielono od betuliny w postaci 3-octanu, za pomocą chromatografii kolumnowej. Tożsamość lupeolu potwierdzono na podstawie danych fizykochemicznych i spektroskopowych, które były zgodne z piśmiennictwem.

W badaniach własnych ustalono, że optymalny czas ekstrakcji suchej kory brzożowej w aparacie Soxhleta za pomocą chlorku metylenu (CH_2Cl_2) wynosił 2×10 h.

Wstępna ekstrakcja kory za pomocą heksanu pozwalała na usunięcie w znacznej części lupeolu oraz na całkowite usunięcie innych substancji apolarnych, co wykazano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC).

W wyniku wielokrotnej krystalizacji z różnych rozpuszczalników i ich mieszanin, uzyskano betulinę o bardzo wysokim stopniu czystości, która była substratem do dalszych syntez.

Czystość i tożsamość zsyntetyzowanych pochodnych betuliny sprawdzono za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) oraz metod spektroskopowych: magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), spektrometrii mas (MS ESI) i podczerwieni (IR).

Dzięki zastosowaniu układu rozwijającego 1,4-dioksan—bufor octanowy możliwe było wyznaczenie współczynników lipofilności cząsteczkowej R_{M0} dla dużej części zsyntetyzowanych pochodnych betuliny.

Ze względów metodycznych, związanych z brakiem rozpuszczalności, nie można było wyznaczyć eksperymentalnie wartości R_{M0} dla diestrów betuliny o łańcuchach dłuższych niż 3 atomy węgla. Dlatego zostały one obliczone.

Na podstawie zleconych badań, wyznaczono cytotoksyczność tych związków na komórkach ludzkich gruczolakoraka płuc (NCI-H292) i prawidłowych komórek nabłonka upigmentowanego (ARPE-19) oraz na komórkach mysich czerniaka (B16), mięsaka (XC) i fibroblastów (3T3).

Za pomocą testów MTT i LDH, na liniach komórek ludzkich zbadano cytotoksyczność następujących związków **BET**, **DFTB**, **DGB**, **DBB**, **3MOB** i **28MOB**. Jako substancje referencyjne zastosowano doksorubicynę (**DOX**) i cholesterol (**CHOL**).

Za pomocą testu TB, oceniono cytotoksyczność wszystkich uzyskanych związków na liniach komórek mysich. Jako substancje referencyjne zastosowano cholesterol (**CHOL**) i kolchicynę (**KOL**).

Wyniki uzyskane w teście MTT dla związków: **3MOB**, **28MOB**, **DFTB** i **DGB** na liniach ARPE-19 i NCI-H292 pozwalają przypuszczać, że powodowały one rozprzęgnięcie

oksydatywnej fosforylacji w mitochondriach. Powyższy fakt oraz podobieństwo budowy betuliny i kwasu betulinowego, pozwalają przypuszczać, że mechanizm działania cytotoksycznego betuliny (i jej półsyntetycznych pochodnych) był najprawdopodobniej analogiczny do działania kwasu betulinowego i związany z zaburzeniami funkcji mitochondriów.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń, wyciągnięto szereg wniosków przedstawionych poniżej.

Wykorzystując metodykę opisaną w piśmiennictwie, zsyntetyzowano 18 pochodnych betuliny. Niektóre z przepisów syntez zmodyfikowano. Spośród otrzymanych związków 8 jest nowych, dotychczas nie opisanych w dostępnym piśmiennictwie.

Zarówno ekstrakt heksanowy (**K1FHex**) jak i dichlorometanowy (**K1FCH**) z kory brzozy *Betula verrucosa* Ehrh. w teście TB wykazywały podobne, selektywne działanie cytotoksyczne na komórki linii nowotworów mysich czerniaka (B16) i mięsaka (XC). Działanie to było około 50% niższe niż głównego składnika tych ekstraktów, tj. betuliny (**BET**).

Większość z badanych pochodnych, wykazywała silne działanie cytotoksyczne na komórki linii gruczolakoraka płuc (NCI-H292) i prawidłowych komórek nabłonka upigmentowanego (ARPE-19) oraz na komórkach mysich czerniaka (B16), mięsaka (XC) i fibroblastów (3T3). Działanie to było porównywalne z siłą działania znanych środków cytostatycznych, tj. doksorubicyny (**DOX**) i kolchicyny (**KOL**).

Wśród uzyskanych pochodnych, znaleziono kilka korelacji struktura aktywność (SAR).

Największą cytotoksyczność wobec komórek linii NCI-H292 i ARPE-19 w testach MTT i LDH wykazywały betulina (**BET**) i 30-metoksybetulina (**30MBET**).

Zablokowanie grup hydroksylowych betuliny resztami kwasu benzoowego (przy C-3 i C-28) całkowicie znosiło jej cytotoksyczność. Dibenzoesan betuliny (**DBB**) w zakresie stężeń 1–8 μM , nie wykazywał cytotoksyczności wobec komórek linii NCI-H292 i ARPE-19.

Wobec komórek linii B16, XC i 3T3, najwyższą cytotoksyczność w teście TB wykazywały: betulina (**BET**), dihydrobetulina (**DHB**), allobetulina (**ALLO**) oraz długołańcuchowe diestry betuliny: dikaprynian betuliny (**BC10**), dilaurynian betuliny (**BC12**) i dipalmitynian betuliny (**BC16**).

W teście TB, betulina (**BET**), lupeol (**LUP**) i cholesterol (**CHOL**), wykazywały selektywne działanie cytotoksyczne na komórki nowotworowe. Natomiast nie wykazywały działania na komórki prawidłowe.

Zablokowanie grupy hydroksylowej przy C-3 (**3MOB**) lub przy C-28 (**28MOB**) cząsteczki betuliny w drodze estryfikacji, zmniejszało cytotoksyczność około 3× w porównaniu do wolnej betuliny oznaczoną w teście TB na komórki linii B16 i XC.

Dwa spośród diestrów betuliny: dioctan (**BC2**) i dipropionian (**BC3**), w teście TB wykazywały niższą cytotoksyczność na komórki linii B16 i XC niż betulina (**BET**).

Średnio- i długołańcuchowe diestry betuliny wykazywały większą lub równą betulinie cytotoksyczność na komórki XC w teście TB. Jednocześnie wobec komórek linii B16 cy-

totoksyczność pochodnych (**BC10**), (**BC12**) i (**BC16**) była większa niż cytotoksyczność betuliny (**BET**).

Cholesterol (**CHOL**) wykazywał niewielkie w porównaniu do betuliny działanie cytotoksyczne na komórkach linii nowotworowych: XC i B16 oraz bardzo słabą cytotoksyczność na komórki linii prawidłowej 3T3.

Za pomocą chromatografii cienkowarstwowej o odwróconych fazach wyznaczono współczynniki lipofilności cząsteczkowej (R_{M0}) dla związków: **BET**, **CHOL**, **3MOB**, **28MOB**, **BC3**, **ALLO**, **DFTB**, **DGB**, **DBB**, **30MBET**. Dla związków tych oraz pozostałych pochodnych betuliny obliczono również teoretyczne wartości $\log P$ za pomocą programów Pallas i ACD 3D.

Wyznaczone cząsteczkowe współczynniki lipofilności (R_{M0}) pochodnych betuliny: **ALLO**, **3MOB**, **28MOB**, **DHB**, **30MBET**, **DGB**, **BC2** i **BC3**, klasyfikują te związki w grupie substancji wysoce lipofilnych ($\log P > 4$).

Ekstrapolując wartości wyznaczonych współczynników R_{M0} na bazie obliczonych teoretycznie $\log P$, można powiedzieć, że diestry betuliny o łańcuchach dłuższych niż sześciowęglowe (**BC6**) były superlipofilne ($\log P > 8$).

Na podstawie wyznaczonych wysokich i bardzo wysokich współczynników lipofilności oraz obliczonych, równie wysokich wartości $\log P$, można wnioskować, że betulina i jej pochodne mogły wykazywać bardzo wysokie powinowactwo do lipidowych błon komórkowych, gdzie prawdopodobnie mogły ulegać solubilizacji i dyfuzji biernej.

Cytotoksyczność pochodnych betuliny wyznaczona za pomocą testu TB zależała od lipofilności badanych związków.

Wyznaczona w teście TB cytotoksyczność diestrów betuliny zwiększała się proporcjonalnie do wzrostu lipofilności. Zależność ta miała kształt hiperboli o przebiegu podobnym do funkcji eksponencjalnej $y = 10^{-x}$, lub kwadratowej $y = ax^2 + bx + c$.

Oznaczona w teście TB cytotoksyczność diestrów betuliny wzrastała wraz z długością łańcucha węglowego grup acylowych. Równocześnie zmniejszała się ich selektywność i im dłuższe były łańcuchy acylowe, tym związki miały silniejsze działanie cytotoksyczne wobec komórek prawidłowych. Ze względu na bardzo wysoką lipofilność tych związków cytotoksyczność prawdopodobnie była związana z działaniem lipotropowym.

Lupeol — główny składnik towarzyszący betulinie w ekstrakcie z kory brzozy — w teście TB na komórkach linii B16, XC oraz 3T3 wykazywał niższą toksyczność niż betulina. Zatem nie jest konieczne usuwanie lupeolu z ekstraktu kory brzozy do zastosowań farmaceutycznych (kosmetycznych).

Zakończenie

Triterpeny są przykładem substancji naturalnych, których rola jako potencjalnych leków lub źródło struktur wiodących do ich otrzymywania jest niepodważalna. Struktury chemiczne wielu stosowanych obecnie leków pochodzenia roślinnego, jak np.: winkrystyna, winblastyna, kolchicina, paklitaksel czy chinina są skomplikowane a co za tym idzie opłacalność syntezy tych związków jest znikoma.

Pozyskanie przemysłowych ilości niektórych z wymienionych substancji stwarza niekiedy znaczne trudności.

Izolacja większości związków triterpenowych nie stanowi tu odstępstwa, gdyż ich zawartość w materiale roślinnym jest na ogół niska wynosząc poniżej 1%.

Betulina należy do nielicznych wyjątków, jako tzw. metabolit wtórny, stanowiąc do 25% zewnętrznej warstwy kory różnych gatunków brzoź. Dzięki temu może być cennym surowcem do półsyntezy nowych środków leczniczych: przeciwzapalnych, antywirusowych, przeciwmalarycznych i przeciwnowotworowych.

Doniesienia literaturowe oraz uzyskane wyniki, dają podstawy do prowadzenia dalszych prac nad modyfikacjami strukturalnymi i badaniami oddziaływań molekularnych betuliny, w tym związanych z jej wysokim powinowactwem do lipidów. A przecież słowo lipofilność pochodzi od greckich słów *λίπος* i *φιλία*, które oznaczają tłuszcz i przyjaźń.

Piśmiennictwo

- [1] K. Abe, N. Matsuki. Measurement of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci. Res.*, 38(4): 325–329, 2000.
- [2] J. Achrem-Achremowicz, Z. Janeczko. Betulina — prekursor nowych środków leczniczych. *Farm. Pol.*, 58: 799–804, 2002.
- [3] J. Achrem-Achremowicz, Z. Janeczko. Betulina — triterpen pentacykliczny. *Wiad. Chem.*, 57: 223–246, 2003.
- [4] R. B. Agarwal, V. D. Rangari. Antiinflammatory and antiarthritic activities of lupeol and 19 α -H lupeol isolated from *Strobilanthus callosus* and *Strobilanthus ixiocephala* roots. *Ind. J. Pharmacol.*, 35: 384–387, 2003.
- [5] T. Akihisa, Y. Takamine, K. Yoshizumi, H. Tokuda, Y. Kimura, M. Ukiya, T. Nakahara, T. Yokochi, E. Ichiishi, H. Nishino. Microbial transformations of two lupane-type triterpenes and anti-tumor-promoting effects of the transformation products. *J. Nat. Prod.*, 65: 278–282, 2002.
- [6] J. Allison, W. Lawrie, J. McLean, J. Beaton. Dehydrogenation with Mercuric Acetate in the Lupane Series. Part II. Lupeol and its Derivatives. *J. Chem. Soc.*, 5224–5230, 1961.
- [7] J. Allison, W. Lawrie, J. McLean, G. Taylor. Dehydrogenation with mercuric Acetate in the Lupane Series. Part I. Betulin and Betulinic Acid. *J. Chem. Soc.*, 3353–3361, 1961.
- [8] L. Anikina, V. Grishko, A. Tolstikov. Synthesis And Biological Activity of S-Containing Betulin Derivatives. *Chem. Nat. Compd.*, 41(6), 2005.
- [9] A. Anjaneyulu, M. Rao, V. Murty, A. Sree. Wagner-Meerwein Rearrangements in Lupanes. *Indian J. Chem.*, 19B: 735–738, 1980.
- [10] Y. Aratanechemuge, H. Hibasami, K. Sanpin, H. Katsuzaki, K. Imai, T. Komiya. Induction of apoptosis by lupeol isolated from mokumen (*Gossampinus malabarica* L.Merr) in human promyelotic leukemia HL-60 cells. *Oncol. Rep.*, 11: 289–292, 2004.
- [11] O. Ashavina, O. Flekhter, F. Galin, N. Kabal'nova, L. Baltina, G. Tolstikov. Oxidation of Betulin and Its Monoacetates by "Activated" DMSO. *Chem. Nat. Compd.*, 39(2): 207–211, 2003.

- [12] I. Baglin, A. C. Mitaine-Offer, M. Nour, K. Tan, C. Cavé, M. A. Lacaille-Dubois. A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 3: 525–539, 2003.
- [13] I. Baglin, A. Poumaroux, M. Nour, K. Tan, A. Mitaine-Offer, M. Lacaille-Dubois, B. Chauffert, C. Cavé. New Ursolic and Betulinic Derivatives as Potential Cytotoxic Agents. *J. Enz. Inh. Med. Chem.*, 18(2): 111–117, 2003.
- [14] G. Banting, G. Salvesen, A. Toker, D. Alessi, S. Graham, S. Gutteridge, D. Hoekstra, N. Hooper, S. Huber, J. Kehrer, i in. Modulation of drug-stimulated ATPase activity of human MDR1/P-glycoprotein by cholesterol. *Biochem. J.*, 401: 597–605, 2007.
- [15] S. Basu, R. Ma, P. Boyle, B. Mikulla, M. Bradley, B. Smith, M. Basu, S. Banerjee. Apoptosis of human carcinoma cells in the presence of potential anti-cancer drugs: III. Treatment of Colo-205 and SKBR3 cells with: cis-platin, Tamoxifen, Melphalan, Betulinic acid, L-PDMP, L-PPMP, and GD3 ganglioside. *Glycoconjugate J.*, 20(9): 563–577, 2003.
- [16] F. K. Beilstein. *Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, 4. Aufl. die Literatur von 1920–1929 umfassend, Zweites Ergänzungswerk*, wolumen 6, EII. J. Springer, Berlin, 1941–1957.
- [17] T. Bernas, J. Dobrucki. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, 47(4): 236–242, 2002.
- [18] Y. Bi, J. Xu, X. Wu, W. Ye, S. Yuan, L. Zhang. Synthesis and cytotoxic activity of 17-carboxylic acid modified 23-hydroxy betulinic acid ester derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17(5): 1475–1478, 2007.
- [19] G. Biagi, M. Recantini, A. Barbaro, P. Borea. Lipophilicity Estimation of Drugs. *Process Contr. Qual.*, 10: 129–149, 1997.
- [20] S. Bureeva, J. Andia-Pravdivy, A. Symon, A. Bichucher, V. Moskaleva, V. Popenko, A. Shpak, V. Shvets, L. Kozlov, A. Kaplun. Selective inhibition of the interaction of C1q with immunoglobulins and the classical pathway of complement activation by steroids and triterpenoids sulfates. *Bioorg. Med. Chem.*, 15(10): 3489–3498, 2007.
- [21] P. Chatterjee, S. A. Kouzi, J. M. Pezzuto, M. T. Hamann. Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* atcc 13368. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3850–3855, 2000.
- [22] P. Chatterjee, J. M. Pezzuto, S. A. Kouzi. Glucosidation of Betulinic Acid by *Cunninghamella* Species. *J. Nat. Prod.*, 62: 761–763, 1999.
- [23] S. Chintharlapalli, S. Papineni, S. K. Ramaiah, S. Safe. Betulinic Acid Inhibits Prostate Cancer Growth through Inhibition of Specificity Protein Transcription Factors. *Cancer Res.*, 67(6): 2816–2823, 2007.
- [24] C. Chopra, D. White. Triterpene Compounds—IX. Mercuric Acetate Oxidation of a Melaleucic Acid Derivative. *Tetrah.*, 22: 897–901, 1966.

- [25] K. J. Chou, H. C. Fang, H. M. Chung, J. S. Cheng, K. C. Lee, L. L. Tseng, K. Y. Tang, C. R. Jan. Effect of betulinic acid on intracellular-free Ca^{2+} levels in Madin Darby canine kidney cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 408: 99–106, 2000.
- [26] A. Chowdhury, S. Mandal, A. Goswami, M. Ghosh, L. Mandal, D. Chakraborty, A. Ganguly, G. Tripathi, S. Mukhopadhyay, S. Bandyopadhyay, i in. Dihydrobetulinic acid induces apoptosis in *Leishmania donovani* by targeting DNA topoisomerase I and II: implications in antileishmanial therapy. *Mol Med*, 9(1-2): 26–36, 2003.
- [27] R. H. Cichewicz, S. A. Kouzi. Chemistry, Biological Activity, and Chemotherapeutic Potential of Betulinic Acid for the Prevention and Treatment of Cancer and HIV Infection. *Med. Res. Rev.*, 24: 90–114, 2004.
- [28] B. Cole, M. Bentley, Y. Hua. Triterpenoid extractives in the outer bark of *Betula lenta* (black birch). *Holzforschung*, 45(4): 265–268, 1991.
- [29] J. D. Connolly, R. A. Hill. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.*, 18: 560–578, 2001.
- [30] J. Conolly, R. Hill. *Dictionary of Terpenoids*. Chapman and Hall, London, 1991.
- [31] A. Davis, P. Bernstein, D. Bok, J. Turner, M. Nachtigal, R. Hunt. A human retinal pigment epithelial cell line that retains epithelial characteristics after prolonged culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 36(5): 955–964, 1995.
- [32] Y. H. Deng, J. K. Snyder. Preparation of a 24-nor-1,4-dien-3-one triterpene derivative from betulin: A new route to 24-nortriterpene analogues. *J. Org. Chem.*, 67: 2864–2873, 2002.
- [33] M. Denisenko, N. Pokhilo, L. Odinokova, V. Denisenko, N. Uvarova. Ruthenium Tetroxide Oxidation of 3 β -acetoxy-28-hydroxy-18-lupene to Tricyclic Products. *Tetrah. Lett.*, 37: 5187–5190, 1996.
- [34] B. Dinda, A. Hajra, S. Das, G. Chel, R. Chakraborty, B. Ranu. Reactions on naturally occurring triterpenes: Part 1. *Indian J. Chem.*, 34B: 624–628, 1995.
- [35] K. Dołowy, A. Szewczyk, S. Pikuła. *Błony biologiczne*. Śląsk Sp.z.o.o. Wydawnictwo Naukowe, Katowice–Warszawa, 2003.
- [36] S. N. Dudd, R. P. Evershed. Unusual Triterpenoid Fatty Acyl Ester Components of Archaeological Birch Bark Tars. *Tetrah. Lett.*, 40: 359–362, 1999.
- [37] Y. Ebizuka, Y. Katsube, T. Tsutsumi, T. Kushiro, M. Shibuya. Functional genomics approach to the study of triterpene biosynthesis. *Pure Appl. Chem.*, 75: 369–374, 2003.
- [38] C. Eder-Czembirek, C. Czembirek, B. Erovic, E. Selzer, D. Turhani, L. Vormittag, D. Thurnher. Combination of betulinic acid with cisplatin-different cytotoxic effects in two head and neck cancer cell lines. *Oncol. Rep.*, 14(3): 667–671, 2005.
- [39] H. Ehrhardt, S. Fulda, M. Führer, K. M. Debatin, I. Jeremias. Betulinic acid-induced apoptosis in leukemia cells. *Leukemia*, 18: 1406–1412, 2004.

- [40] R. Ekman. Suberin Monomers and Triterpenoids from the Outer Bark of *Betula verrucosa* Ehrh. *Holzforschung*, 37(4): 205–211, 1983.
- [41] M. Endová, E. Klinotová, J. Sejbal, B. Máca, J. Klinot, J. Protiva. Preparation of 2,3-secodiols of the Lupane Series. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 58: 1420–1429, 1993.
- [42] N. Enwerem, J. Okogun, C. Wambebe, D. Okorie, P. Akah. Anthelmintic activity of the stem bark extracts of *Berlina grandiflora* and one of its active principles, betulinic acid. *Phytomedicine*, 8(2): 112–114, 2001.
- [43] S. Errington, E. Ghisalberti, P. Jefferies. The chemistry of the *Euphorbiaceae*. XXIV. Lup-20(29)-ene-3 β ,16 β ,28-triol from *Beyeria brevifolia* var. *brevifolia*. *Aust. J. Chem.*, 29: 1809–1814, 1976.
- [44] M. Evers, C. Poujade, F. Soler, Y. Ribeill, C. James, Y. Lelièvre, J. C. Gueguen, D. Reisdorf, I. Morize, R. Pauwels, E. D. Clercq, Y. Hénin, A. Bousseau, J. F. Mayaux, J. B. L. Pecq, N. Dereu. Betulinic acid derivatives: a new class of human immunodeficiency virus type 1 specific inhibitors with a new mode of action. *J. Med. Chem.*, 39: 1056–1068, 1996.
- [45] M. Farooq Biabani, S. Singh, S. Kumar, K. Raj, A. Pathak. The Willgerodt-Kindler Reaction on Lupenone: Unusual Oxidative Dimerization. *Nat. Prod. Lett.*, 16(5): 297–300, 2002.
- [46] O. Flekhter, L. Nigmatullina, L. Baltina, L. Karachurina, F. Galin, F. Zarudii, G. Tolstikov, E. Boreko, N. Pavlova, S. Nikolaeva, i in. Synthesis of Betulinic Acid from Betulin Extract and Study of the Antiviral and Antiulcer Activity of Some Related Terpenoids. *Pharm. Chem. J.*, 36(9): 484–487, 2002.
- [47] O. Flekhter, I. Smirnova, F. Galin, G. Giniyatullina, E. Tret'yakova, G. Tolstikov. Synthesis of 30-amino derivatives of 3, 28-di-O-acetylbetulin. *Chem. Nat. Compd.*, 40(6): 571–573, 2004.
- [48] O. B. Flekhter, L. A. Baltina, G. A. Tolstikov. Glycols in the Stereoselective Synthesis of Triterpene 2-Deoxy- α -L-Glycosides under Conditions of Acidic Catalysis. *J. Nat. Prod.*, 63: 992–994, 2000.
- [49] H. Fuchino, S. Konishi, T. Satoh, A. Yagi, K. Saitsu, T. Tatsumi, N. Tanaka. A Biodegradation Product of Betulin. *Chem. Pharm. Bull.*, 42(2): 379–381, 1994.
- [50] H. Fuchino, T. Satoh, M. Shimizu, N. Tanaka. Chemical Evaluation of *Betula* Species in Japan. IV. Constituents of *Betula davurica*. *Chem. Pharm. Bull.*, 46(1): 166–168, 1998.
- [51] H. Fuchino, T. Satoh, N. Tanaka. Chemical Evaluation of *Betula* Species in Japan. III. Constituents of *Betula maximowicziana*. *Chem. Pharm. Bull.*, 44(9): 1748–1753, 1996.
- [52] H. Fuchino, T. Satoh, M. Yokochi, N. Tanaka. Chemical Evaluation of *Betula* Species in Japan. V. Constituents of *Betula ovalifolia*. *Chem. Pharm. Bull.*, 46(1): 169–170, 1998.

- [53] Y. Fukuda, K. Sakai, S. Matsunaga, H. Tokuda, R. Tanaka. Cancer chemopreventive activity of lupane- and oleanane-type triterpenoids from the cones of *Liquidamber styraciflua*. *Chem. Biodivers.*, 2: 421–427, 2005.
- [54] Y. Fukuda, K. Sakai, S. Matsunaga, H. Tokuda, R. Tanaka. Cancer chemopreventive effect of orally administrated lupane-type triterpenoid on ultraviolet light B induced photocarcinogenesis of hairless mouse. *Cancer Lett.*, 240(1): 94–101, 2006.
- [55] S. Fulda, C. Friesen, M. Los, C. Scaffidi, W. Mier, M. Benedict, G. Nuñez, P. H. Krammer, M. E. Peter, K. M. Debatin. Betulinic acid triggers cd95 (apo-1/fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Res.*, 57: 4956–4964, 1997.
- [56] S. Fulda, I. Jeremias, H. H. Steiner, T. Pietsch, K. M. Debatin. Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int. J. Cancer.*, 82: 435–441, 1999.
- [57] S. Fulda, C. Scaffidi, S. A. Susin, P. H. Krammer, G. Kroemer, M. E. Peter, K. M. Debatin. Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J. Biol. Chem.*, 273: 33942–33948, 1998.
- [58] S. Fulda, S. A. Susin, G. Kroemer, K. M. Debatin. Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells. *Cancer Res.*, 58: 4453–4460, 1998.
- [59] P. Furet, A. Sele, N. Cohen. 3 D molecular lipophilicity potential profiles: A new tool in molecular modeling. *J. Mol. Graph.*, 6(4): 182–189, 1988.
- [60] C. Gauthier, J. Legault, M. Lebrun, P. Dufour, A. Pichette. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.*, 14: 6713–6725, 2006.
- [61] T. Geetha, P. Varalakshmi. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in adjuvant-induced arthritis. *Fitoterapia*, 59: 13–19, 1998.
- [62] Y. Gong, K. M. Raj, C. A. Luscombe, I. Gadawski, T. Tam, J. Chu, D. Gibson, R. Carlson, S. L. Sacks. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antiviral Res.*, 64: 127–130, 2004.
- [63] A. González, I. Jiménez, A. Ravelo. Triterpenes from *Maytenus canariensis* and synthesis of a derivative from betulin. *Pharmacognosy*, 31: 2069–2072, 1992.
- [64] D. V. R. Gopal, A. A. Narkar, Y. Badrinath, K. P. Mishra, D. S. Joshi. Protection of Ewing's sarcoma family tumor (ESFT) cell line SK-N-MC from betulinic acid induced apoptosis by α -DL-tocopherol. *Toxicol. Lett.*, 153: 201–212, 2004.
- [65] D. V. R. Gopal, A. A. Narkar, Y. Badrinath, K. P. Mishra, D. S. Joshi. Betulinic acid induces apoptosis in human chronic myelogenous leukemia (CML) cell line K-562 without altering the levels of Bcr-Abl. *Toxicol. Lett.*, 155: 343–351, 2005.
- [66] V. Grishkovets. Synthesis of triterpenoid sulfates using the SO₃-dimethyl sulfoxide complex. *Chem. Nat. Compd.*, 35(1): 73–74, 1999.

- [67] T. Hartmann, J. Schmitt. Lipophilicity — beyond octanol/water: a short comparison of modern technologies. *Drug Discov. Today*, 1: 431–439, 2004.
- [68] F. Hashimoto, Y. Kashiwada, L. M. Cosentino, C. H. Chen, P. E. Garrett, K. H. Lee. Anti-AIDS agents—XXVII. *Bioorg. Med. Chem.*, 5: 2133–2143, 1997.
- [69] G. Haslam, M. Richter, D. Wyatt, Q. Ye, P. Kitos. Estimating the number of viable animal cells in multiwell culture—a tetrazolium-based assay. *Anal. Biochem.*, 336(2): 187–195, 2005.
- [70] E. W. H. Hayek, U. Jordis, W. Moche, F. Sauter. A Bicentennial of Betulin. *Phytochem.*, 28: 2229–2242, 1989.
- [71] J. Hierholzer, E. Castells, G. Banks, J. Bryan, C. McEwen. Sensitivity of NCI-H292 human lung mucoepidermoid cells for respiratory and other human viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 31(6): 1504–1510, 1993.
- [72] K. Hiroya, T. Takahashi, N. Miura, A. Naganuma, T. Sakamoto. Synthesis of Betulin Derivatives and Their Protective Effects Against the Cytotoxicity of Cadmium. *Bioorg. Med. Chem.*, 10: 3229–3236, 2002.
- [73] R. Horobin, S. Trapp, V. Weissig. Mitochondriotropics: A review of their mode of action, and their applications for drug and DNA delivery to mammalian mitochondria. *J. Control. Release*, 121(3): 125–136, 2007.
- [74] L. Huang, P. Ho, K. H. Lee, C. H. Chen. Synthesis and anti-hiv activity of bi-functional betulinic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, 14: 2279–2289, 2005.
- [75] A. Huguet, M. del Carmen Recio, S. Máñez, R. Giner, J. Ríos. Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase c activators, neuronally acting irritants and other agents. *Eur. J. Pharmacol.*, 410: 69–81, 2000.
- [76] K. Ishihara, M. Nakayama, S. Ohara, H. Yamamoto. Direct ester condensation from a 1: 1 mixture of carboxylic acids and alcohols catalyzed by hafnium(iv) or zirconium(iv) salts. *Tetrah.*, 58(41): 8179–8188, 2002.
- [77] P. Jääskeläinen. Betulinol and its utilization. *Paperi ja Puu — Papper och Trä*, 10: 599–603, 1981.
- [78] Z. Janeczko, J. Sendra, K. Kmiec, H. Brieskorn. A Triterpenoid Glycoside from *Menyanthes trifoliata*. *Phytochem.*, 29: 3885–3887, 1990.
- [79] H. J. Jeong, H. B. Chai, S. Y. Park, D. S. Kim. Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9: 1201–1204, 1999.
- [80] I. Jeremias, H. H. Steiner, A. Benner, K. M. Debatin, C. Herold-Mende. Cell death induction by betulinic acid, ceramide and TRAIL in primary glioblastoma multiforme cells. *Acta Neurochir. (Wien)*, 146: 721–729, 2004.

- [81] Z. Ji, W. Ye, G. Liu, W. Hsiao. 23-Hydroxybetulinic acid-mediated apoptosis is accompanied by decreases in bcl-2 expression and telomerase activity in HL-60 Cells. *Life Sci.*, 72(1): 1–9, 2002.
- [82] T. Jin, R. Tian, L. Liu, Y. Zhao, T. Li. Silica Sulfate, an Efficient Catalyst for the Trimethylsilylation of Alcohols. *Synth. Commun.*, 36(13): 1823–1828, 2006.
- [83] W. Jin, X. Cai, M. Na, J. Lee, K. Bae. Triterpenoids and Diarylheptanoids from. *Arch. Pharm. Res.*, 30(4): 412–418, 2007.
- [84] M. Jung, B. Duclos. Synthetic approach to analogues of betulinic acid. *Tetrah.*, 62(40): 9321–9334, 2006.
- [85] M. V. T. K Paech. *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Dritter Band*, wolumen 3. Springer-Verlag, Berlin, 1955.
- [86] J. Kaczor, I. Klecha, W. Rzeski, R. Paduch, B. Zdzisińska, P. Pożarowski, M. Kandefier-Szerszeń. Ekstrakt z poroka brzozowego (*Piptoporus betulinus* bull. fr.) jako inhibitor wzrostu ludzkich komórek nowotworowych. *Postępy Fitoterapii*, 12: 62–66, 2004.
- [87] B. Kaith. Neolupenol and antiinflammatory activity. *Pharm. Biol.*, 34(1): 73–75, 1996.
- [88] E. L. Kannenberg, K. Poralla. Hopanoid Biosynthesis and Function in Bacteria. *Naturwissenschaften*, 86: 168–176, 1999.
- [89] L. Karachurina, T. Sapozhnikova, F. Zarudii, O. Flekhter, F. Galin. Antiinflammatory and Antiulcer Properties of Betulin bis-Hemiphthalate. *Pharm. Chem. Journ.*, 36: 432–433, 2002.
- [90] Y. Kashiwada, J. Chiyo, Y. Ikeshiro, T. Nagao, H. Okabe, L. M. Cosentino, K. Fowke, K. H. Lee. 3,28-di-o-(dimethylsuccinyl)-betulin Isomers as Anti-HIV Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11: 183–185, 2001.
- [91] Y. Kashiwada, J. Chiyo, Y. Ikeshiro, T. Nagao, H. Okabe, L. M. Cosentino, K. Fowke, S. L. Morris-Natschke, K. H. Lee. Synthesis and anti-hiv activity of 3-alkylamido-3-deoxy-betulinic acid derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, 48: 1387–1390, 2000.
- [92] Y. Kashiwada, M. Sekiya, Y. Ikeshiro, T. Fujioka, N. R. Kilgore, C. T. Wild, G. P. Allaway, K. H. Lee. 3-o-glutaryl-dihydrobetulin and related monoacyl derivatives as potent anti-hiv agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 5851–5853, 2004.
- [93] E. Kępczyńska. *Zastosowanie metody TLC w badaniach lipoflowości wybranych grup związków*. Praca doktorska, Collegium Medicum Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2005.
- [94] E. Kępczyńska, E. Obłóza, A. Stasiewicz-Urban, J. Bojarski, A. Pyka. Lipophilicity of thiobarbiturates determined by tlc. *Acta Pol. Pharm. — Drug Res.*, 164(4): 295–302, 2007.

- [95] J. Kessler, F. Mullauer, G. de Roo, J. Medema. Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types. *Cancer Lett.*, 251: 132–145, 2006.
- [96] D. S. Kim, J. M. Pezzuto, E. Pisha. Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8: 1707–1712, 1998.
- [97] D. S. H. L. Kim, Z. D. Chen, V. T. Nguyen, J. M. Pezzuto, S. X. Qiu, Z. Z. Lu. A concise semi-synthetic approach to betulinic acid from betulin. *Synth. Commun.*, 27: 1607–1612, 1997.
- [98] J. Y. Kim, H. M. Koo, D. S. Kim. Development of C-20 Modified Betulinic Acid Derivatives as Antitumor Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11: 2405–2408, 2001.
- [99] H. Kircher. Triterpenes in organ pipe cactus. *Phytochem.*, 19: 2707–2712, 1980.
- [100] J. Klinot, N. Hovorková, A. Vystrčil. Triterpenes. XVIII. Oxidation of the Isopropenyl Group with Peracids. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 35: 1105–1119, 1970.
- [101] J. Klinot, V. Šumanová, A. Vystrčil. Triterpenes. XXI. 3,4-Seco Derivatives of Betulinic Acid. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 37: 603–609, 1972.
- [102] J. Klinot, J. Svetlý, E. Klinotová, A. Vystrčil. Preparation of isomeric 2-methyl-3-oxolupane-28-nitriles. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 50: 2918–2924, 1985.
- [103] B. P. Koch, J. Harder, R. J. Lara, G. Kattner. The effect of selective microbial degradation on the composition of mangrove derived pentacyclic triterpenols in surface sediments. *Org. Geochem.*, 36: 273–285, 2005.
- [104] S. Kohlmünzer. *Farmakognozja*. PZWL, Warszawa, 1998.
- [105] N. Komissarova, N. Belenkova, L. Spirikhin, O. Shitikova, M. Yunusov. Selective Oxidation of Betulin by Cr (VI) Reagents. *Chem. Nat. Compd.*, 38(1): 58–61, 2002.
- [106] A. Korovin, A. Tkachev. Synthesis of quinoxalines fused with triterpenes, ursolic acid and betulin derivatives. *Russ. Chem. Bull.*, 50(2): 304–310, 2001.
- [107] G. F. Koser. [Hydroxy(tosyloxy)iodo]benzene and Closely Related Iodanes: The Second Stage of Development. *Aldrichimica Acta*, 34(3): 89–101, 2001.
- [108] S. A. Kouzi, P. Chatterjee, J. M. Pezzuto, M. T. Hamann. Microbial transformations of the antimelanoma agent betulinic acid. *J. Nat. Prod.*, 63: 1653–1657, 2000.
- [109] T. Kushiro, M. Shibuya, Y. Ebizuka. Cryptic regioselectivity in deprotonation step of triterpene biosynthesis catalyzed by new members of lupeol synthase. *Tetrah. Lett.*, 40: 5553–5556, 1999.
- [110] T. Kushiro, M. Shibuya, K. Masuda, Y. Ebizuka. A novel multifunctional triterpene synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Tetrah. Lett.*, 41(40): 7705–7710, 2000.

- [111] M. Kvasnica, J. Sarek, E. Klinotova, P. Dzubak, M. Hajduch. Synthesis of phthalates of betulinic acid and betulin with cytotoxic activity. *Bioorg. Med. Chem.*, 13(10): 3447–54, 2005.
- [112] S. Lautrette, R. Granet, P. Krausz. A new method of solvent free O- and N-glycosylation using activated carbon fiber (ACF) as a promoter. Application to the synthesis of saponin and nucleoside analogues. *Chem. Commun. (Camb)*, 5: 586–587, 2004.
- [113] S. Lavoie, A. Pichette, F. X. Garneau, M. Girard, D. Gaudet. Synthesis of Betulin Derivatives with Solid Supported Reagents. *Synth. Commun.*, 31: 1565–1571, 2001.
- [114] J. Lehn, G. Ourisson. Synthèses dans la série du lupane. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1133–1136, 1962.
- [115] M. Lezhneva, E. Schultz, I. Bagryanskaya, Y. Gatilov, M. Shakirov, G. Tolstikov, S. Adekenov. Synthesis and crystal structure of 29,30-dibromoallobetulin. *Chem. Nat. Compd.*, 42: 186–188, 2006.
- [116] T.-S. Li, J.-X. Wang, X.-J. Zheng. Simple synthesis of allobetulin, 28-oxyallobetulin and related biomarkers from betulin and betulinic acid catalysed by solid acids. *Journ. of the Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1: 3957–3966, 1998.
- [117] E. Linkowska. Triterpenoids. Part XI. [1] Isomerization of Betulin and its Derivatives. *Polish J. Chem.*, 68: 875–876, 1994.
- [118] W. K. Liu, J. C. Ho, F. W. Cheung, B. P. Liu, W. C. Ye, C. T. Che. Apoptotic activity of betulinic acid derivatives on murine melanoma B16 cell line. *Eur. J. Pharmacol.*, 498: 71–78, 2004.
- [119] D. Lobner. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *J. Neurosci. Methods*, 96(2): 147–52, 2000.
- [120] T. V. Loc, T. V. Sung, C. Kamperdick, G. Adam. Synthesis of Amino Acid Conjugates and further derivatives of 3 α -Hydroxylup-20(29)ene-23,28-dioic acid. *J. für prakt. Chem.*, 342: 63–71, 2000.
- [121] Z. Ma, Y. Hano, F. Qiu, Y. Chen, T. Nomura. Determination of the absolute stereochemistry of lupane triterpenoids by fucofuranoside method and ord spectrum. *Tetrah. Lett.*, 45(16): 3261–3263, 2004.
- [122] S. Machatha, S. Yalkowsky. Comparison of the octanol/water partition coefficients calculated by ClogP $\text{\textcircled{R}}$, ACDlogP and KowWin $\text{\textcircled{R}}$ to experimentally determined values. *Int. J. Pharm.*, 294(1-2): 185–192, 2005.
- [123] F. Macias, A. Simonet, M. Esteban. Potential allelopathic lupane triterpenes from bioactive fractions of *Melilotus Messanensis**. *Phytochem.*, 36: 1369–1379, 1994.
- [124] F. Macias, A. Simonet, J. Galindo, P. Pacheco, J. Sanchez. Bioactive polar triterpenoids from *Melilotus messanensis*. *Phytochem.*, 49(3): 709–717, 1998.

- [125] S. Máñez, M. C. Recio, R. M. Giner, J. L. Ríos. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *Eur. J. Pharmacol.*, 334: 103–105, 1997.
- [126] Y. Marcus. Preferential solvation in mixed solvents. 14. Mixtures of 1,4-dioxane with organic solvents: Kirkwood-Buff integrals and volume-corrected preferential solvation parameters. *J. Mol. Liq.*, 128(1–3): 115–126, 2006.
- [127] K. Mazak, J. Vamos, A. Nemes, A. Racz, B. Noszal. Lipophilicity of vinpocetine and related compounds characterized by reversed-phase thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A*, 996(1): 195–203, 2003.
- [128] D. J. McGarvey, R. Croteau. Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 1015–1026, 1995.
- [129] N. Medvedeva, O. Flekhter, A. Gzella, L. Zaprutko. Structure of the minor ozonolysis product of 19 β , 28-epoxy-A-neo-18 α -olean-3 (5)-ene. *Chem. Nat. Comp.*, 42(5): 618–619, 2006.
- [130] V. Miškinienė, E. Dičkancaitė, A. Nemeikaitė, N. Čėnas. Nitroaromatic betulin derivatives as redox cycling agents. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 42(2): 391–397, 1997.
- [131] N. Miura, Y. Matsumoto, S. Miyairi, S. Nishiyama, A. Naganuma. Protective effects of triterpene compounds against the cytotoxicity of cadmium in HepG2 cells. *Mol. Pharmacol.*, 56: 1324–1328, 1999.
- [132] D. M. Moriarity, J. Huang, C. A. Yancey, P. Zhang, W. N. Setzer, R. O. Lawton, R. B. Bates, S. Caldera. Lupeol is the cytotoxic principle in the leaf extract of *Dendropanax cf. querceti*. *Planta Med.*, 64: 370–372, 1998.
- [133] T. J. Morzycki, W. Szczepek. *Nomenklatura steroidów (Zalecenia 1989)*. Biblioteka Wiadomości Chemicznych. Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław, 1994.
- [134] R. Mukherjee, M. Jaggi, P. Rajendran, M. J. Siddiqui, S. K. Srivastava, A. Vardhan, A. C. Burman. Betulinic acid and its derivatives as anti-angiogenic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 2181–2184, 2004.
- [135] R. Mukherjee, M. Jaggi, P. Rajendran, S. K. Srivastava, M. J. Siddiqui, A. Vardhan, A. C. Burman. Synthesis of 3-o-acyl/3-benzylidene/3-hydrazone/3-hydrazine/17-carboxyacryloyl ester derivatives of betulinic acid as anti-angiogenic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 3169–3172, 2004.
- [136] C. Mutai, D. Abatis, C. Vagias, D. Moreau, C. Roussakis, V. Roussis. Lupane Triterpenoids from *Acacia mellifera* with Cytotoxic Activity. *Molecules*, 12: 1035–1044, 2007.
- [137] Y. Nakagawa. Role of Mitochondrial Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase (PHGPx) as a Antiapoptotic Factor. *Biol. Pharm. Bull.*, 27(7): 956–960, 2004.
- [138] A. Nasal, D. Siluk, R. Kaliszan. Chromatographic retention parameters in medicinal chemistry and molecular pharmacology. *Curr. Med. Chem.*, 10: 381–426, 2003.

- [139] S. H. Oh, J. E. Choi, S. C. Lim. Protection of betulin against cadmium-induced apoptosis in hepatoma cells. *Toxicology*, 220: 1–12, 2006.
- [140] S. Ohara, T. Ohira. Plant growth regulation effects of triterpenoid saponins. *J. Wood Sci.*, 49: 59–64, 2003.
- [141] H. Ohvo-Rekilä, B. Ramstedt, P. Leppimäki, J. Slotte. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.*, 41(1): 66–97, 2002.
- [142] I. Okamoto, T. Takeya, Y. Kagawa, E. Kotani. Iron(iii)picolinate-Induced oxygenation and Subsequent Rearrangement of Triterpenoid Derivatives with Hydrogen Peroxide. *Chem. Pharm. Bull.*, 48: 120–125, 2000.
- [143] G. Ourisson. The evolution of terpenes to sterols. *Pure Appl. Chem.*, 61(3): 345–348, 1989.
- [144] G. Ourisson, P. Crabbé. *Les Triterpenes Tétracycliques*. Hermann, Paris, 1961.
- [145] H. Pakdel, J. Népo Murwanashyaka, C. Roy. Extraction of Betulin by Vacuum Pyrolysis of Birch Bark. *J. Wood Chem. Technol.*, 22(2): 147–155, 2002.
- [146] N. Perišić-Janjić, T. Djaković-Sekulić, K. Penov-Gaši. HPTLC chromatography of androstene derivates. Application of normal phase thin-layer chromatographic retention data in QSAR studies. *Steroids*, 70(3): 137–144, 2005.
- [147] N. Perišić-Janjić, T. Djaković-Sekulić, S. Stojanović, K. Penov-Gaši. Evaluation of the Lipophilicity of Some Dehydroepiandrosterone Derivates Using RP-18 HPTLC Chromatography. *Chromatographia*, 60: 201–205, 2004.
- [148] D. R. Phillips, J. M. Rasbery, B. Bartel, S. P. Matsuda. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9: 305–314, 2006.
- [149] A. Pichette, H. Liu, C. Roy, S. Tanguay, F. Simard, S. Lavoie. Selective Oxidation of Betulin for the Preparation of Betulinic Acid, an Antitumoral Compound. *Synth. Commun.*, 34(21): 3925–3937, 2004.
- [150] E. Pisha, H. Chai, I. S. Lee, T. E. Chagwedera, N. R. Farnsworth, G. A. Cordell, C. W. Beecher, H. H. Fong, A. D. Kinghorn, D. M. Brown. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat. Med.*, 1: 1046–1051, 1995.
- [151] J. Plumb. Effects of the pH dependence of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.*, 49(16): 4435–4440, 1989.
- [152] A. Pokrovskii, A. Shintyapina, N. Pronkina, V. Kozhevnikov, O. Plyasunova, E. Shul'ts, G. Tolstikov. Activation of apoptosis by derivatives of betulinic acid in human tumor cells in vitro. *Doklady Biochem. Bioph.*, 407(1): 94–97, 2006.
- [153] K. Poon, J. Zhang, C. Wang, A. Tse, C. Wan, W. Fong. Betulinic acid enhances $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D 3-induced differentiation in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Anti-Cancer Drugs*, 15(6): 619–624, 2004.

- [154] S. Pramanick, S. Mandal, S. Mukhopadhyay, S. Jha. Allylic Hydroxylation Through Acid Catalysed Epoxy Ring Opening of Betulinic Acid Derivatives. *Synth. Commun.*, 35(16): 2143–2148, 2005.
- [155] W. A. Prinz. Non-vesicular sterol transport in cells. *Prog. Lipid Res.*, 46: 297–314, 2007.
- [156] J. Protiva, L. Lepša, E. Klinotová, J. Klinot, V. Křeček, A. Vystrčil. Homogeneous Hydrogenation and Deuteration of Pentacyclic Triterpenoids: Double Bonds in Side-Chains. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 46: 2734–2741, 1981.
- [157] A. Pyka, M. Babuska. Lipophilicity of Selected Steroid Compounds. I. Investigations on RP18W Stationary Phase by RP-HPTLC. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Techn.*, 29(13): 1891–1903, 2006.
- [158] A. Pyka, M. Miszczyk. Chromatographic Evaluation of the Lipophilic Properties of Selected Pesticides. *Chromatographia*, 61(1): 37–42, 2005.
- [159] I. Recommendations. The Nomenclature of Steroids. *Pure Appl. Chem.*, 61: 1783–1822, 1989.
- [160] red: . J. K. Piotrowski. *Podstawy Toksykologii*. Wydawnictwa Naukowo Techniczne, Warszawa, 2006.
- [161] red: . J. Kawiak, M. Zabel. *Seminaria z Cytofizjologii*. Wydawnictwo Medyczne Urban and Partner, Wrocław, 2002.
- [162] C. P. Reyes, M. J. Núñez, I. A. Jiménez, J. Busserolles, M. J. Alcaraz, I. L. Bazzocchi. Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin e₂. *Bioorg. Med. Chem.*, 14: 1573–1579, 2005.
- [163] S. Rodríguez, H. Garda, H. Heinzen, P. Moyna. Effect of plant monofunctional pentacyclic triterpenes on the dynamic and structural properties of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *Chem. Phys. Lipids*, 89(2): 119–130, 1997.
- [164] M. Rohmer. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.*, 16: 565–574, 1999.
- [165] W. Rzeski, A. Stepulak, M. Szymański, M. Sifringer, J. Kaczor, K. Wejksza, B. Zdzisińska, M. Kandefer-Szerszeń. Betulinic acid decreases expression of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 374(1): 11–20, 2006.
- [166] S. Sabesan, S. Neira. Synthesis of 2-deoxy sugars from glycals. *J. Org. Chem.*, 56(18): 5468–5472, 1991.
- [167] M. Saleem, M.-H. Kweon, J.-M. Yun, V. M. Adhami, N. Khan, D. N. Syed, H. Mukhtar. A Novel Dietary Triterpene Lupeol Induces Fas-Mediated Apoptotic Death of Androgen-Sensitive Prostate Cancer Cells and Inhibits Tumor Growth in a Xenograft Model. *Cancer Res.*, 65(23): 11203–11213, 2005.

- [168] A. Sami, M. Taru, K. Salme, Y.-K. Jari. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 29: 1–13, 2006.
- [169] C. Sarbu, K. Kuhajda, S. Kevresan. Evaluation of the lipophilicity of bile acids and their derivatives by thin-layer chromatography and principal component analysis. *J. Chromatogr. A*, 917(1-2): 361–366, 2001.
- [170] N. Sawada, H. Arimochi, H. Fujino, K. Kataoka, K. Kondo, T. Kuwahara, T. Miyoshi, Y. Monden, T. Nagao, Y. Ohnishi, Y. Takahashi. Betulinic acid augments the inhibitory effects of vincristine on growth and lung metastasis of B16F10 melanoma cells in mice. *Brit. Journ. Cancer*, 90: 1672–1678, 2004.
- [171] B. B. Saxena, L. Zhu, M. Hao, E. Kisilis, M. Katdare, O. Oktem, A. Bomshteyn, P. Rathnam. Boc-lysinated-betulonic acid: a potent, anti-prostate cancer agent. *Bioorg. Med. Chem.*, 14: 6349–6358, 2006.
- [172] F. Schroeder, B. Atshaves, A. McIntosh, A. Gallegos, S. Storey, R. Parr, J. Jefferson, J. Ball, A. Kier. Sterol carrier protein-2: New roles in regulating lipid rafts and signaling. *BBA—Mol. Cell Biol. Lip.*, 1771(6): 700–718, 2007.
- [173] C. Schwerk, J. Prasad, K. Degenhardt, H. Erdjument-Bromage, E. White, P. Tempst, V. Kidd, J. Manley, J. Lahti, D. Reinberg. ASAP, a Novel Protein Complex Involved in RNA Processing and Apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 23(8): 2981–2990, 2003.
- [174] M. Segura, B. Jackson, S. Matsuda. Mutagenesis approaches to deduce structure–function relationships in terpene synthases. *Nat. Prod. Rep.*, 20: 304–317, 2003.
- [175] E. Selzer, C. Thallinger, C. Hoeller, P. Oberkleiner, V. Wacheck, H. Pehamberger, B. Jansen. Betulinic Acid-Induced Mcl-1 Expression in Human Melanoma —Mode of Action and Functional Significance. *Mol. Med.*, 8: 877–884, 2002.
- [176] M. Shibuya, H. Zhang, A. Endo, K. Shishikura, T. Kushiro, Y. Ebizuka. Two branches of the lupeol synthase gene in the molecular evolution of plant oxidosqualene cyclases, 1999.
- [177] M. Sholichin, K. Yamasaki, R. Kasai, O. Tanaka. ^{13}C nuclear magnetic resonance of lupane-type triterpenes, lupeol, betulin and betulinic acid. *Chem. Pharm. Bull.*, 28(3): 1006–1008, 1980.
- [178] R. Silverman. *Chemia organiczna w projektowaniu leków*. Wydawnictwa Naukowo Techniczne, Warszawa, 2004.
- [179] F. Simone, D. Klaus-Michael. Sensitization for Anticancer Drug-Induced Apoptosis by Betulinic Acid. *Neoplasia*, 7(2): 162–170, 2005.
- [180] L. B. Son, A. P. Kaplun, A. A. Spilevskii, I. u. E. Andia-Pravdivyĭ, S. G. Alekseeva, V. B. Gribor'ev, V. I. Shvets. [synthesis of betulinic acid from betulin and study of its solubilization using liposomes]. *Bioorg. Khim.*, 24: 787–793, 1998.
- [181] M. B. Sporn, N. Suh. Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis*, 21(3): 525–530, 2000.

- [182] N. Stiti, S. Triki, M. Hartmann. Formation of Triterpenoids throughout *Olea europaea* Fruit Ontogeny. *Lipids*, 42(1): 55–67, 2007.
- [183] I. C. Sun, C. H. Chen, Y. Kashiwada, J. H. Wu, H. K. Wang, K. H. Lee. Anti-aids agents 49. *J. Med. Chem.*, 45: 4271–4275, 2002.
- [184] I. C. Sun, J. K. Shen, H. K. Wang, L. M. Cosentino, K. H. Lee. Anti-aids agents. 32. synthesis and anti-hiv activity of betulin derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8: 1267–1272, 1998.
- [185] E. Suokas. *Studies on Chemical Transformations in the Lupane Series*. Praca doktorska, Helsinki University of Technology, Department of Chemistry, Espoo, Finland, 1977.
- [186] E. Suokas, T. Hase. The Stereochemistry at C-17 of Baccharis Oxide. the Synthesis of Baccharan-3 β -ol and Baccharan-3-one. *Acta Chem. Scand.*, 25: 2359–2360, 1971.
- [187] E. Suokas, T. Hase. Triterpenes. the Synthesis of Novel 18 β H19 β -Substituted Lupane Derivatives. *Acta Chem. Scand. B*, 28: 793–796, 1974.
- [188] E. Suokas, T. Hase. Triterpenes. a Novel acid Catalysed Double Bond Migration in 3 β ,28-diacetoxy-lup-20(30)-ene (Betulin Diacetate). *Acta Chem. Scand. B*, 29: 139–140, 1975.
- [189] E. Suokas, T. Hase. Triterpenes. BF₃ Catalysed Rearrangement of 3 β ,28-diacetoxy-18(α or β), 19(α or β)-epoxylupane. a Novel Route to Baccharane Derivatives. *Acta Chem. Scand. B*, 31: 231–234, 1977.
- [190] E. Suokas, T. Hase. Triterpenes. p-Toluenesulfonic Acid Catalysed Rearrangement of 18 α ,19 α and 18 β ,19 β Isomers of 3 β ,28-diacetoxy-epoxylupane. *Acta Chem. Scand. B*, 31: 182–184, 1977.
- [191] E. Suokas, T. Hase. Triterpenes. the HBr Catalysed Rearrangement of Lupenyl Acetate and Stereochemistry of the Epoxidation of the Products. *Acta Chem. Scand. B*, 31: 633–635, 1977.
- [192] A. Symon, N. Veselova, A. Kaplun, N. Vlasenkova, G. Fedorova, A. Lyutik, G. Gerasimova, V. Shvets. Synthesis and Antitumor Activity of Cyclopropane Derivatives of Betulinic and Betulonic Acids. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 31(3): 286–291, 2005.
- [193] A. Szuster-Ciesielska, M. Kandfer-Szerszeń. Protective effects of betulin and betulinic acid against ethanol-induced cytotoxicity in hepg2 cells. *Pharmacol. Rep.*, 57: 588–595, 2006.
- [194] H. Taipale. *Dammarane Triterpenes in Bark Resin of Betula Pendula Roth and Some Related Species*. University of Kuopio, 1995.
- [195] H. Taipale, J. Vepsäläinen, R. Laatikainen, P. Reichardt, S. Lapinjoki. Isolation and Structure Determination of Three Triterpenes from Bark Resin of Juvenile European White Birch. *Phytochem.*, 34(3): 755–758, 1993.

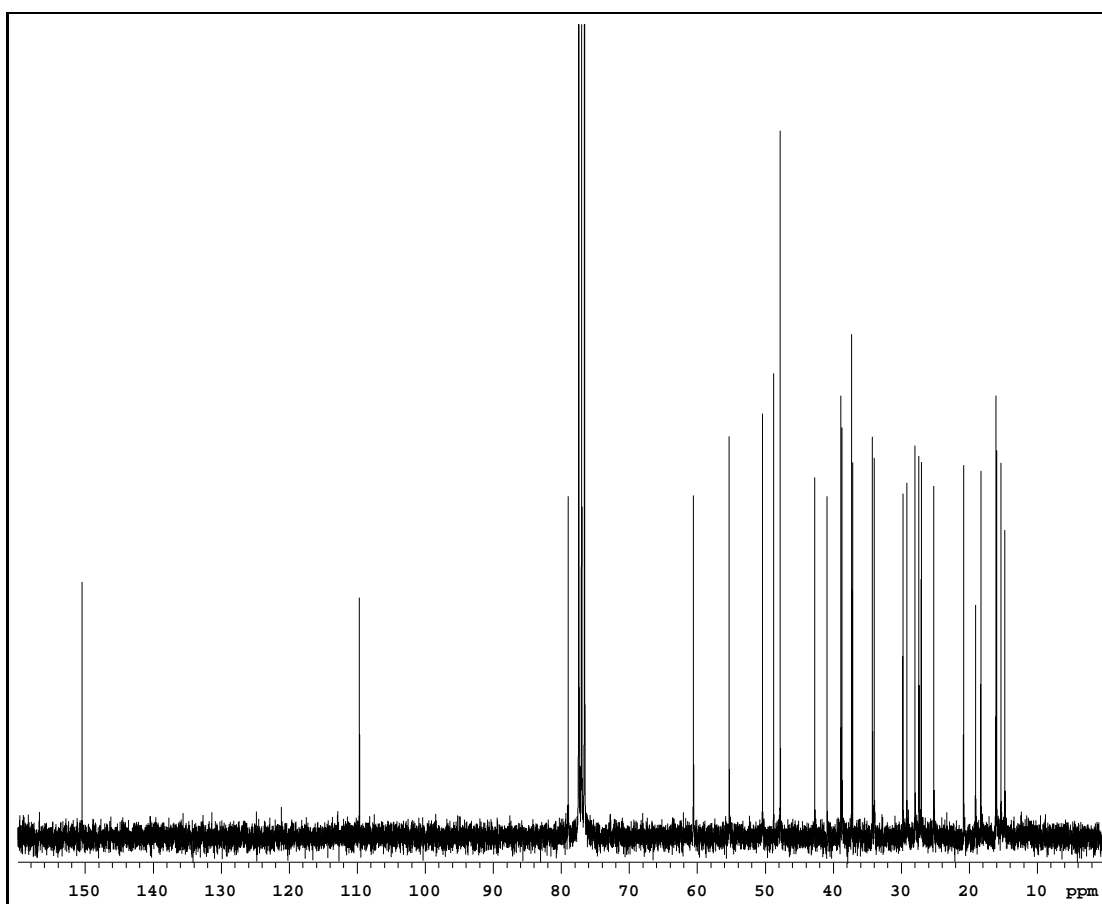
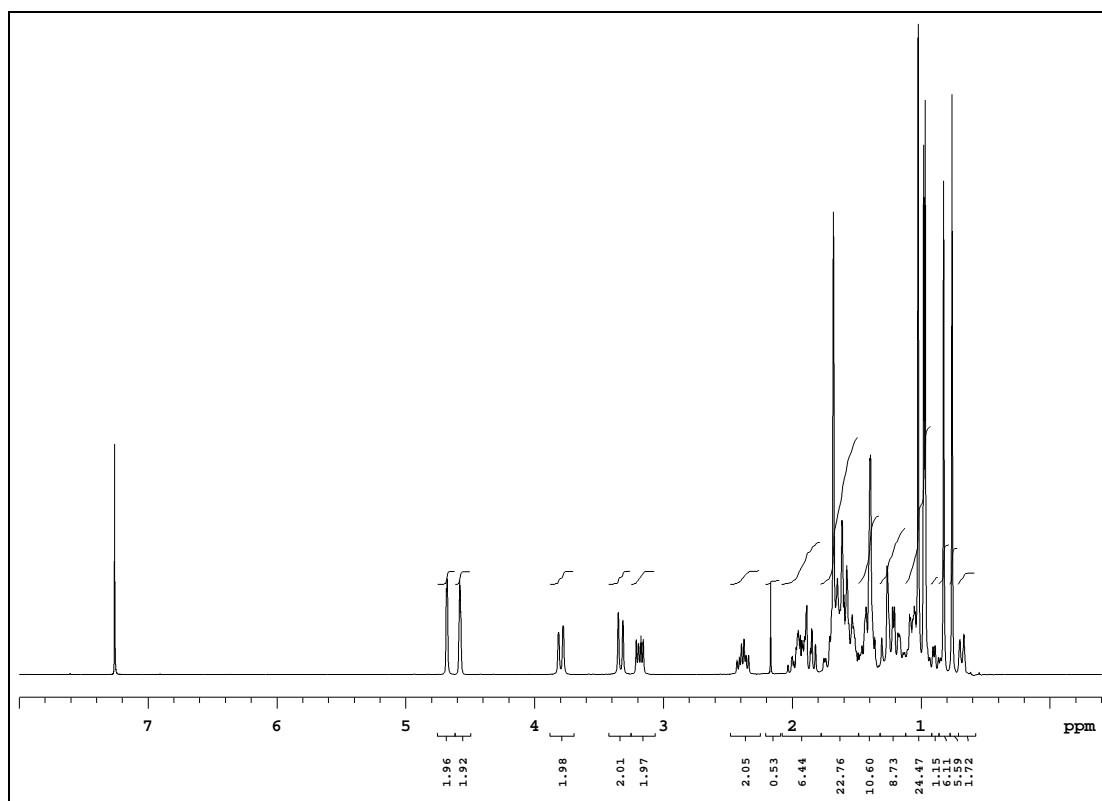
- [196] Y. Takada, B. B. Aggarwal. Betulinic Acid Suppresses Carcinogen-Induced NF- κ B Activation Through Inhibition of I κ B α Kinase and p65 Phosphorylation: Abrogation of Cyclooxygenase-2 and Matrix Metalloprotease-9. *J. Immunol.*, 171: 3278–3286, 2003.
- [197] Y. Tan, R. Yu, J. Pezzuto. Betulinic Acid-induced Programmed Cell Death in Human Melanoma Cells Involves Mitogen-activated Protein Kinase Activation. *Clin. Cancer Res.*, 9: 2866–2875, 2003.
- [198] A. Teixeira, A. Fernandes, A. Garcia, L. Ilharco, P. Brogueira, A. Gonçalves da Silva. Microdomains in mixed monolayers of oleanolic and stearic acids: thermodynamic study and BAM observation at the air–water interface and AFM and FTIR analysis of LB monolayers. *Chem. Phys. Lipids*, 149(1-2): 1–13, 2007.
- [199] D. Thibeault, C. Gauthier, J. Legault, J. Bouchard, P. Dufour, A. Pichette. Synthesis and structure—activity relationship study of cytotoxic germanicane- and lupane-type 3 β -O-monodesmosidic saponins starting from betulin. *Bioorg. Med. Chem.*, 15: 6144–6157, 2007.
- [200] D. Thurnher, D. Turhani, M. Pelzmann, B. Wannemacher, B. Knerer, M. Formanek, V. Wacheck, E. Selzer. Betulinic acid: a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells. *Head Neck*, 25: 732–740, 2003.
- [201] T. Tolstikova, I. Sorokina, G. Tolstikov, A. Tolstikov, O. Flekhter. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. Natural lupane derivatives. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 32: 37–49, 2006.
- [202] T. Tolstikova, I. Sorokina, G. Tolstikov, A. Tolstikov, O. Flekhter. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: II. semisynthetic lupane derivatives. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 32: 261–276, 2006.
- [203] H. C. Tseng, Y. C. Liu. Immobilized betulinic acid column and its interactions with phospholipase a2 and snake venom proteins. *J. Sep. Sci.*, 27: 1215–1220, 2004.
- [204] G. O. Udeani, G. M. Zhao, Y. G. Shin, B. P. Cooke, J. Graham, C. W. Beecher, A. D. Kinghorn, J. M. Pezzuto. Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in cd-1 mice. *Biopharm. Drug Dispos.*, 20: 379–383, 1999.
- [205] M. Urban, J. Sarek, J. Klinot, G. Korinkova, M. Hajduch. Synthesis of a-seco Derivatives of Betulinic Acid with Cytotoxic Activity. *J. Nat. Prod.*, 67: 1100–1105, 2004.
- [206] N. Uvarova, G. Oshitok, G. Elyakov. Synthesis of steroid and triterpenoid glycosides by the orthoester method. *Carbohydr. Res.*, 27: 79–87, 1973.
- [207] V. V. Vasnev, I. N. Konkina, V. V. Korshak, S. V. Vinogradova, J. J. Lindberg, P. Jääskeläinen, K. Piironen. Syntheses of unsaturated polyesters containing betulinol moieties. *Die Makromolekulare Chemie*, 188: 683–691, 1987.
- [208] L. Vidya, P. Varalakshmi. Control of urinary risk factors of stones by betulin and lupeol in experimental hyperoxaluria. *Fitoterapia*, 71: 535–543, 2000.

- [209] J. K. Volkman. Sterols and other triterpenoids: source specificity and evolution of biosynthetic pathways. *Org. Geochem.*, 36(2): 139–159, Feb 2005.
- [210] von L. Ružička, A. H. Lamberton, E. W. Christie. Zur Kenntnis der Triterpene. 41. Mitteilung. Oxydation des Betulin-mono-acetats mit Chromtrioxyd zu sauren Produkten. *Helv. Chim. Acta*, 21: 1706–1717, 1938.
- [211] A. Vystrčil, M. Buděšínský. Triterpenes. xvii. Preparation of New 19 α H-Lupane Derivatives. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 35: 312–320, 1970.
- [212] K. Wendt, G. Schulz, E. Corey, D. Liu. Enzyme mechanisms for polycyclic triterpene formation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 39: 2812–2833, 2000.
- [213] K. U. Wendt, K. Poralla, G. E. Schulz. Structure and function of a squalene cyclase. *Science*, 277: 1811–1815, 1997.
- [214] J. Weyermann, D. Lochmann, A. Zimmer. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharm.*, 288: 369–376, 2005.
- [215] A. White, E. J. Horsington, N. Nedjar, T. M. Peakman, J. A. Curiale. A Novel Demethylated Oxygenated Triterpenoid in Crude Oils from the Canadian Beaufort Sea and Northeast Alaska. *Tetrah. Lett.*, 39(19): 3031–3034, 1998.
- [216] W. Wick, C. Grimmel, B. Wagenknecht, J. Dichgans, M. Weller. Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 289: 1306–1312, 1999.
- [217] A. Wiśniewski, J. Madaj. *Podstawy chemii cukrów*. AGRA-ENVIRO Lab., Poznań-Gdańsk, 1997.
- [218] U. Wrzeciono, H. Dembczyńska. Azotowe pochodne trójterpenów. I. Pochodne lupanu. *Ann. Soc. Chim. Polonorum (Rocz Chem)*, 43: 1407–1412, 1969.
- [219] R. Xu, G. C. Fazio, S. P. Matsuda. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochem.*, 65: 261–291, 2004.
- [220] K. Yamashita, H. Lu, J. Lu, G. Chen, T. Yokoyama, Y. Sagara, M. Manabe, H. Kodama. 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*, 325: 91–96, 2002.
- [221] K. Yasukawa, M. Takido, T. Matsumoto, M. Takeuchi, S. Nakagawa. Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis. *Oncology*, 48: 72–76, 1991.
- [222] W. C. Ye, N. N. Ji, S. X. Zhao, J. H. Liu, T. Ye, M. A. McKerverey, P. Stevenson. Triterpenoids from *Pulsatilla chinensis*. *Phytochem.*, 42: 799–802, 1996.
- [223] Y. J. You, Y. Kim, N. H. Nam, B. Z. Ahn. Synthesis and cytotoxic activity of a-ring modified betulinic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13: 3137–3140, 2003.

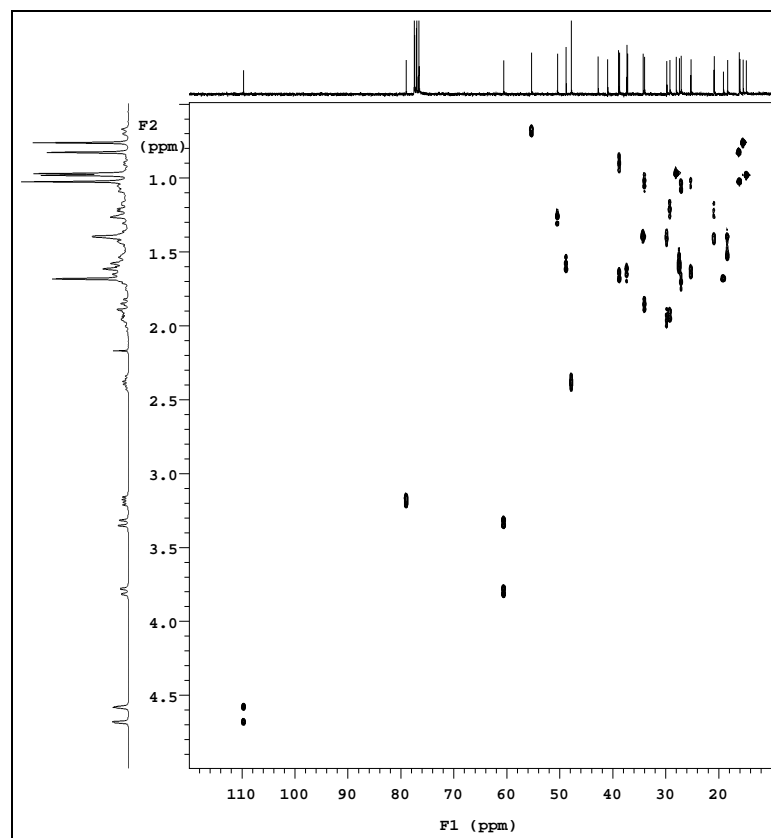
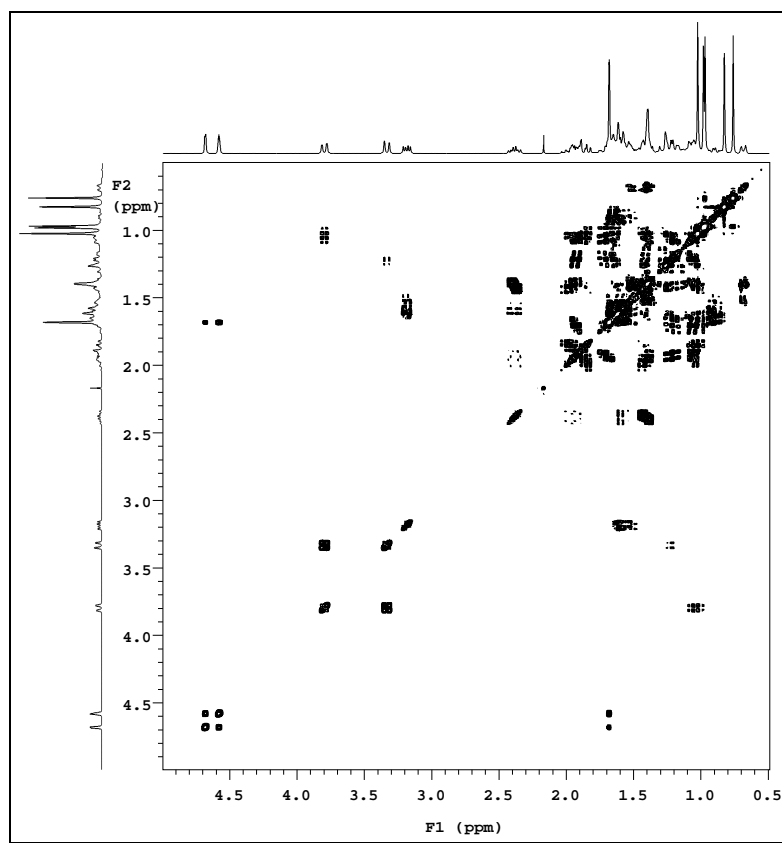
- [224] A. Yürüker, J. Orjala, O. Sticher, T. Rali. Triterpenes from *Rhus taitensis*. *Phytochem.*, 48: 863–866, 1998.
- [225] L. Zapór. *Ocena zależności pomiędzy strukturą i właściwościami fizykochemicznymi fenoli a ich cytotoksycznością podstawową*. Praca doktorska, Centralny Instytut Ochrony Pracy — Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa, 2003.
- [226] J. Zhang, Z. Cheng, B. Yu, G. Cordell, S. Qiu. Novel biotransformation of pentacyclic triterpenoid acids by *Nocardia* sp. nr1 5646. *Tetrah. Lett.*, 46: 2337–2340, 2005.
- [227] N. A. Zhukova, D. E. Semenov, I. V. Sorokina, T. G. Tolstikova, S. V. Pozdnyakova, O. R. Grek. Effect of betulonic acid and its derivative [3-oxo-20(29)-lupene-28-oyl]-3-aminopropionic acid on liver structure in mice with rls lymphoma. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 140: 361–364, 2005.
- [228] H. L. Ziegler, H. Franzyk, M. Sairafianpour, M. Tabatabai, M. D. Tehrani, K. Bagherzadeh, H. Hägerstrand, D. Staerk, J. W. Jaroszewski. Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of *Plasmodium falciparum* growth: structure-activity relationships for betulonic acid analogues. *Bioorg. Med. Chem.*, 12: 119–127, 2004.
- [229] V. Zuco, R. Supino, S. C. Righetti, L. Cleris, E. Marchesi, C. Gambacorti-Passerini, F. Formelli. Selective cytotoxicity of betulonic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.*, 175: 17–25, 2002.

Dodatek A

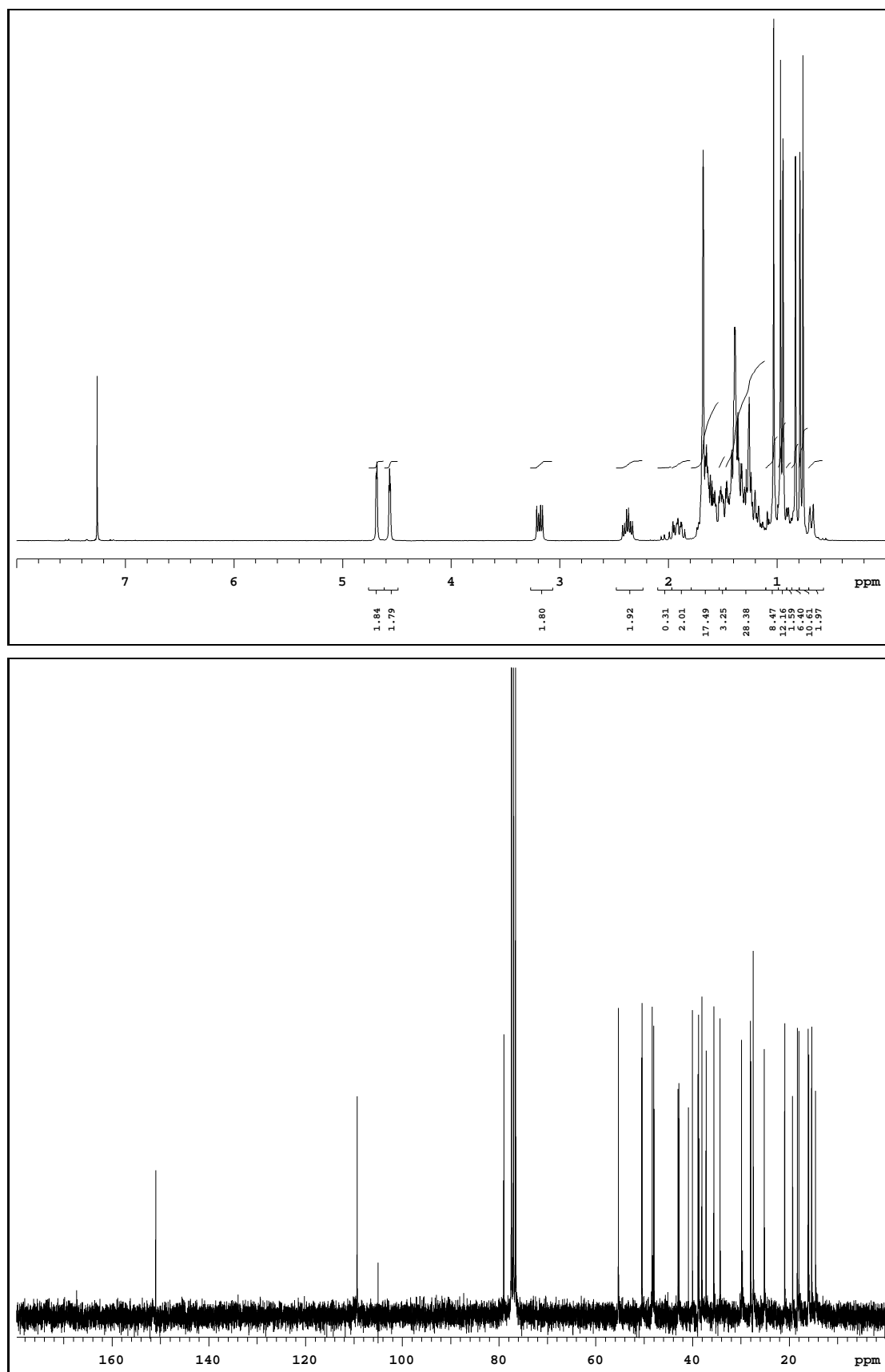
Zestawienie widm NMR ^1H i ^{13}C



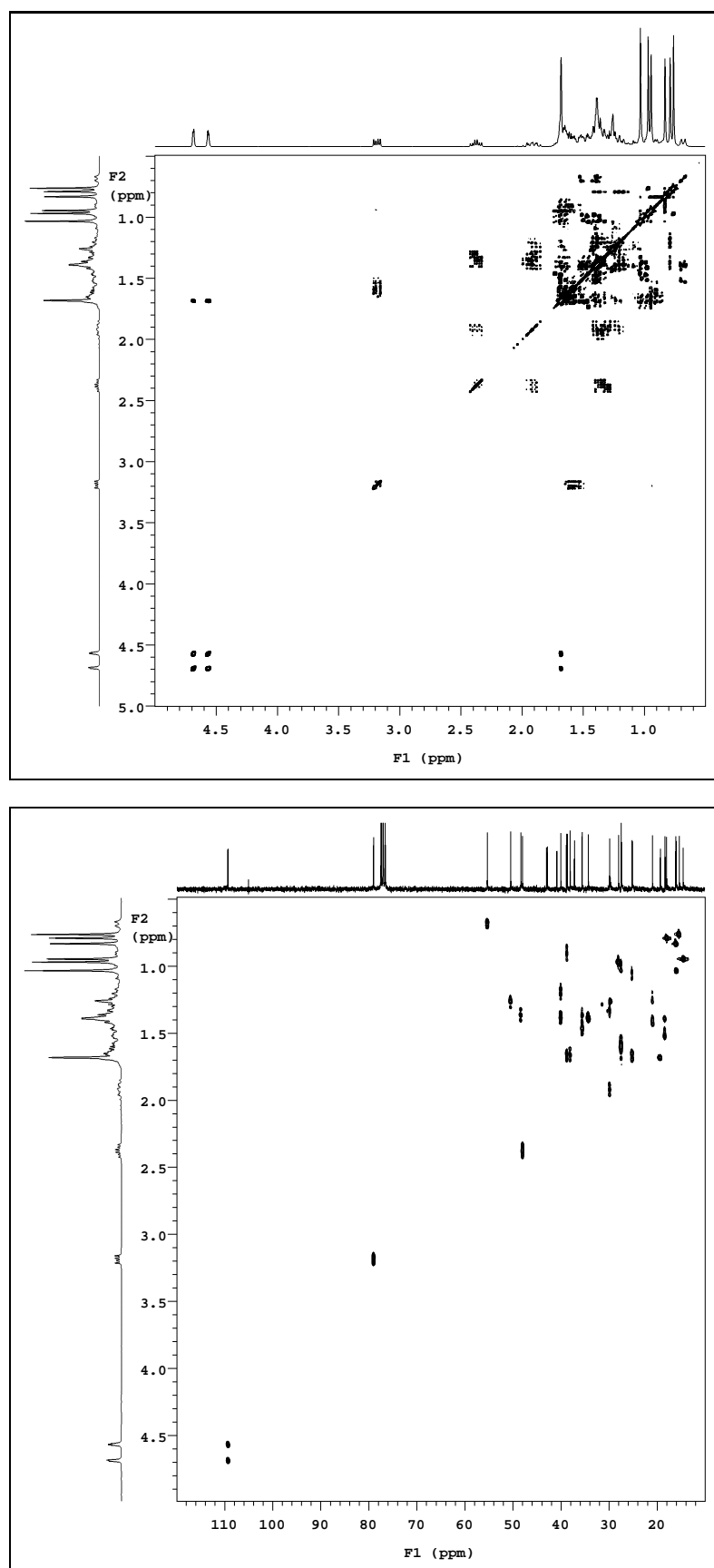
Rys. 1: Widma ^1H i ^{13}C betuliny (**BET**); rozp. CDCl_3



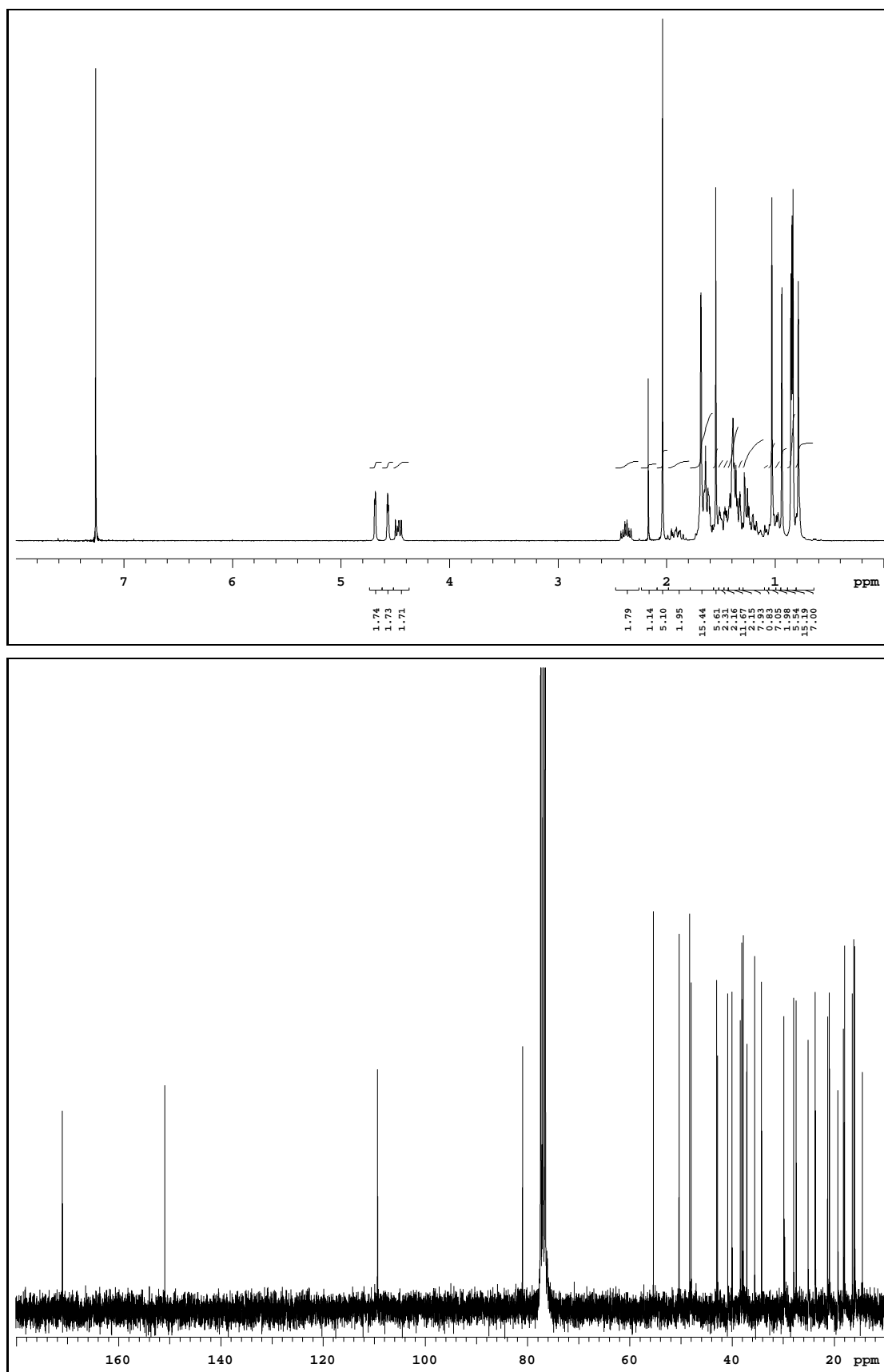
Rys. 2: Widma dwuwymiarowe COSY i HSQC betuliny (**BET**); rozp. CDCl_3



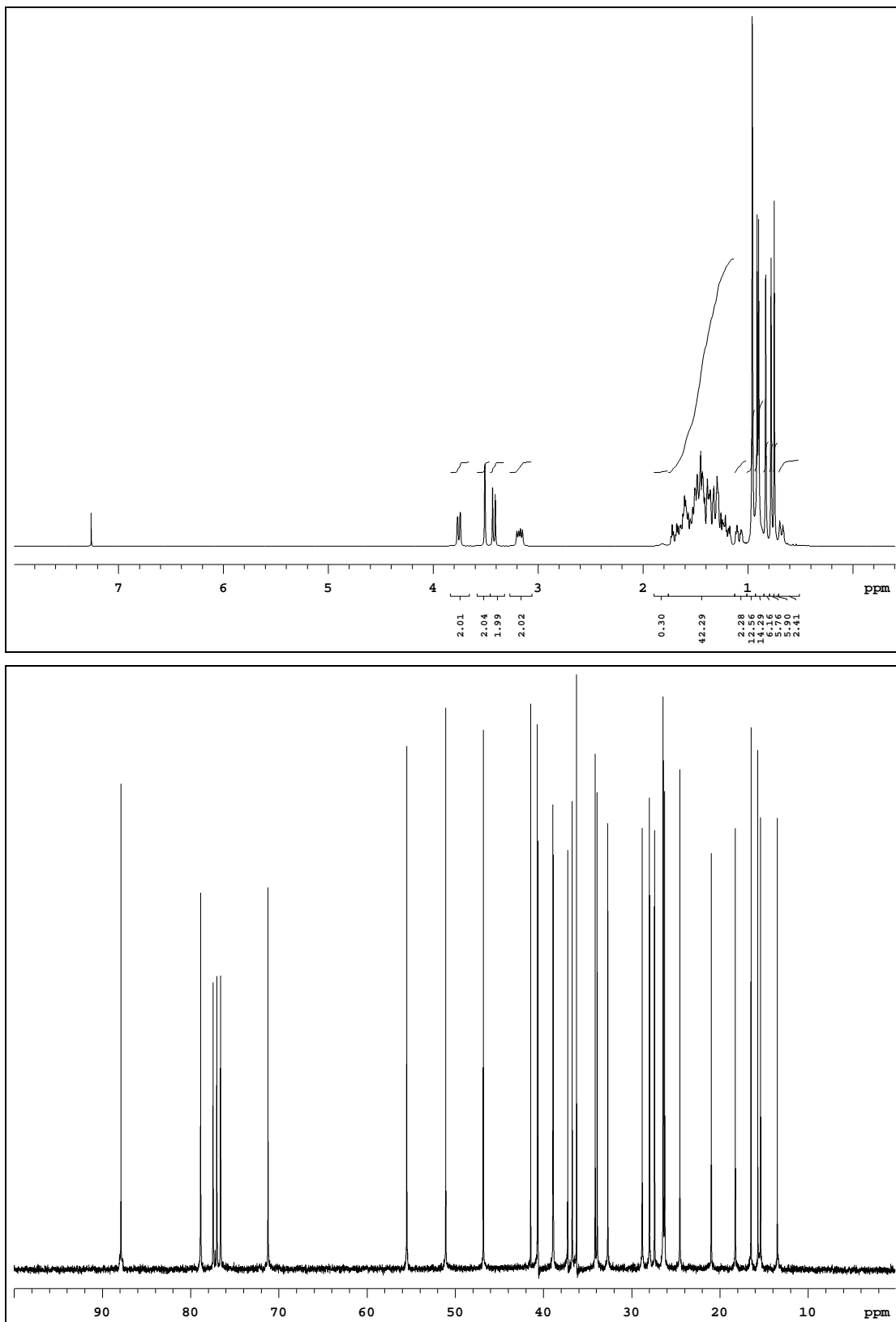
Rys. 3: Widma ^1H i ^{13}C lupeolu (LUP); rozp. CDCl_3



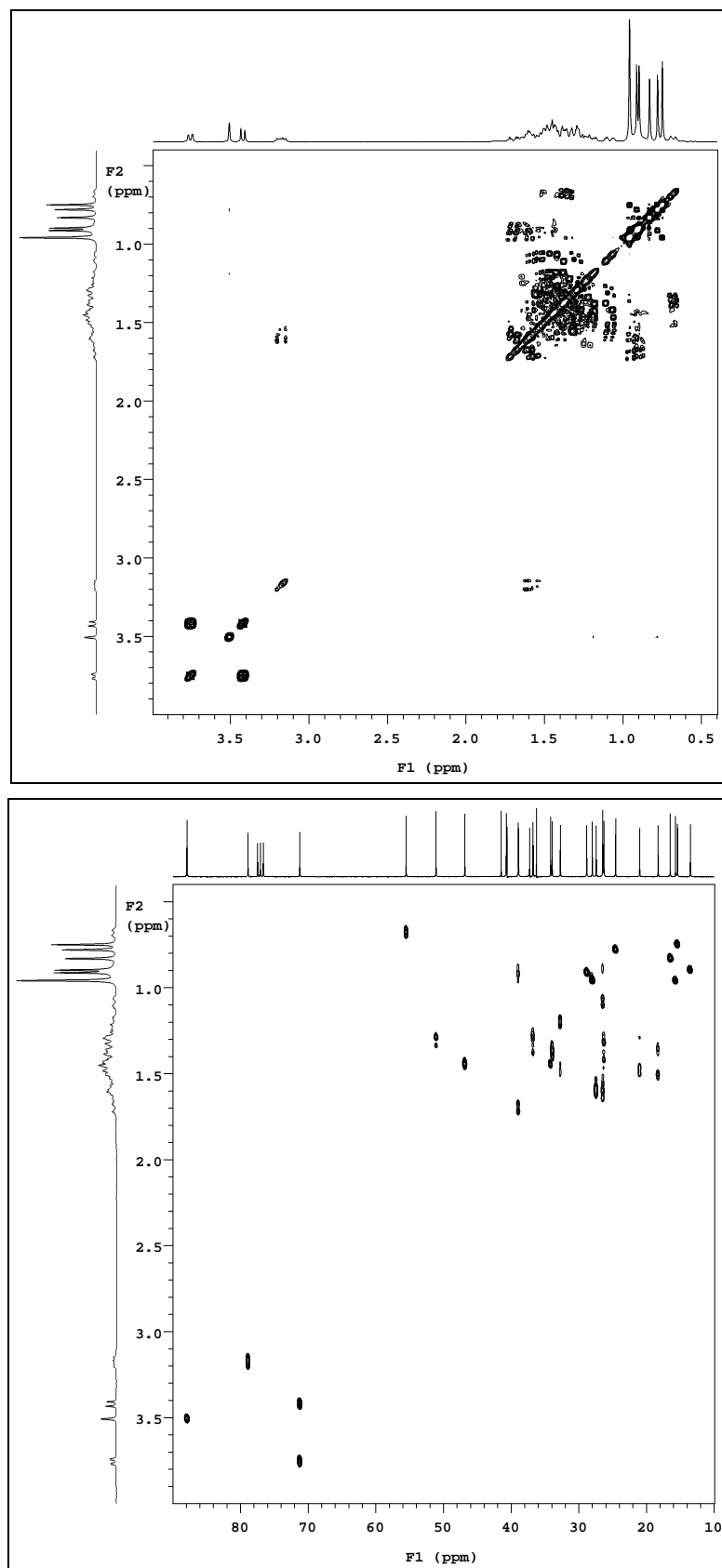
Rys. 4: Widma dwuwymiarowe COSY i HSQC lupeolu (LUP); rozp. CDCl₃



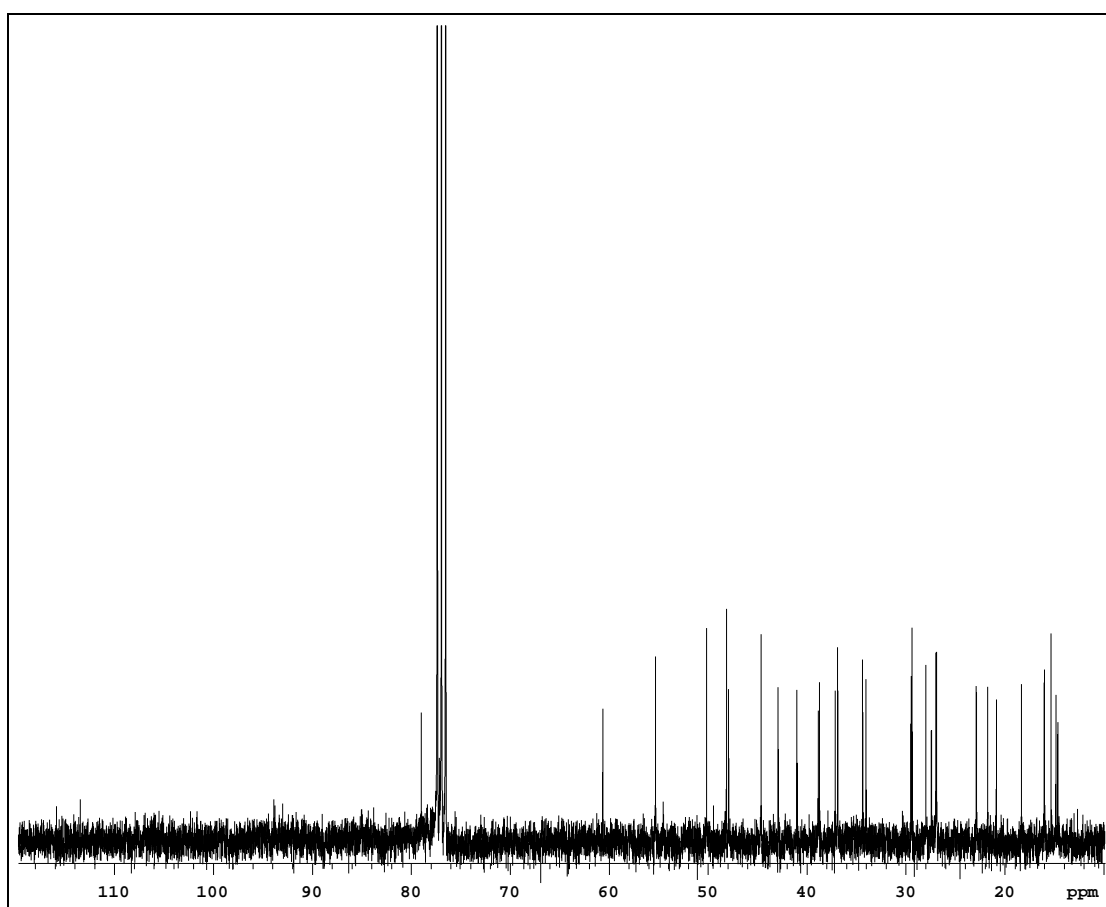
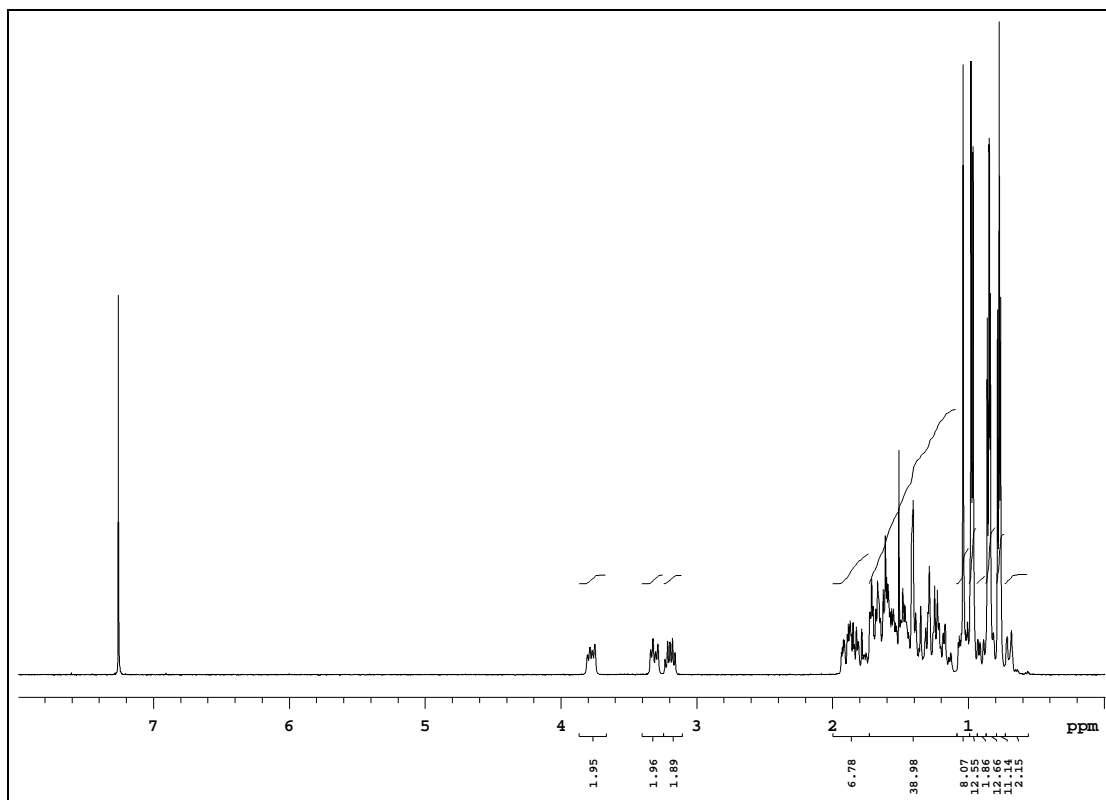
Rys. 5: Widma ^1H i ^{13}C octanu lupenyli (**ACLUP**); rozp. CDCl_3



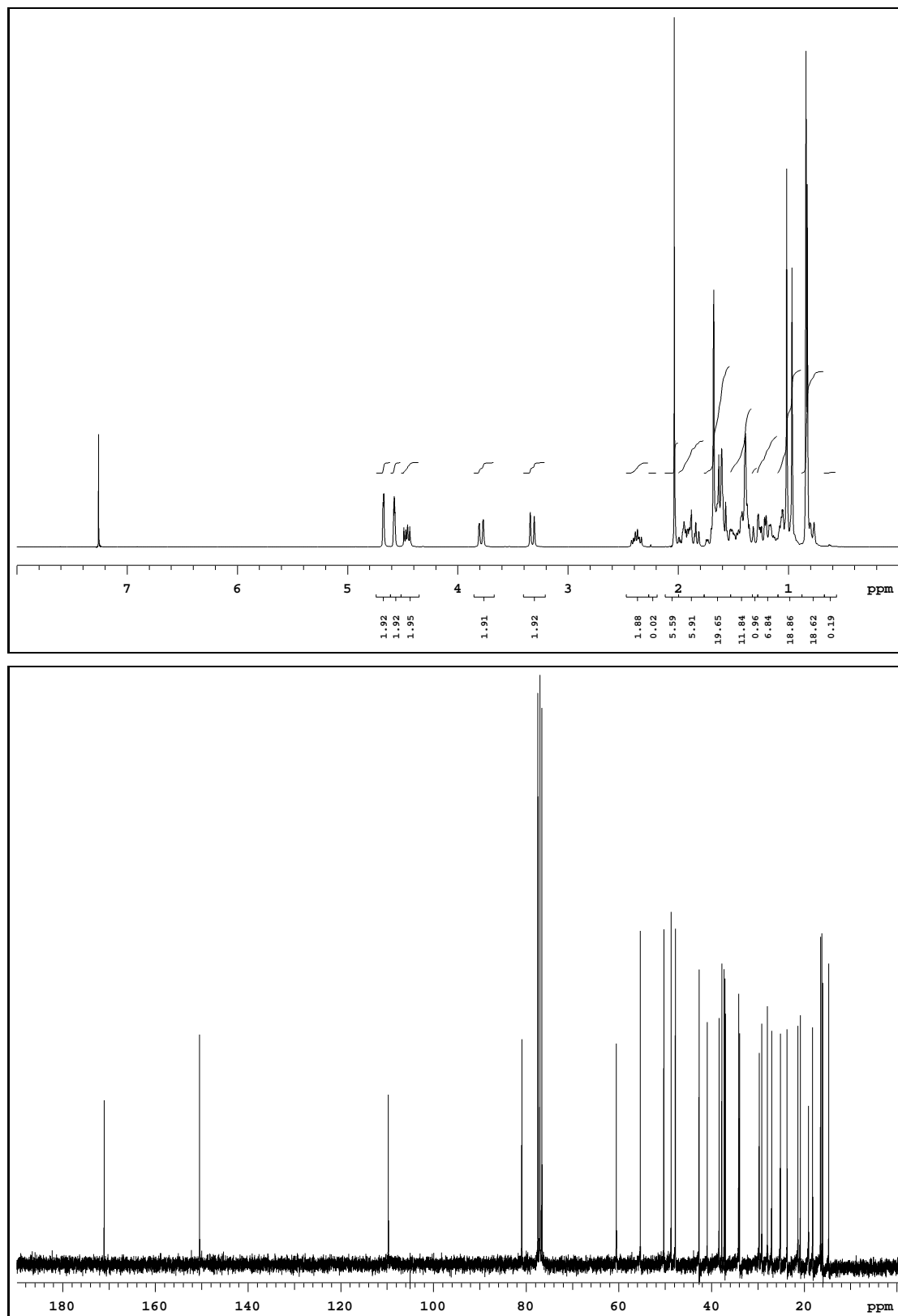
Rys. 6: Widma ^1H i ^{13}C allobetuliny (**ALLO**); rozp. CDCl_3



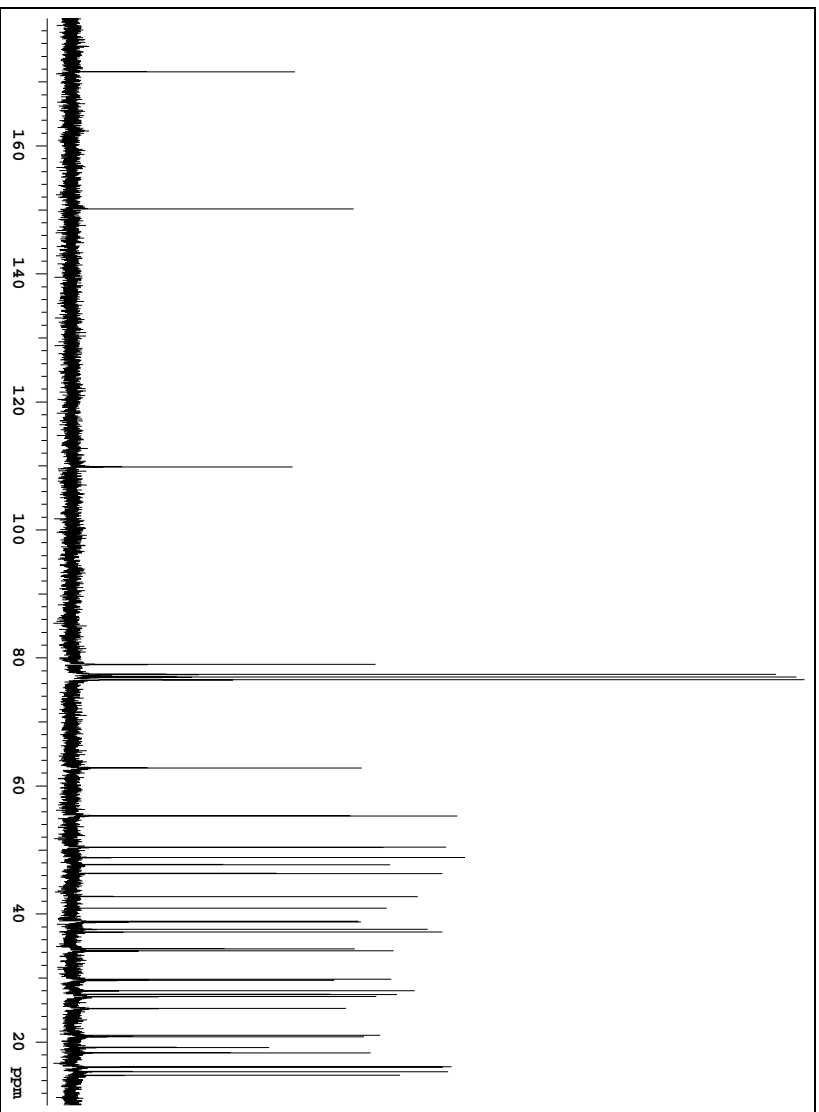
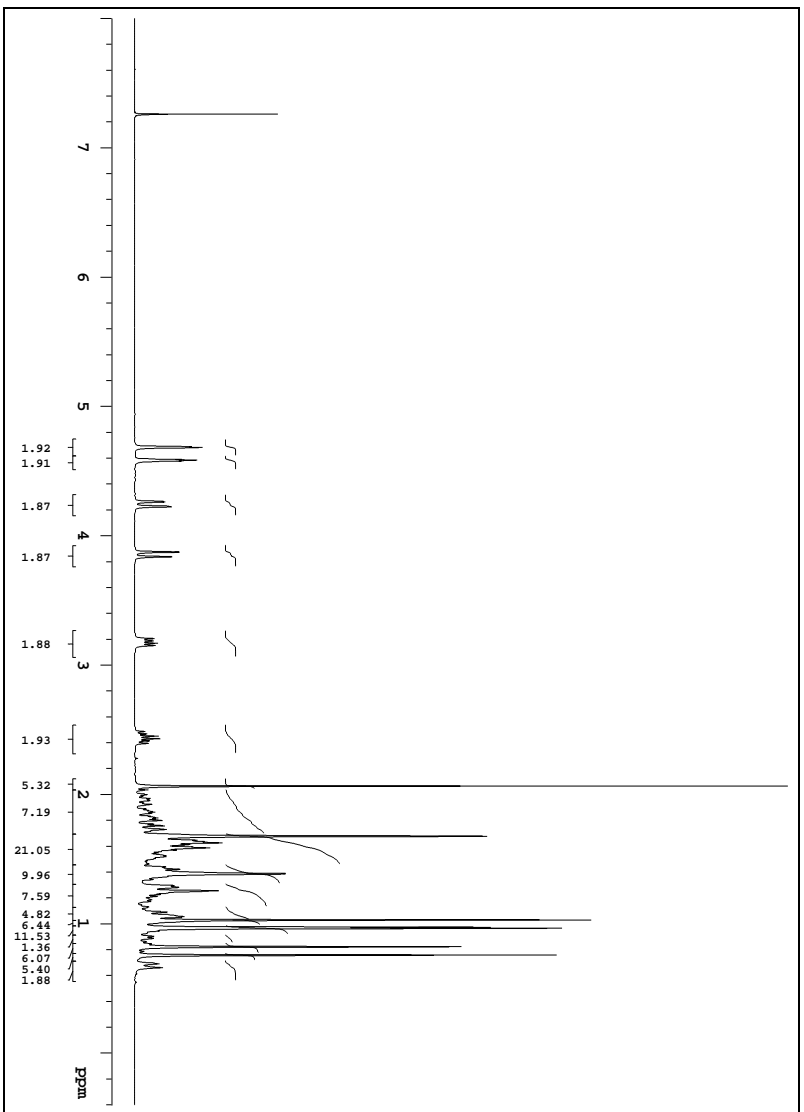
Rys. 7: Widma dwuwymiarowe COSY i HSQC allobetuliny (**ALLO**); rozp. CDCl_3



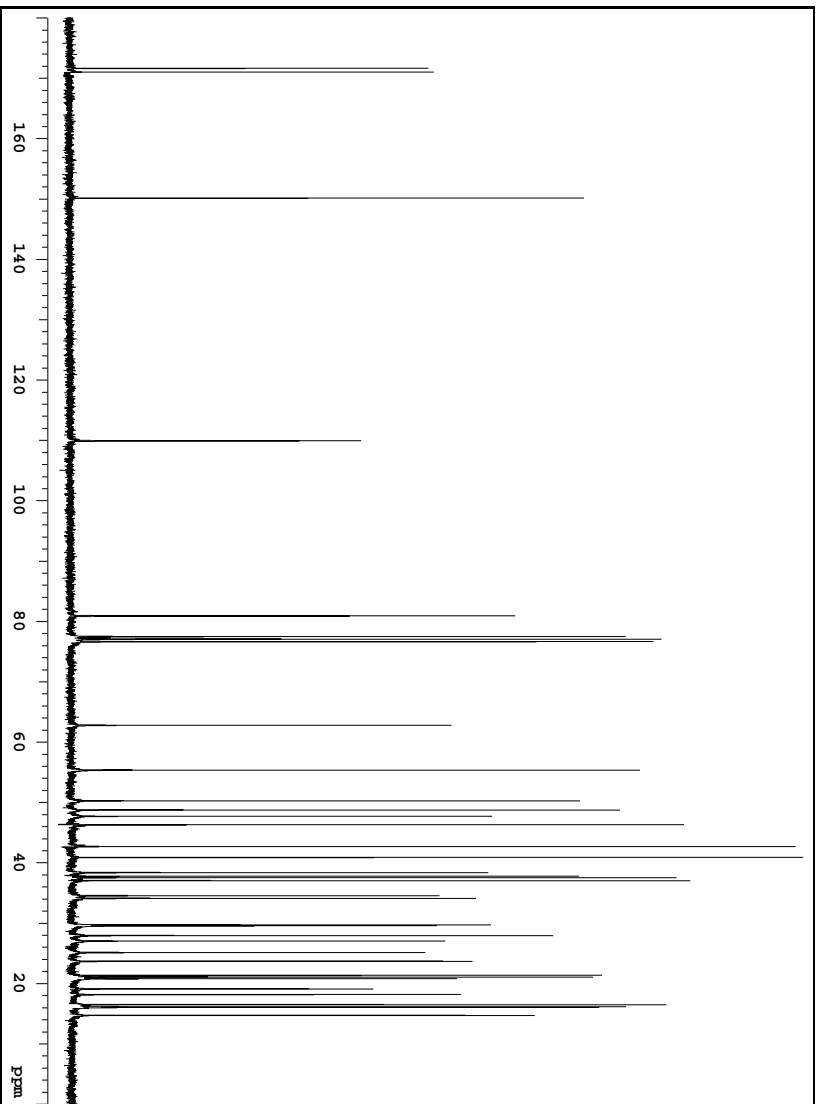
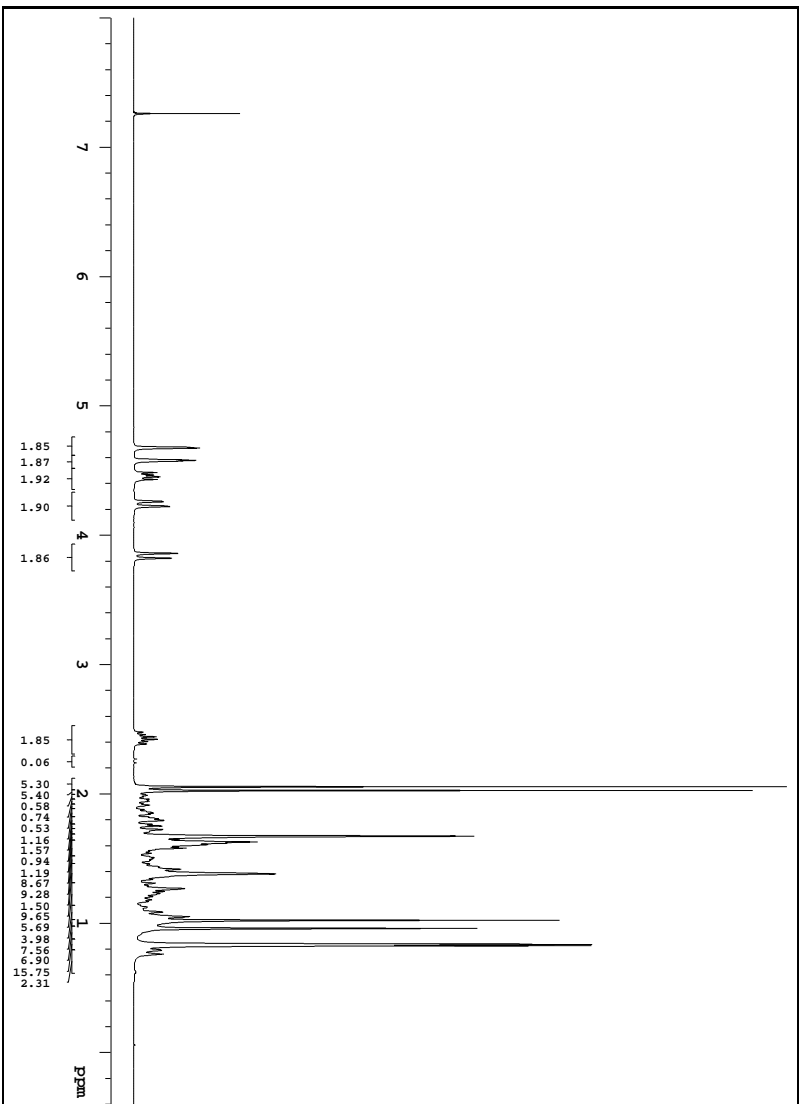
Rys. 8: Widma ¹H i ¹³C dihydrobetuliny (**DHB**); rozp. CDCl₃



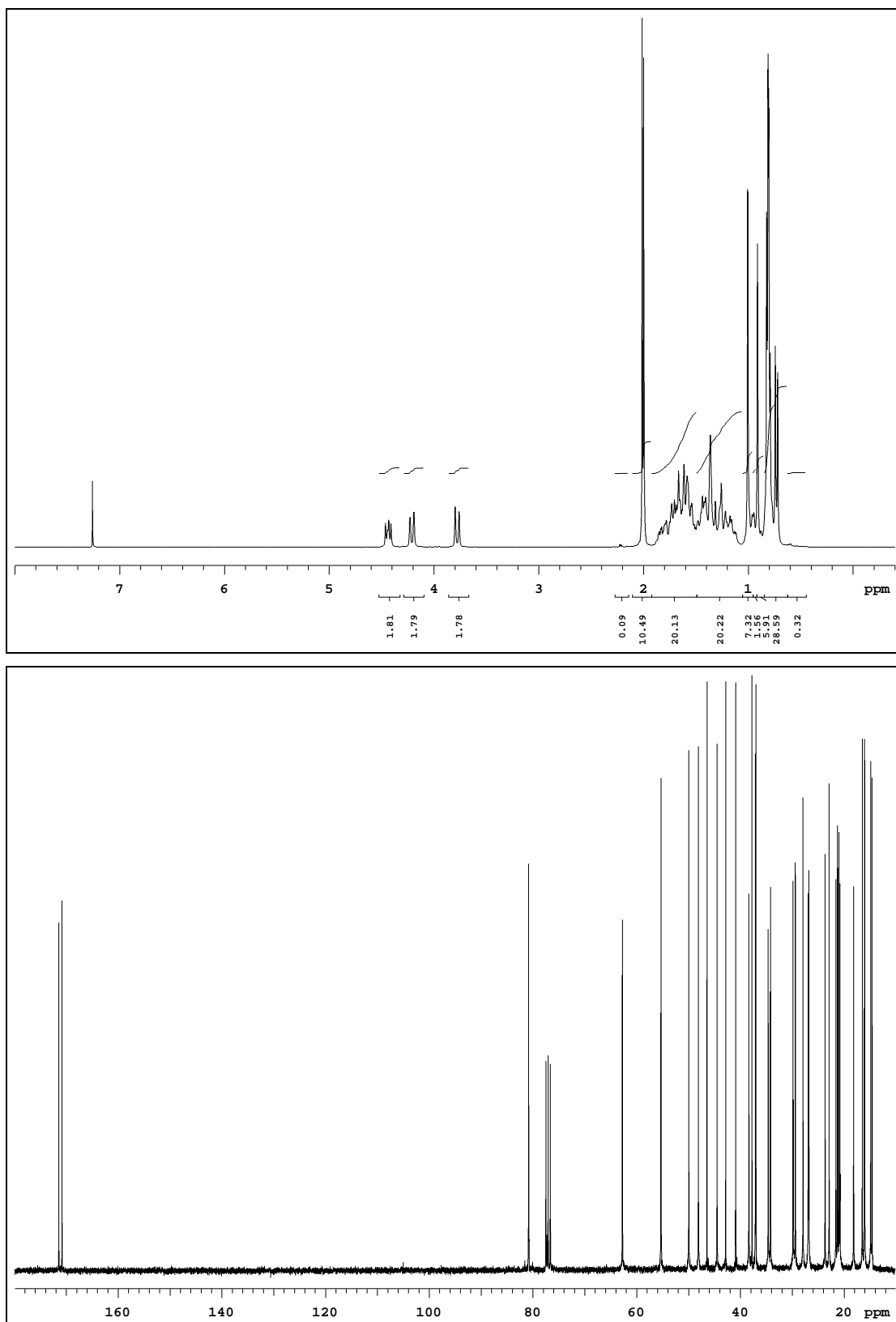
Rys. 9: Widma ^1H i ^{13}C 3-octanu betuliny (**3MOB**); rozp. CDCl_3



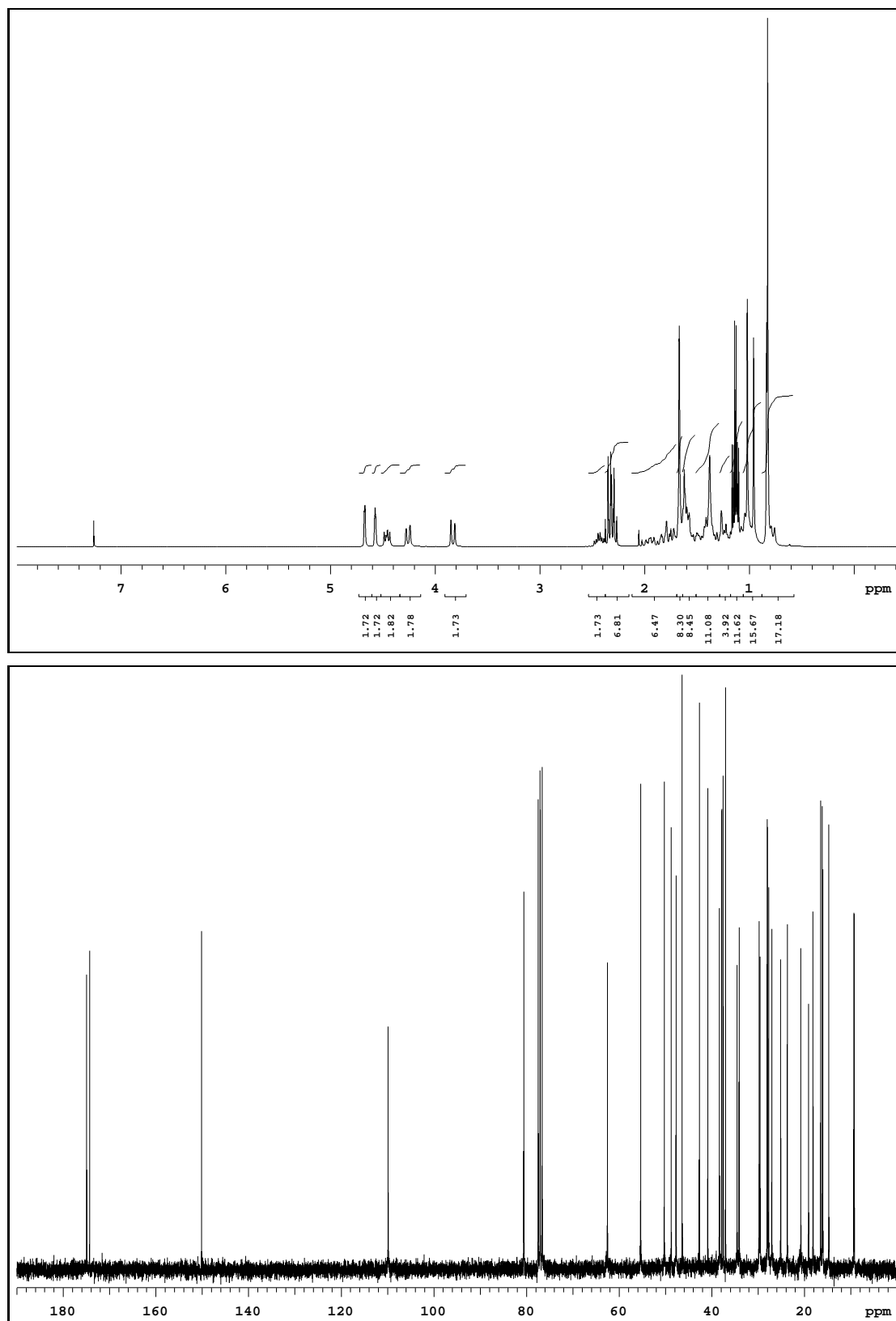
Rys. 10: Widma ^1H i ^{13}C 28-octamu betuliny (28MOB); rozp. CDCl_3



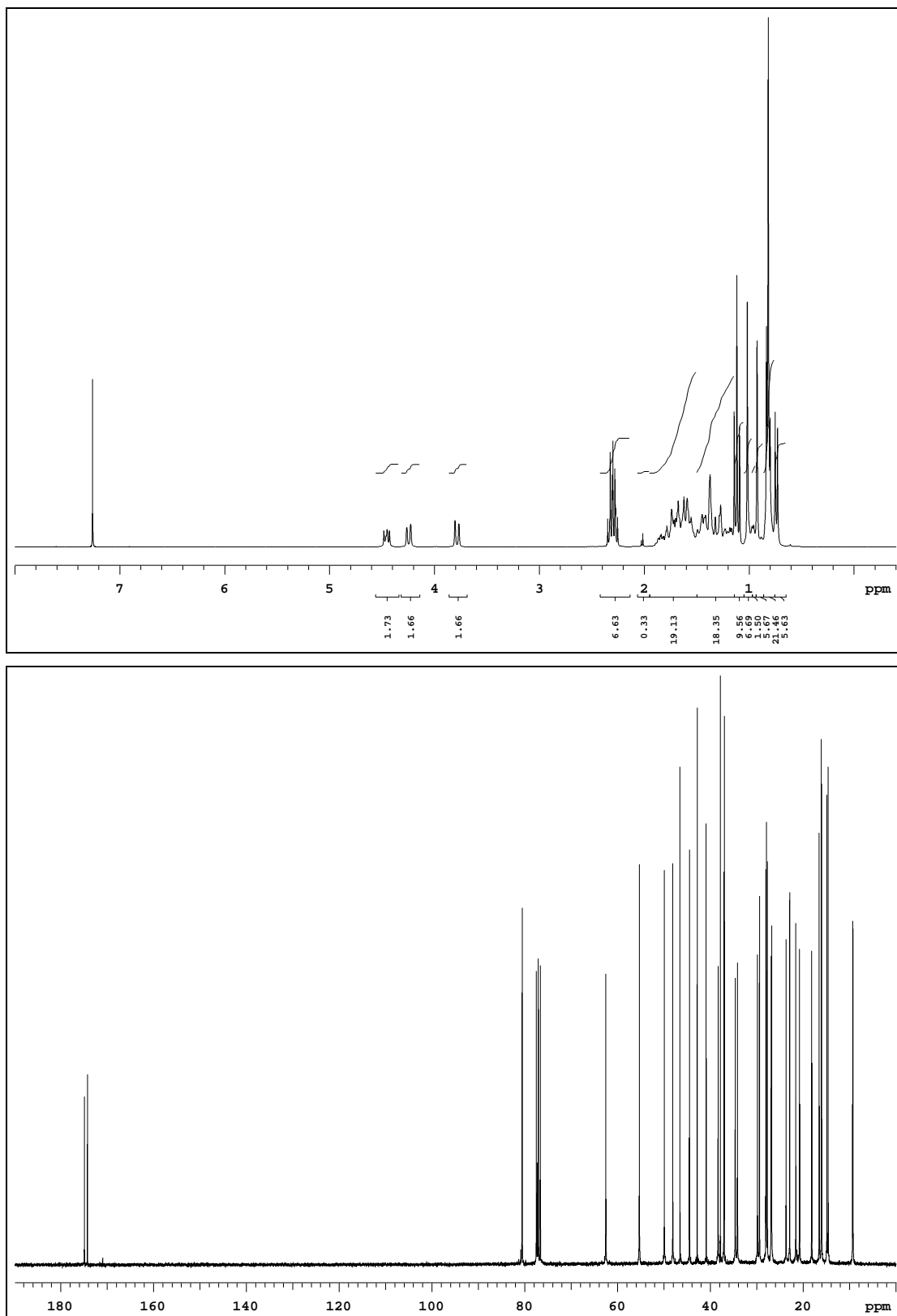
Rys. 11: Widma ^1H i ^{13}C dioctanu betuliny (BC2); rozp. CDCl_3



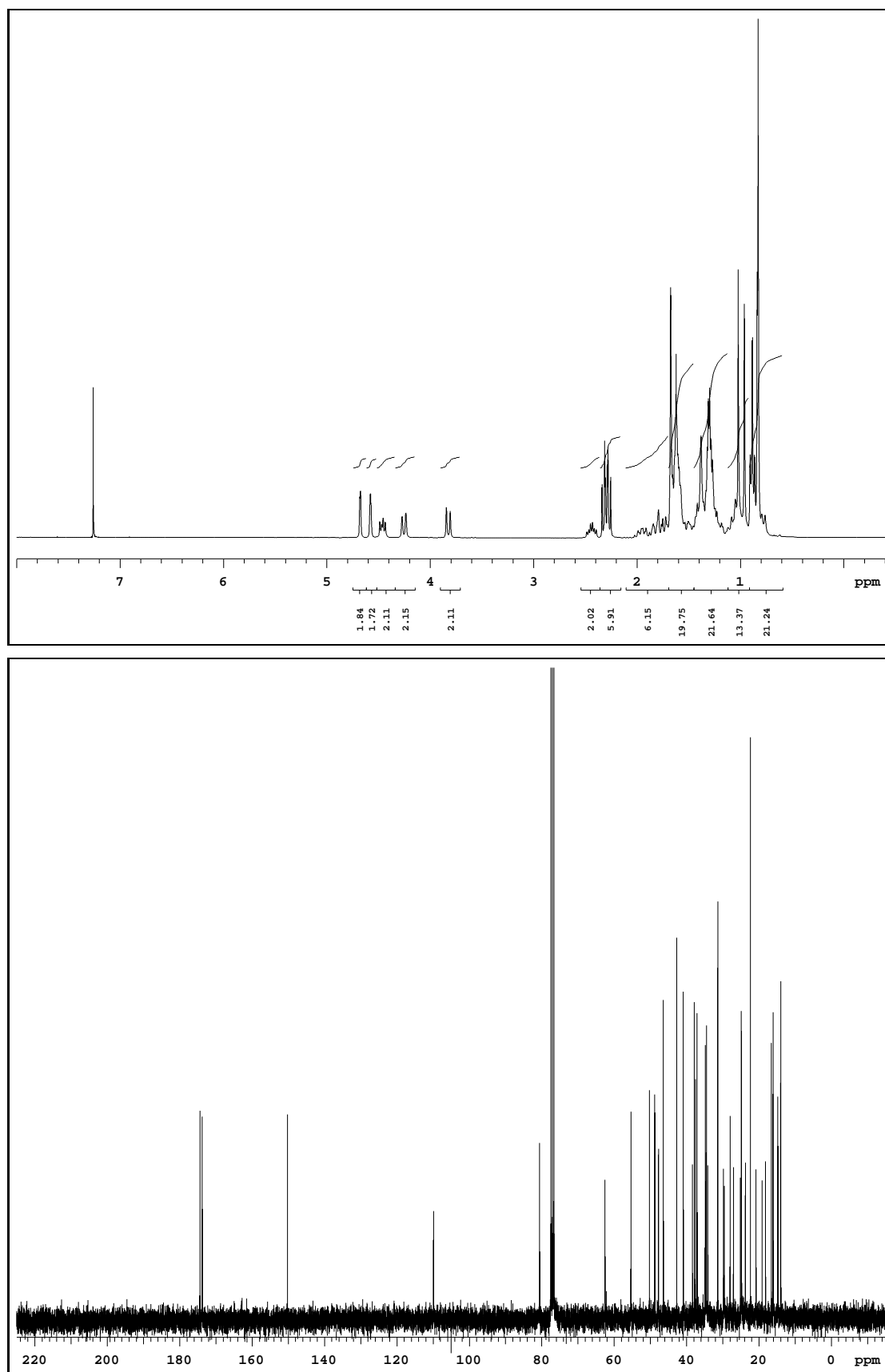
Rys. 12: Widma ¹H i ¹³C dioctanu dihydrobetuliny (DODHB); rozp. CDCl₃



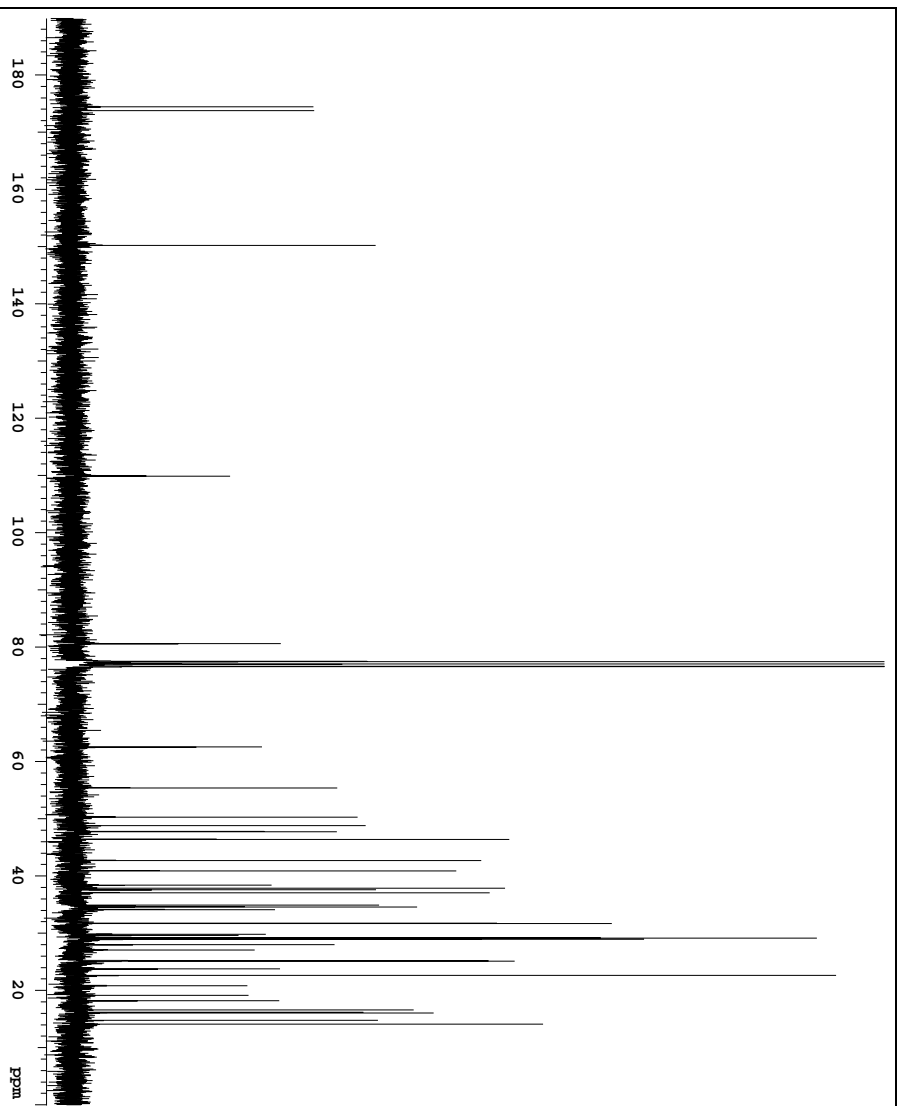
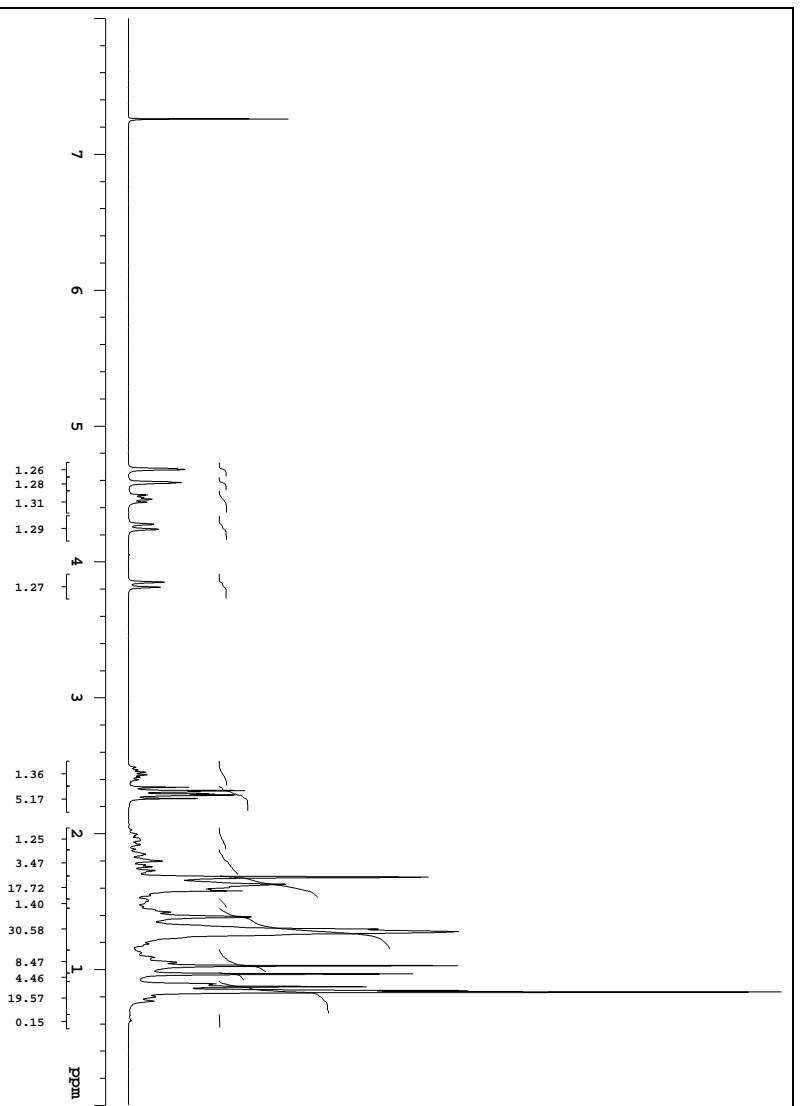
Rys. 13: Widma ^1H i ^{13}C dipropionianu betuliny (**BC3**); rozp. CDCl_3



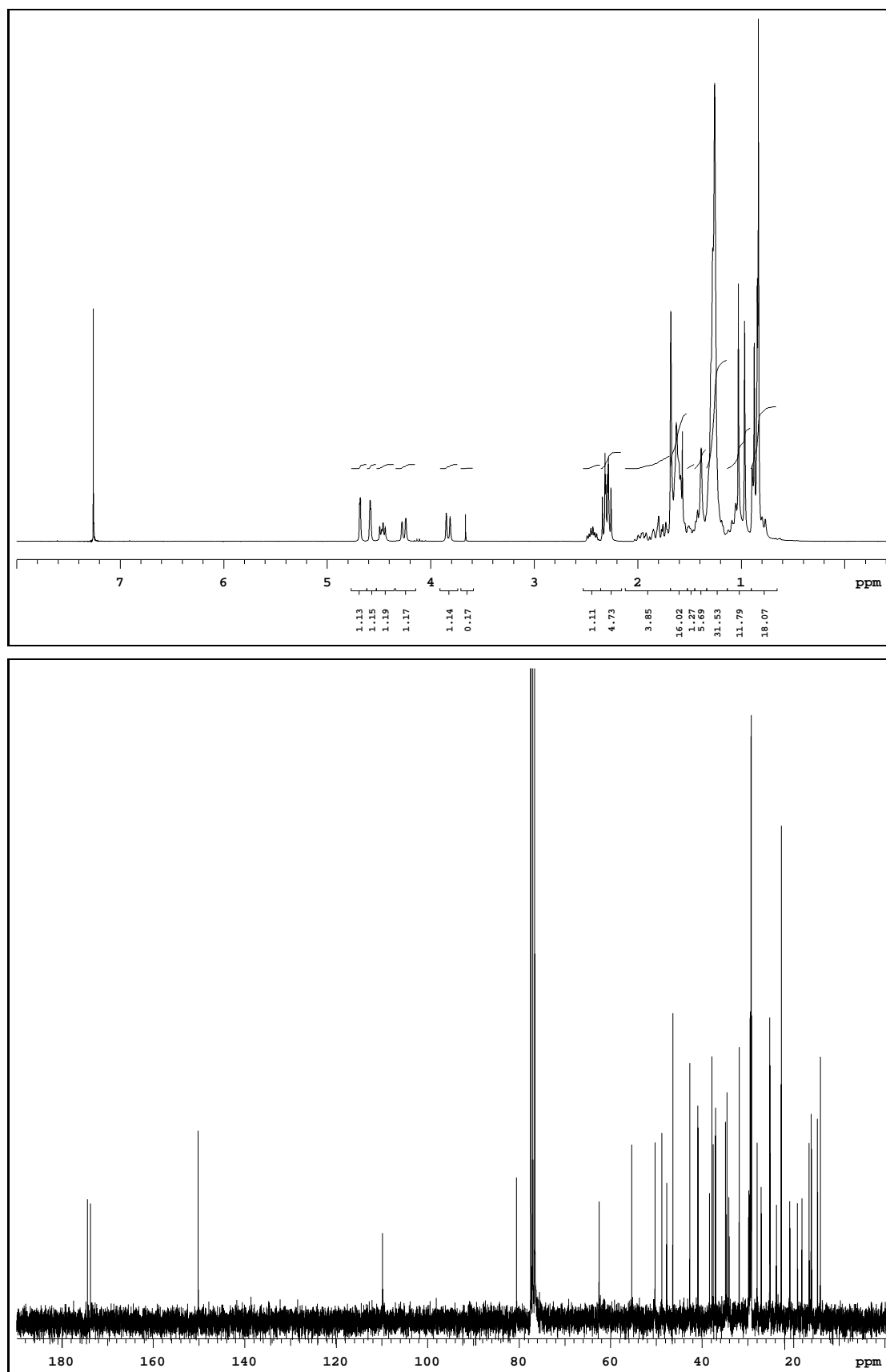
Rys. 14: Widma ¹H i ¹³C dipropionianu dihydrobetuliny (**DPDHB**); rozp. CDCl₃



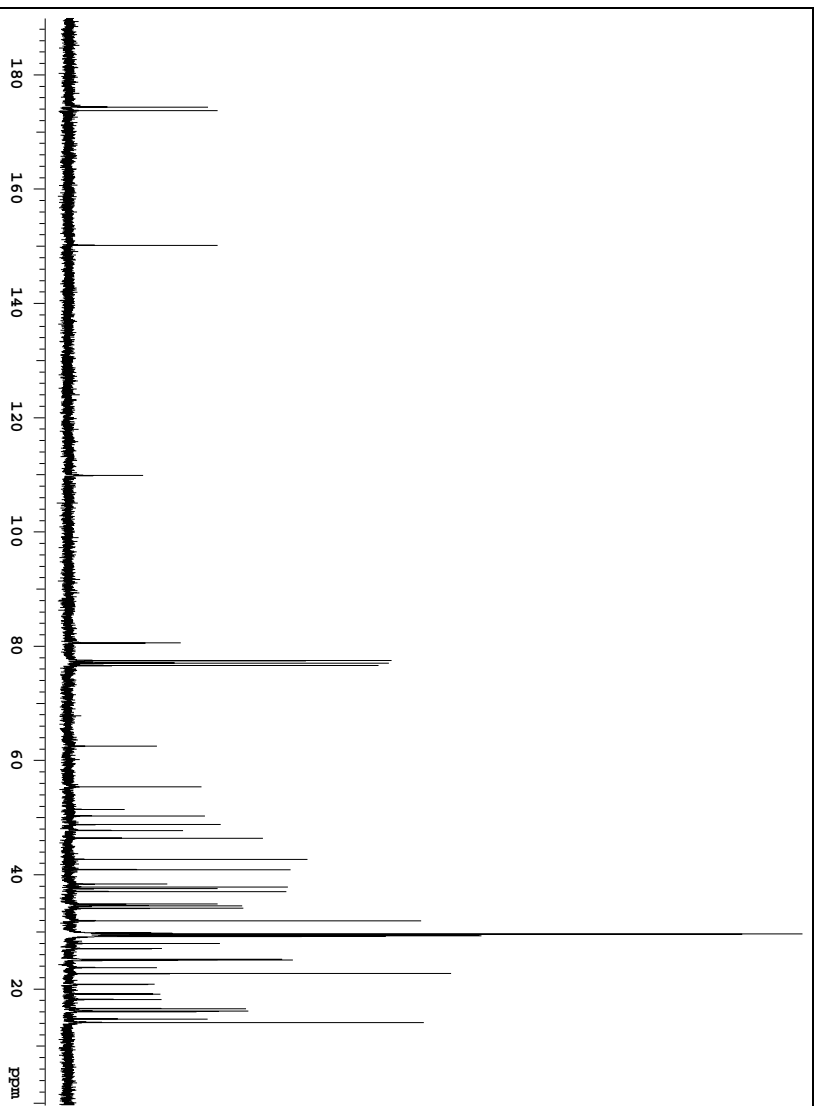
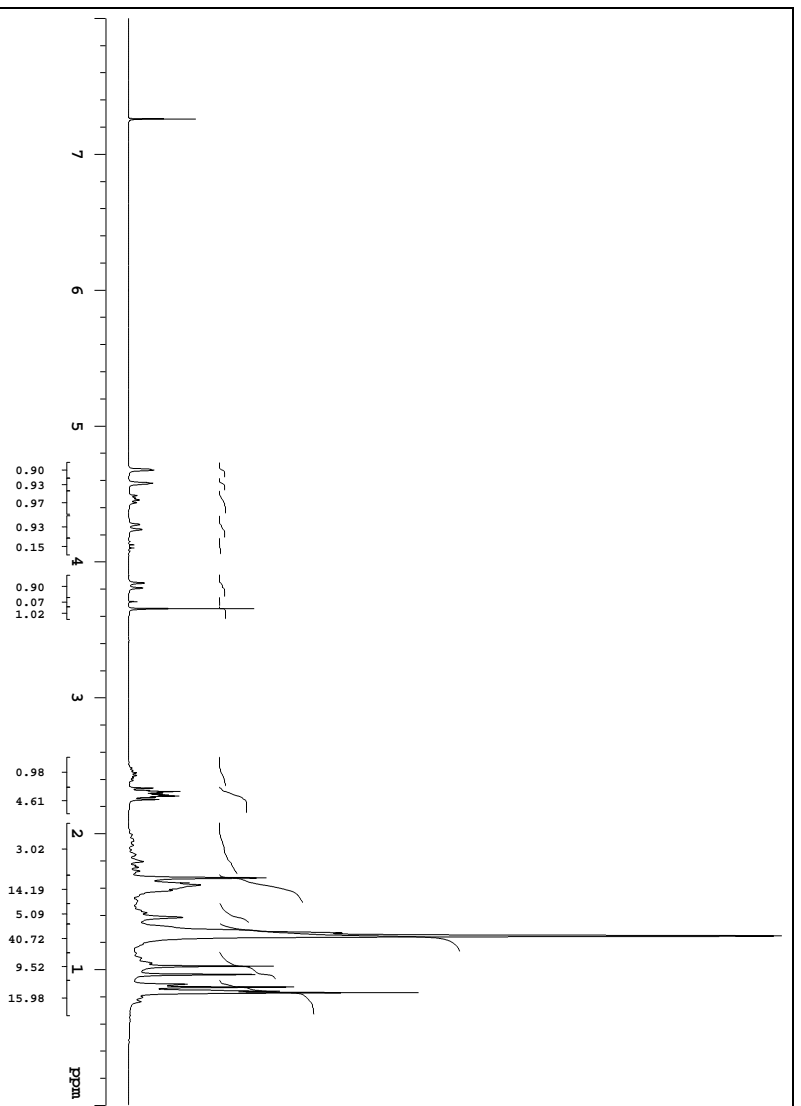
Rys. 15: Widma ^1H i ^{13}C dikapronianu betuliny (BC6); rozp. CDCl_3



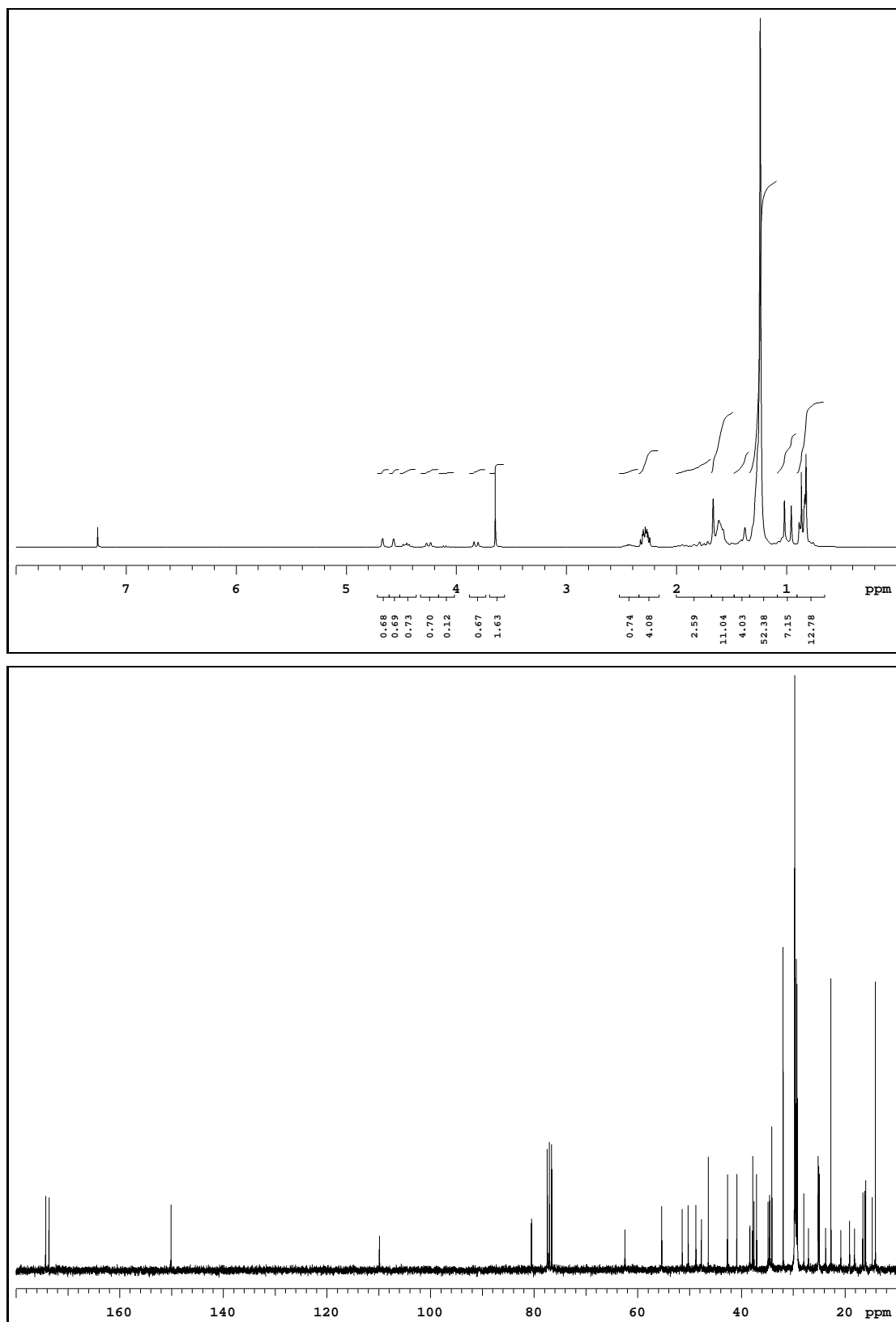
Rys. 16: Widma ^1H i ^{13}C dikaprymianu betuliny (BC8); rozp. CDCl_3



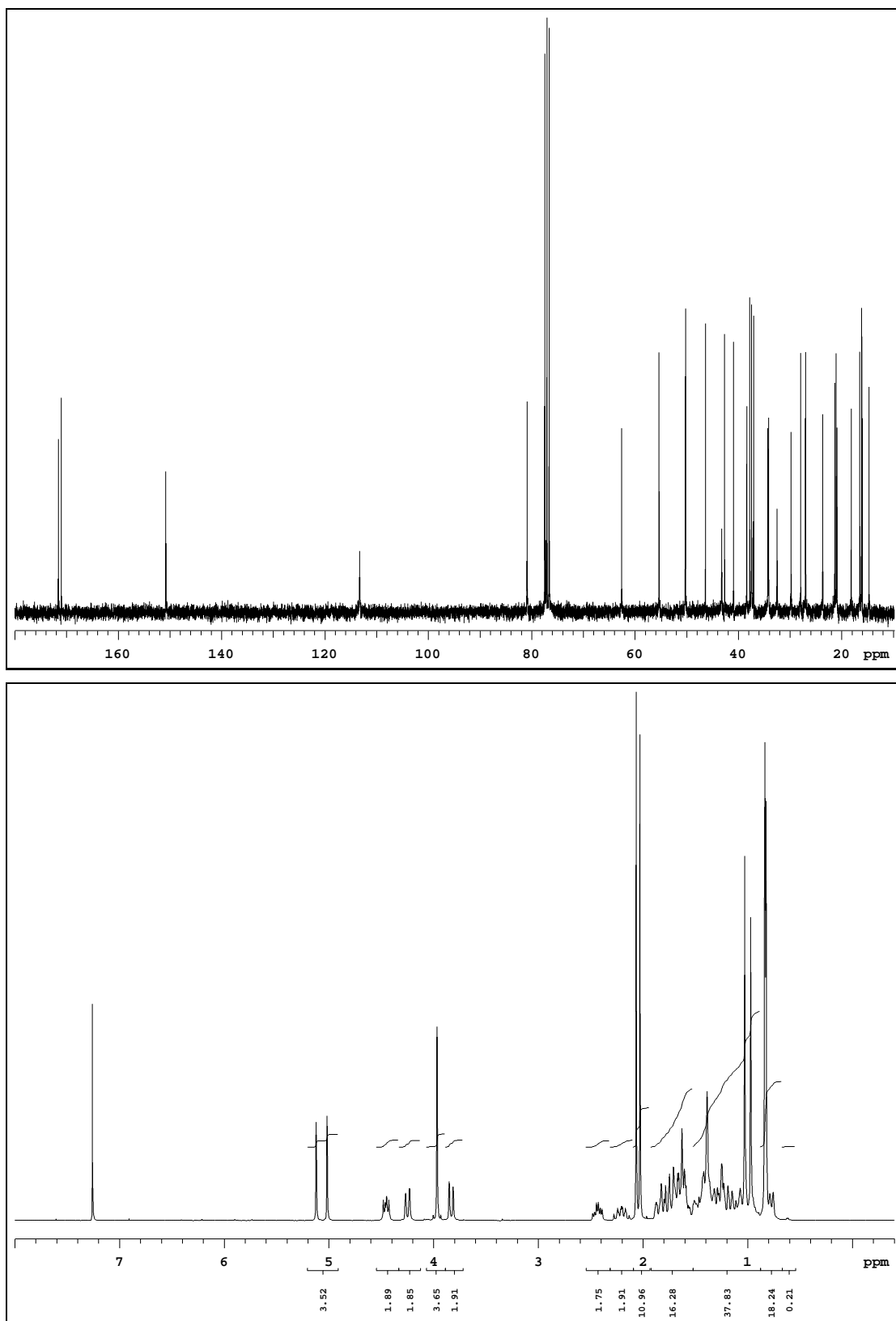
Rys. 17: Widma ^1H i ^{13}C dikaprylanu betuliny (**BC10**); rozp. CDCl_3



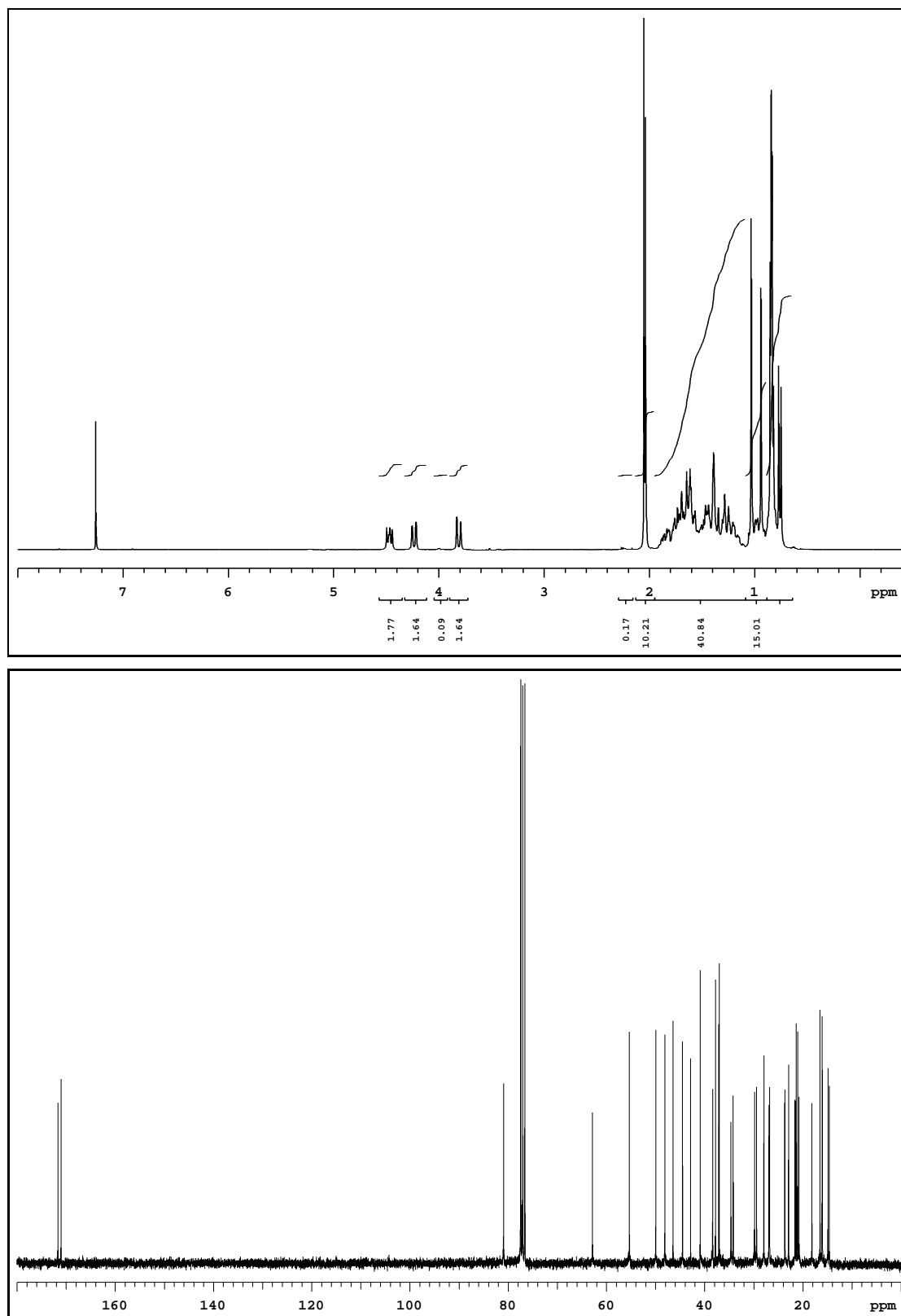
Rys. 18: Widma ^1H i ^{13}C dlaury niemu betuliny (BC12); rozp. CDCl_3



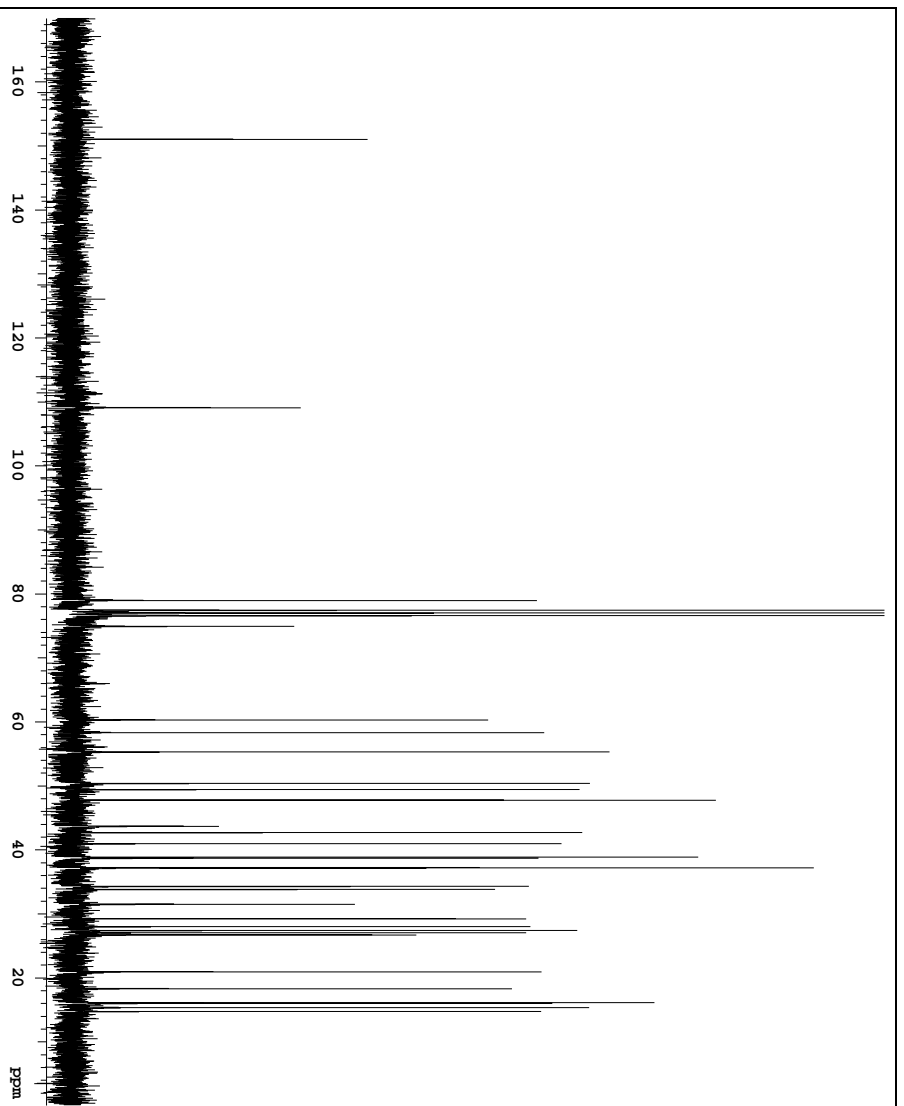
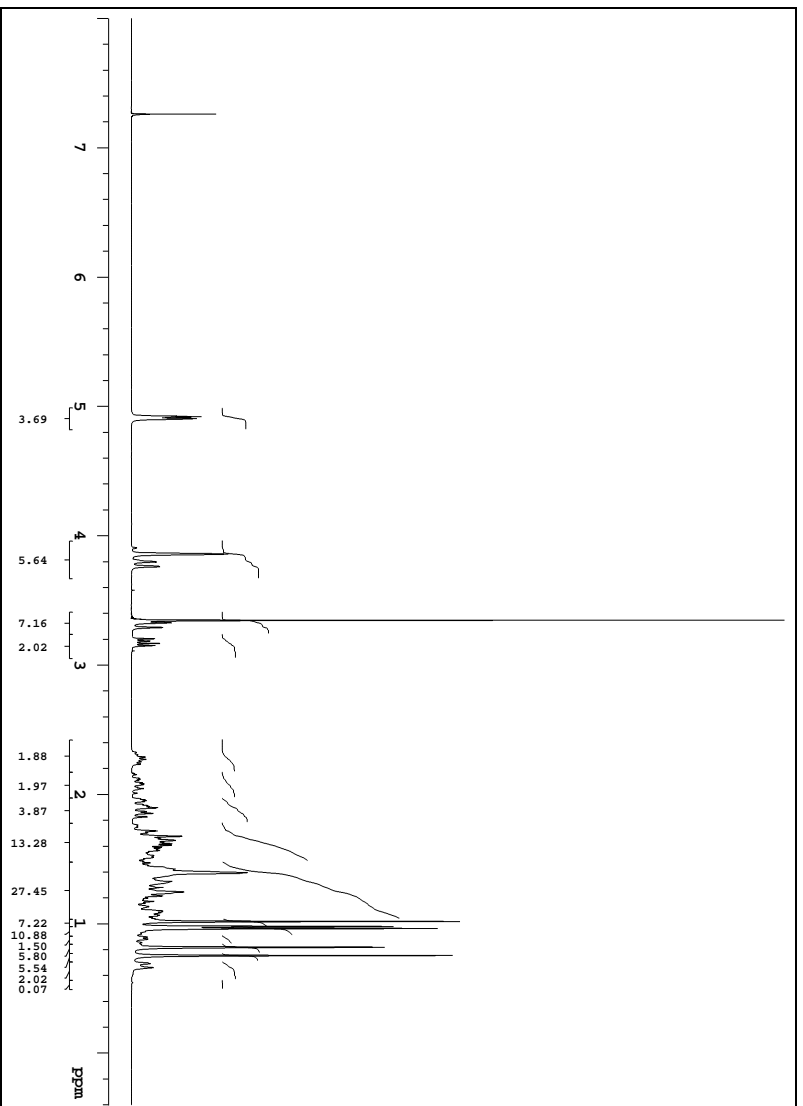
Rys. 19: Widma ^1H i ^{13}C dipalmitynianu betuliny (**BC16**); rozp. CDCl_3



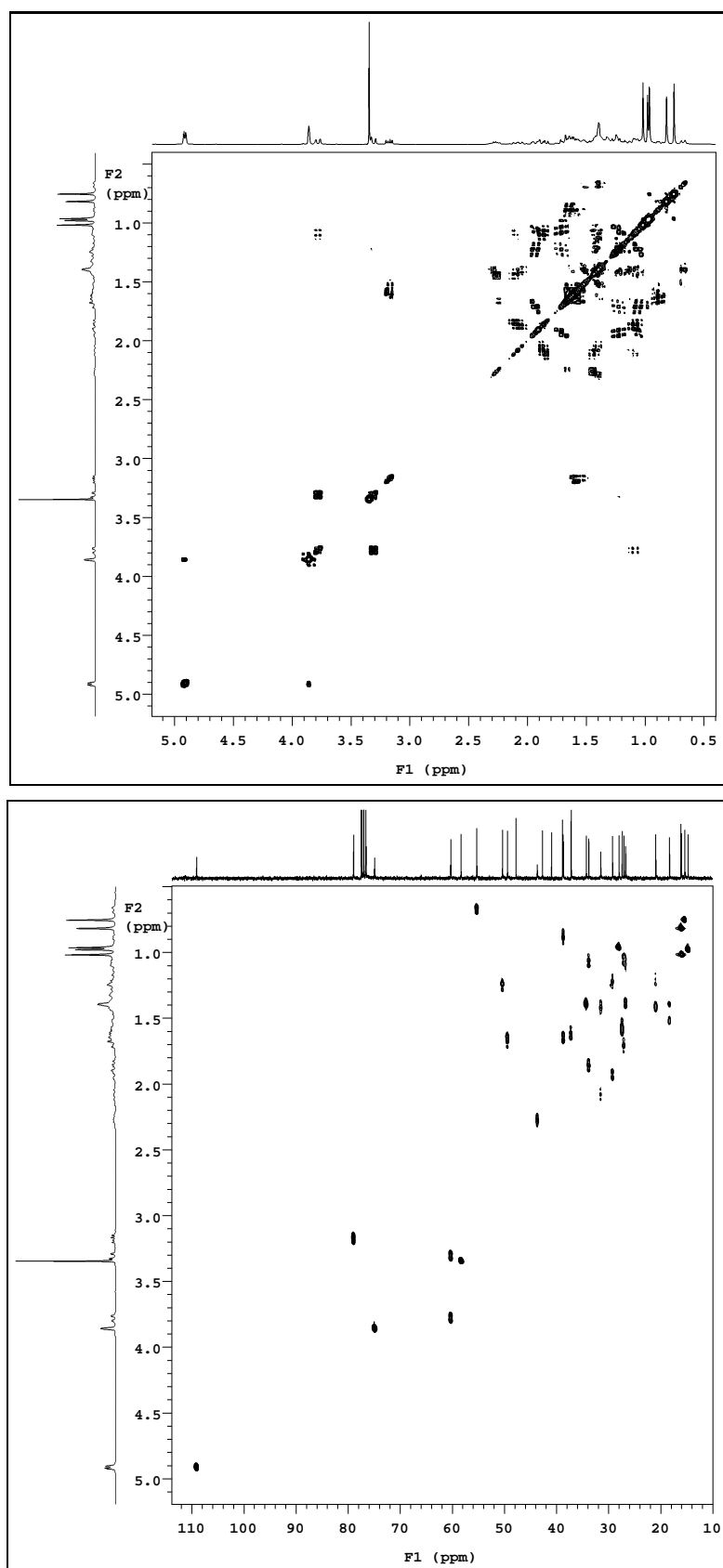
Rys. 20: Widma ¹H i ¹³C 30-bromo-3,28-dioctanu betuliny (**BRDOB**); rozp. CDCl₃



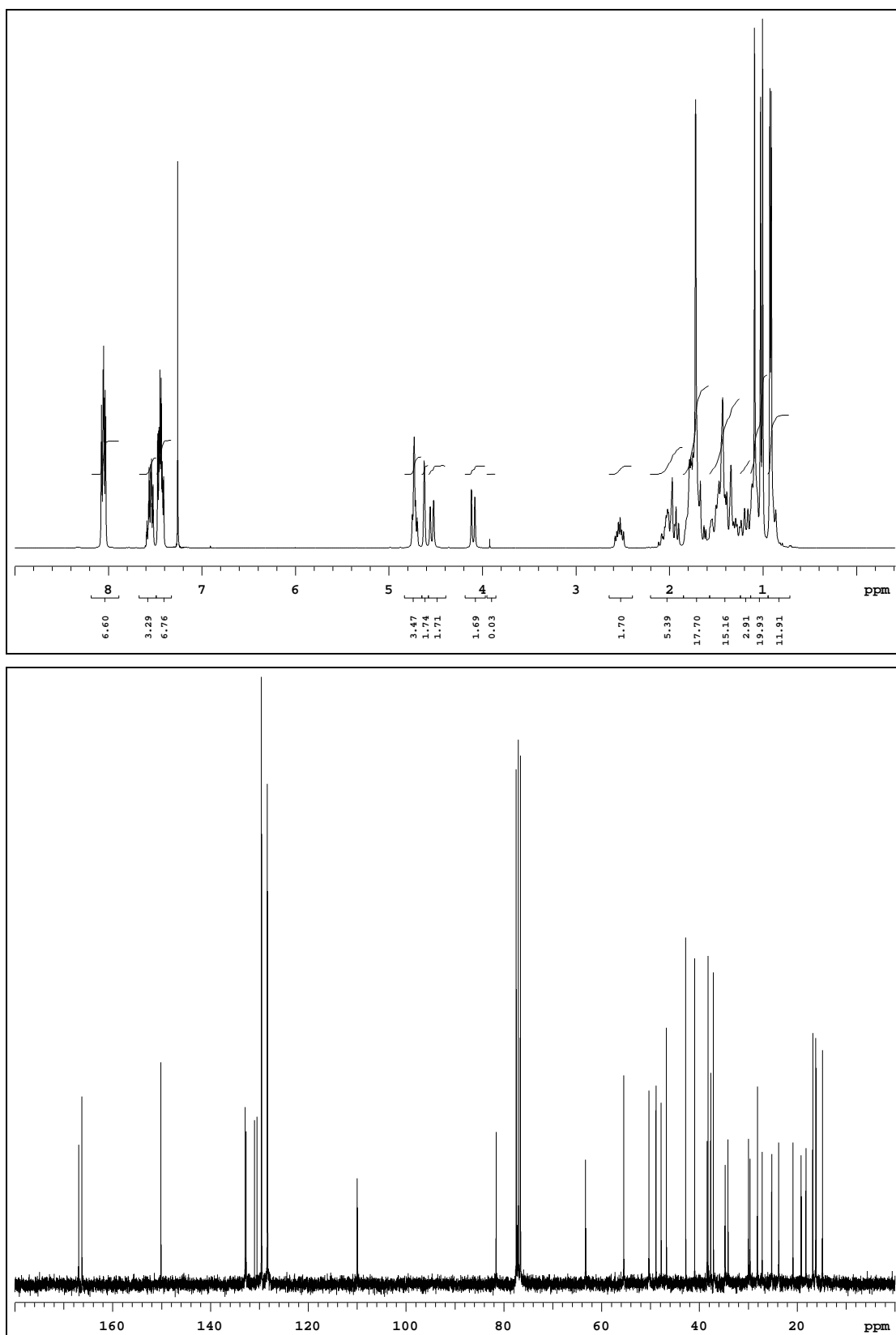
Rys. 21: Widma ^1H i ^{13}C produktu redukcji 30-bromo-3,28-dioctanu betuliny (**BRRED**); rozp. CDCl_3



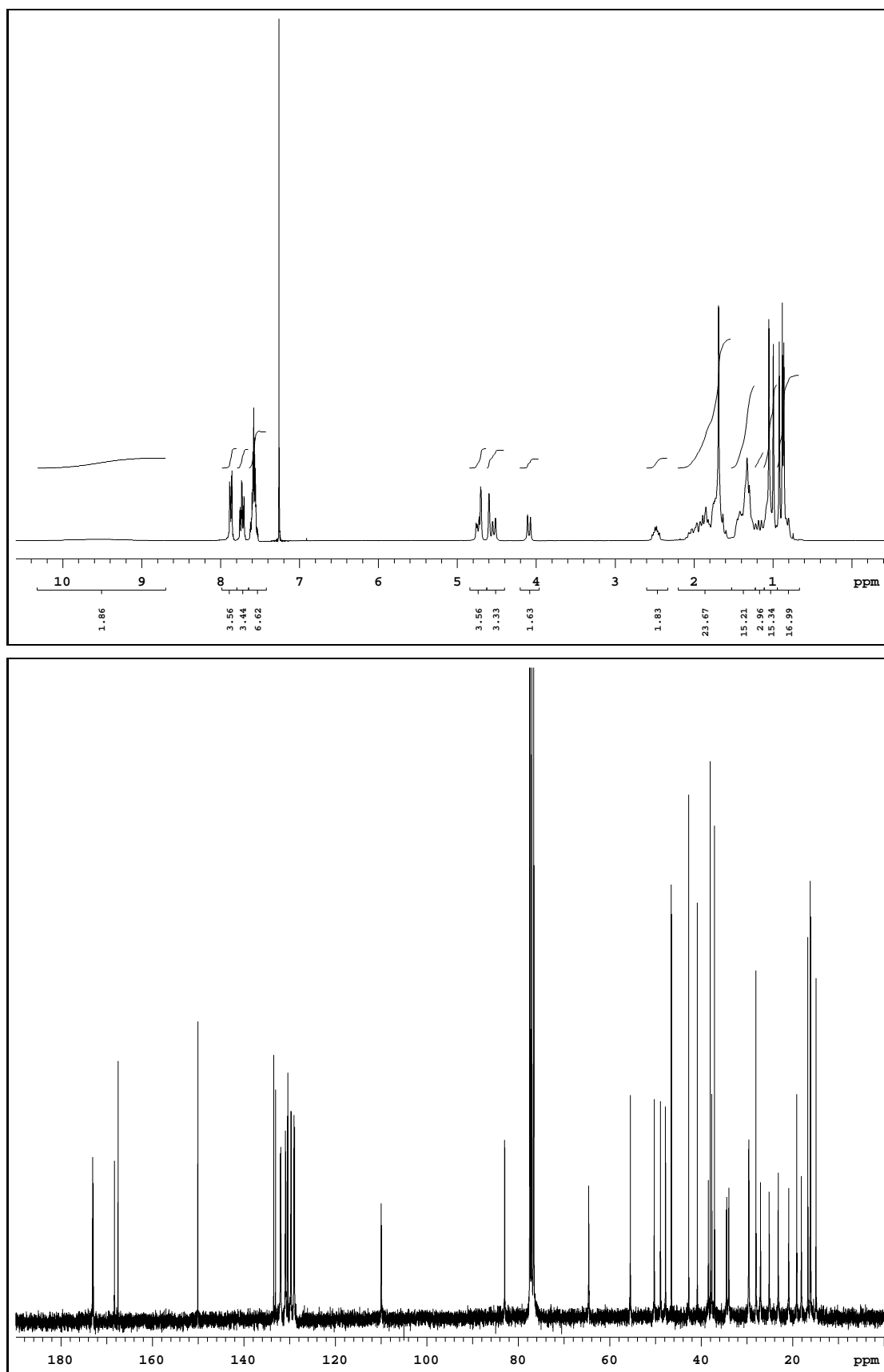
Rys. 22: Widma ^1H i ^{13}C 30-metoksybetuliny (30MBET); rozp. CDCl_3



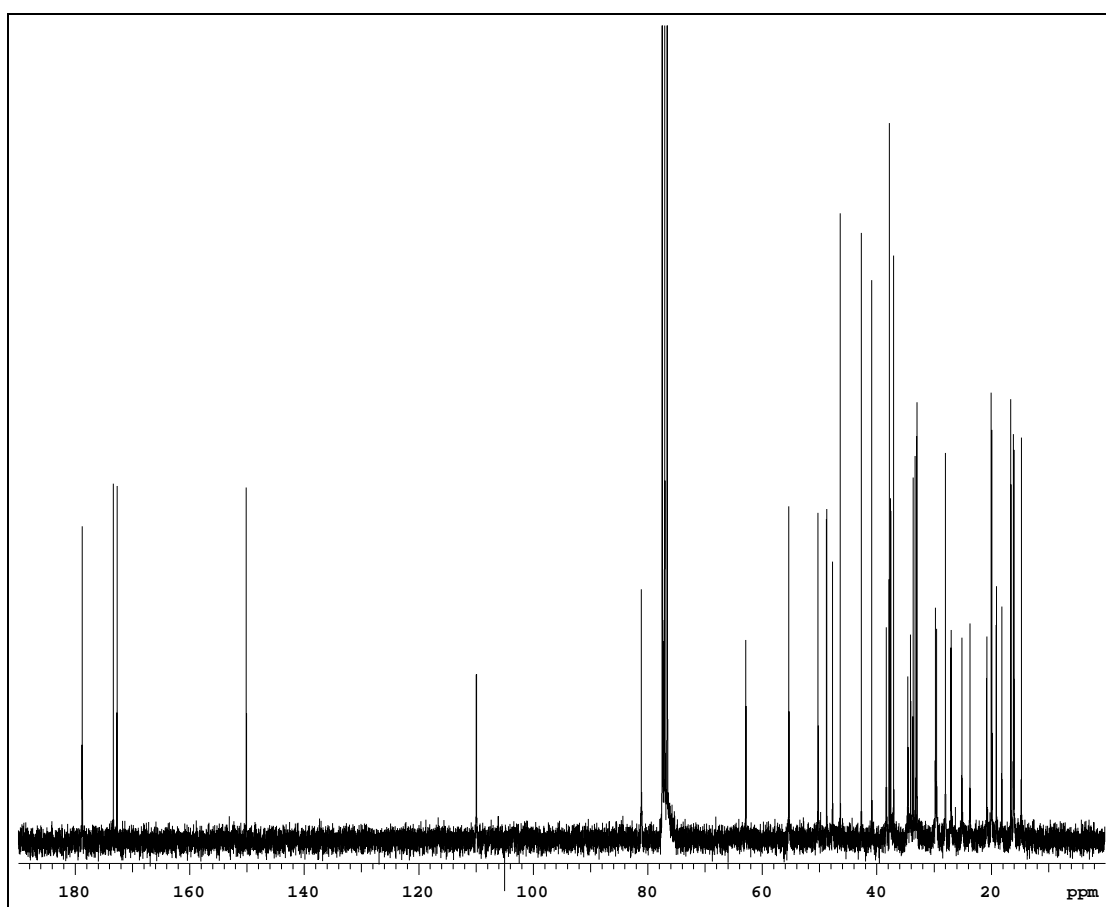
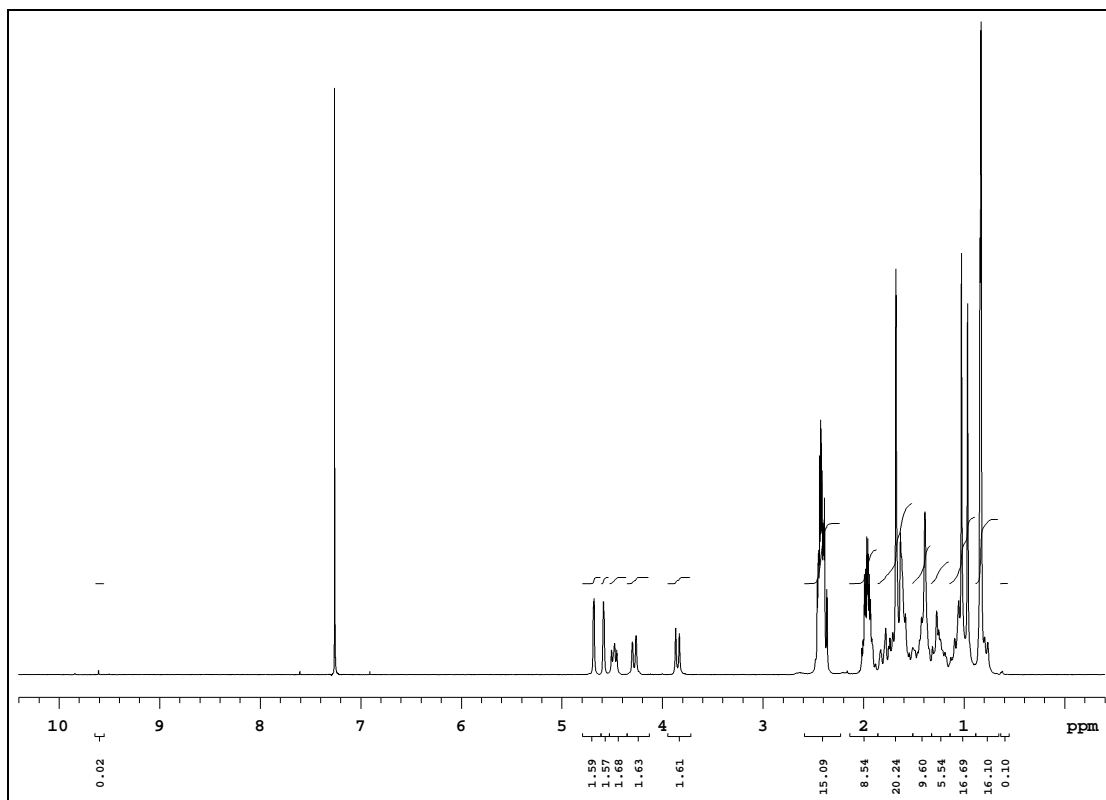
Rys. 23: Widma dwuwymiarowe COSY i HSQC 30-metoksybetuliny (**30MBET**); rozp. CDCl_3



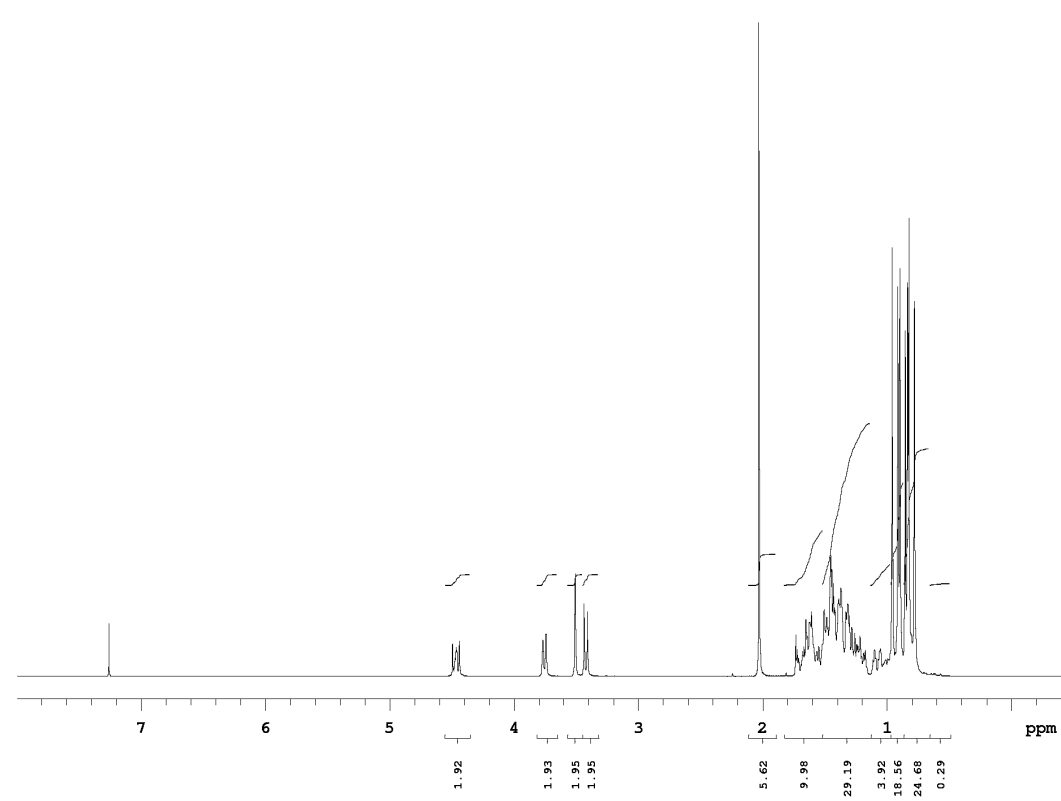
Rys. 24: Widma ^1H i ^{13}C dibenzoesanu betuliny (DBB); rozp. CDCl_3



Rys. 25: Widma ^1H i ^{13}C bis(o-hemifitalanu) betuliny (**DFTB**); rozp. CDCl_3



Rys. 26: Widma ^1H i ^{13}C bis(hemiglutaranu) betuliny (**DGB**); rozp. CDCl_3



Rys. 27: Widmo ^1H octanu allobetuliny (**ACALLO**); rozp. CDCl_3

Dodatek B

Przypisania sygnałów NMR ^1H i ^{13}C
wybranych związków

Tabela 1: Przypisania sygnałów NMR ^{13}C i ^1H betuliny i lupeolu; rozp. CDCl_3

atom nr.	betulina (BET)				lupeol (LUP)			
	^{13}C eksp.	^{13}C za [83]	^{13}C za [177]	^1H eksp.	^1H eksp.	^{13}C eksp.	^{13}C za [177]	
1	38,70	39,1	38,7	0,90; 1,66	0,91; 1,68	38,71	38,7	
2	27,39	27,8	27,4	1,59	1,59	27,42	27,5	
3	78,96	79,4	79,1	3,18	3,18	78,99	79,0	
4	38,85	39,3	38,8	—	—	38,85	38,9	
5	55,29	55,7	55,3	0,70	0,7	55,30	55,3	
6	18,29	18,7	18,3	1,40; 1,53	1,39; 1,52	18,31	18,3	
7	34,23	34,6	34,3	1,40	1,39	34,29	34,3	
8	40,91	41,3	41	—	—	40,82	40,9	
9	50,40	50,8	50,5	1,26; 1,32	1,28	50,44	50,5	
10	37,15	37,6	37,3	—	—	37,17	37,2	
11	20,82	21,2	20,9	1,24; 1,41	1,26; 1,42	20,42	21,0	
12	25,21	25,6	25,2	1,04; 1,63	1,06; 1,66	25,15	25,2	
13	37,31	37,7	37,2	1,61; 1,70	1,66	38,05	38,1	
14	42,71	43,1	42,8	—	—	42,82	42,9	
15	27,04	27,5	27,1	1,06; 1,70	1,02; 1,59	27,42	27,5	
16	29,17	29,6	29,2	1,21; 1,92	1,43	35,57	35,6	
17	47,78	48,2	47,9	—	—	42,98	43,0	
18	48,76	49,2	47,9	1,56; 1,62	1,37	48,30	48,0	
19	47,78	48,2	48,8	2,38	2,38	47,97	48,3	
20	150,46	150,9	150,5	—	—	150,94	150,9	
21	29,75	30,2	29,8	1,90; 2,0; 1,34; 1,46	1,34; 1,92	29,85	29,9	
22	33,96	34,4	34	1,04; 1,85	1,2; 1,38	39,99	40,0	
23	27,97	28,4	28,1	0,97	0,97	27,98	28,0	
24	15,34	15,7	15,4	0,77	0,77	15,35	15,3	
25	16,09	16,5	16,1	0,83	0,83	16,10	16,1	
26	15,97	16,4	16,1	1,03	1,03	15,97	16,0	
27	14,75	15,2	14,8	0,99	0,95	15,54	14,6	
28	60,55	61	60,6	3,33; 3,80	0,79	17,99	18,0	
29	109,67	19,5	19,1	4,68; 4,57	4,57; 4,69	109,30	109,3	
30	19,07	110,1	109,7	1,68	1,68	19,30	19,3	

Tabela 2: Przypisania sygnałów NMR ^{13}C i ^1H 30-metoksybetuliny i allobetuliny; rozp. CDCl_3

30-metoksybetulina (30MBET)		allobetulina (ALLO)		
atom nr.	^1H	^{13}C	^{13}C	^1H
1	0,9; 1,66	38,68	38,87	0,90; 1,69
2	1,58	27,37	27,40	1,60
3	3,18	78,94	78,86	3,17
4	—	38,84	38,92	—
5	0,69	55,27	55,45	0,70
6	1,4; 1,52	18,28	18,29	1,36; 1,51
7	1,4	34,26	33,91	1,40
8	—	40,94	40,60*	—
9	1,25	50,36	51,07	1,30
10	—	37,14	37,24	—
11	1,23; 1,42	20,92	20,97	1,29; 1,49
12	1,08; 1,40	26,69	26,43	1,08; 1,61
13	1,64	37,19	34,13	1,43
14	—	42,67	40,60*	—
15	1,07; 1,70	27,03	26,43	1,08; 1,61
16	1,23; 1,93	29,21	26,25	1,30; 1,41
17	—	47,25	41,45	—
18	1,68	49,40	46,82	1,44
19	2,28	43,67	87,89	3,51
20	—	151,01	36,24	—
21	1,42; 2,08	31,48	32,71	1,20; 1,49
22	1,87; 1,09	33,79	36,74	1,30
23	0,95	27,97	27,99	0,96
24	0,76	15,34	15,39	0,75
25	0,81	16,09	16,46	0,83
26	1,01	15,98	15,74	0,95
27	0,97	14,72	13,49	0,89
28	3,31; 3,78	60,28	71,22	3,42; 3,75
29	4,91	109,07	24,53	0,78
30	3,86	74,90	15,70	0,95
31	3,34	58,30	—	—

* — sygnały nierozróżnialne

Dodatek C

Wykaz wykorzystanych programów komputerowych

- Struktury cząsteczek — Bkchem 0.11.6
logP — Pallas 3.2.1.4 (CompuDrug Chemistry Ltd.)
i ACD/log P DB (ChemSketch 10.0, Advanced
Chemistry Development, Inc.)
Wykresy — Gnuplot wersja 4.2
Obliczenia statystyczne — Statistica PL 6.0,
i arkusz kalkulacyjny Open Office 2.0.4 (Sun
Microsystems)
oraz Gnuplot wersja 4.2
Skład tekstu — L^AT_EX 2_ε (z dystrybucji Fedora Core 6)

Dodatkowo przy opracowywaniu wyników i składaniu tekstu korzystano z narzędzi powłoki (bash) systemu Fedora Core 6 jak: edytor strumieniowy SED oraz metajęzyki AWK i PERL.