



## Visaptverošs pārskats par betulīnu kā spēcīgu pretvēža līdzekli

[Sylwia Katarzyna Król](#), [Michał Kiełbus](#), [Adolfo Rivero-Müller](#), un [Andrzej Stepulak](#)

### Ārsta Artūra Tereško priekšvārds

Tāpat kā vairākums ārstu, arī es esmu noraižējies par onkoloģisko slimību gadījumu pieaugumu, īpaši, jaunu cilvēku vidū. Sliktākais ir tas, ka mēs nevaram ietekmēt pārtikas un vides kvalitāti, kā arī, mūsu spēkiem nenovēršamo disstresu, kas ir galvenie onko slimību izraisītāji. Daudzi, protams, var izvēlēties bioloģisko pārtiku un ūdeni no avota, bet ne visi un ne vienmēr.

Būdams fitoterapeits, sekoju līdzi pētījumiem par jaunām iespējām šo slimību novēršanā un ārstēšanā, tieši ar ārstniecības augiem un sēnēm.

Pēdējās desmitgadēs zinātnieki intensīvi pēta augus un sēnes, lai noskaidrotu to īpašības, ko varētu izmantot preventīvi audzēju gadījumu samazināšanai un ārstēšanai.

Ir pierādītas sēnu – šitaki, čagas, tauriņpiepes, kardicepa, brūnās bērza piepes, reiši, maitake pretaudzēju īpašības, tāpat ir pozitīvi pētījumi par augu – adaptogēnu: ženē-šeņ, rožainās rodiolas, leizejas, eleotero koka audzēju izplatību kavējošu darbību.

Tomēr pēdējās desmitgades visvairāk pētītā substance ar pretaudzēju aktivitāti ir bērza tāss sausais ekstrakts – betulīns un tā atvasinājums betulīnskābe.

Šeit lasītājiem piedāvāju pilnu 81pētījuma pārskata tulkojumu par betulīna pretaudzēja īpašībām. Jāpiebilst, ka šis pārskats ir adresēts ļoti šauram speciālistu lokam, galvenokārt onkologiem, jo ierindas ārstiem, arī man, daudzās šeit apskatītās šūnu līnijas neko neizsaka un darbības mehānismu izprāšana ir par sarežģītu. Tomēr, izlasot šo pārskatu, var izdarīt secinājumus:

1. Betulīns kavē dažāda veida vēžu izplatīšanos un invāziju.
2. Betulīns stimulē tos iekšējos procesus audzēja šūnās un ārpus tās, kas pakļauj audzēja šūnas ieprogrammētai, dabiskai nāvei, ko sauc par apoptozi.
3. Betulīns kavē audzēja šūnu augšanu, traucējot jaunu asinsvadu veidošanos audzēja masā.
4. Ir pierādīts, ka betulīns ievērojami kavē vairāku vēža šūnu veidu, tostarp, plaušu un centrālās nervu sistēmas audzēju (rabdomiosarkoma/medulloblastoma) šūnu migrāciju un metastazēšanos.
5. Betulīns darbojas uz dažādas lokalizācijas un dažādu veidu audzējiem, bet efektīvā deva variē plašās robežās – no 10 mg/kg. līdz 30 mg/ kg svara, aptuveni pārrēķinot uz cilvēku *in vivo* pētījumos pielietotās devas.
6. Betulīns paaugstina ķīmijterapijas efektivitāti un samazina terapijas blakusparādību biežumu un smagumu, kas ļauj kursu pabeigt pilnā apjomā.
7. Betulīna antiproliferatīvais potenciāls nav bijis atkarīgs no šūnu izcelsmes (cilvēka vai dzīvnieka).
8. Būtiska priekšrocība, izmantojot betulīnu kā bioaktīvu līdzekli, ir tā zemā toksicitāte pret normālām šūnām.
9. Ilgstošos pētījumos ar dzīvniekiem betulīnam nav izdevies pierādīt toksiskas vai kādas citas nelabvēlīgas īpašības.

Pēdējie divi secinājumi - par betulīna drošību, dod iespēju to lietot kā uztura bagātinātāju kapsulu vai eļļas emulsijas veidā, kamēr nav izdarīti sarežģītie kliniskie pētījumi, un tas nav nonācis ārstu rīcībā kā medikaments. Devai, atkarībā no svara un audzēja veida, vajadzētu būt no 1 līdz 2 gramiem diennaktī.

Saīsinājumu paskaidrojums.

IC<sub>50</sub> - koncentrācija audos, kas 50% gadījumos izraisa jaundabīgo šūnu nāvi

DL50 - vielas daudzums, kas, ievadīts organismā, 50 gadījumos no simta izraisa nāvi.

1 μ Mols = 0.44 μg /ml

1 μg /ml = 0.001gr/l = 1mg/litrā

Nemot vērā, ka cilvēka organismā ir 60% šķidru substānci, tas ir jāņem vērā pie devas aprēķināšanas, pareizinot aprēķināto mililitru daudzumu litrā ar koeficientu 0.6

Piemēram, cilvēka mieloleikozes gadījumā:

Vēža veids Šūnu līnija μ M μg /ml (mg/litrā)

Cilvēka mieloleikoze K562	<b>14.5</b>	6.4
	>225.9	<b>&gt;100,0</b>

Tas nozīmē, ka, lai sasniegtu mieleikozes gadījumā IC50, cilvēkam ar 80 kg svaru teorētiski ir nepieciešama betulīna deva: 100 mg x 80 kg x 0,6 = 4800 mg betulīna. Iespējams, ka vairāk, nemot vērā to, ka mums interesē nevis IC50, bet IC 100, šai devai vajadzētu būt vēl 2 reizes lielākai.

Taču tādu daudzumu cilvēka nespēj izmantot, tāpēc betulīna lietošana šai gadījumā ir nelietderīga. Iespējams, ka drīz varēs lietot betulīna nano formu, kas dos iespēju stipri samazināt efektīvo devu.

Cits gadījums:

Vēža veids	Šūnu līnija	<b>IC<sub>50</sub></b>
	μ M	μg /ml (mg/l)

Cilvēka neuroblastoma NB-1	<b>16.5</b>	7.3
----------------------------	-------------	-----

Šajā gadījumā ārstēšanai ar betulīnu varētu būt labas sekmes jo diennakts deva neuroblastomas gadījumā 80 kg smagam cilvēkam varētu būt 7.3 mg/l x 80 kg = 584 mg. x 0,6 = 350 mg x 2 (lai panāktu IC100) = 700 mg. Tā ir pilnīgi pieņemama deva, ko var uzņemt lietojot, piemēram, uztura bagātinātāju "BTE –Betulīns" pa 2 kapsulām 2 reizes dienā, Vai 10% betulīna eļļas suspensiju pa 5 ml 2 reizes dienā.

Jāpiebilst, ka pārskatā apskatītie pētījumi un mēģinājumi pārsvarā ir izdarīti vai nu *in vitro*, tas nozīmē – mēģinājumi, vai arī *in vivo* - ar dzīvniekiem. Jāņem vērā, ka ne vienmēr cilvēka organisms uz dažādām vielām reagē tāpat kā dzīvnieka organisms.

Nemot vērā to, ka betulīns ir netokisks, par ko liecina pētījumi ar dzīvniekiem, kur DL50 nav izdevies panākt, devu var palielināt līdz 2 gramiem diennaktī. Lielākai devai nav racionālas nozīmes, jo to organisms nevar izmantot, betulīna vājas šķidības deļ. Jo speciālāka cilvēka gremošanas sistēma, jo labāk betulīns pāriet molekulārā līmenī, asimilējas un darbojas. Tas ir lipofils, organismā saistās ar lipīdiem, tāpēc tā darbība notiek šūnu membrānu līmenī.

# Visaptverošs pārskats par betulīnu kā spēcīgu pretvēža līdzekli

Sylwia Katarzyna Król, Michał Kiełbus, Adolfo Rivero-Müller, un Andrzej Stepulak

## Abstrakts

Daudzas augu izcelsmes vielas un to atvasinājumi ir efektīvi pretaudzēju un profilaktiski līdzekļi. Tomēr ir arī daudz audzēju veidu, kas nereagē vai kļūst izturīgi pret šīm dabiskajām vielām. Tas prasa jaunu aktīvo savienojumu atklāšanu. Betulīns (BE) ir pentaciklisks triterpēns un sekundārs augu metabolīts, kas bagātīgi atrodams bērzu sugu *Betulaceae* sp. ārējā mizā. BE piemīt plašs bioloģisko un farmakoloģisko īpašību spektrs, starp kuriem lielāko uzmanību piesaista pretvēža un kīmijpreventīvā darbība. Šādā veidā BE un tā dabiskie un sintētiskie atvasinājumi īpaši iedarbojas uz vēža šūnām ar zemu citotoksicitāti pret normālām šūnām. Lai gan BE antineoplastiskais darbības mehānisms vēl nav labi izprotams, tiek atklāti vairāki interesanti BE mijiedarbības aspekti. Šajā pārskatā tiek apkopots BE pretvēža un kīmijpreventīvās potenciāls *in vitro* un *in vivo*, rūpīgi sadalot un salīdzinot iepriekšējos pētījumos izmantotās devas un audzēja līnijas, kā arī koncentrējoties uz mehānismiem, kas ir pamatā BE darbībai šūnu un molekulārā līmenī.

## 1. Ievads

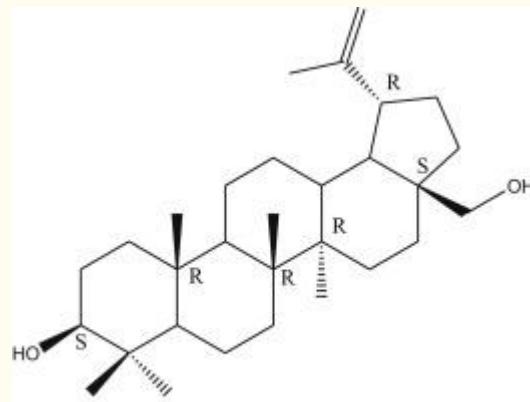
Epidemioloģiskie dati liecina par vēža sastopamības un mirstības palielināšanos. Turklat ir arī prognozēts, ka vēzis pārsniegs sirds slimības kā galveno nāves cēloni pasaulē, radot nopietnas sociālas un ekonomiskas sekas [2]. Neskatoties uz jauno ķirurģisko metožu, radioterapijas, kīmijterapijas un mērkterapijas ievērojamo attīstību, neveiksme audzēju ārstēšanā joprojām ir vissvarīgākā onkoloģijas problēma [3]. Pašreizējās staru un kīmijterapijas procedūras izraisa arī normālu šūnu bojājumus un tādējādi rada vairākas nopietnas blakusparādības. Turklat tiek uzskatīts, ka audzēja šūnu iegūtā rezistence pret medikamentien samazina tradicionālo onkoloģiskās terapijas veidu, tostarp, citostatisko zāļu un starojuma efektivitāti [4]. Jauna pieeja vēža ārstēšanai ir mērķēta uz signalizācijas ceļu izmainīšanu neoplastiskajās šūnās vai audzēja mikrovides izmainīšanu, neietekmējot normālās šūnas.

Dabisku augu izcelsmes savienojumu izmantošana tiek uzskatīta par interesantu aspektu cilvēku neoplastisko slimību ārstēšanā. Šķiet, ka dabīgas augu izcelsmes vielas, kas ir salīdzinoši viegli pieejamas, jo tās bieži sastopamas dabā, ir daudzsološa pretvēža vai kīmiski profilaktisku līdzekļu grupa, un tām ir bijusi galvenā loma zāļu vai piedevu izstrādē vairāku cilvēku vēža veidu ārstēšanai. Vispiemērotākās pretvēža zāles, kas iegūtas no augiem, ko izmanto kliniski, ir taksāni (tostarp paklitaksels, kas izolēts no *Taxus brevifolia* Nutt., *Taxaceae*) [8] un vinkas alkaloīdi (*Catharanthus* alkaloīdi) (tostarp vinblastīns un vinkristīns, kas izolēti no *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, *Apocynaceae*) [9]. Turklat ir sintezēti daudzi šo vielu atvasinājumi.

Terpēni ir liela augu sekundāro metabolītu grupa, un tie tiek uzskatīti par potenciāli noderīgiem vēža farmakoterapijā, jo tiem, kā pierādīts *in vitro* un *in vivo* pētījumos, ir selektīva citotoksicitāte pret daudzām cilvēka vēža šūnām.

Betulīns (BE, 3-lup-20(29)-ēn-3  $\beta$ ,28-diols), pazīstams arī kā betulinols, betulīns vai betulinā spirts [11], ir pentaciklisks lupana tipa triterpenoīds (1. attēls) dabiski izplatīts daudzos augos [12, 13]. BE bija viena no pirmajām dabiskajām vielām, ko Lovics izdalīja no augiem 1788. gadā, un tās kīmiskā struktūra tika galīgi noteikta 1952. gadā. Vēlāk BE tika atrasts arī citās *Betulaceae* dzimtas augu sugās kā ārējās mizas sastāvdaļa. bērzu sugars *Betula alba*, *B. pendula*, *B. pubescens* un *B. platyphylla*. BE ir konstatēts arī *Diospyros leucomelas*, *Zizyphus mauritiana*, *Nelumbo nucifera*, *Ziziphus vulgaris* var. *spinosa*, un mizā *Trochodendron aralioides*. BE ir sastopams no 10 [14], līdz 34 % no baltā bērza mizas sausnas svara [15] vai pat vairāk nekā 50 % kārpainā bērza *B. pendula* Roth mizas ekstrakta[16]. Bērza mizas ekstraktu kīmiskais sastāvs ir cieši saistīts ar izmantotajām sagatavošanas un attīrišanas metodēm un ietekmē BE procentuālo daudzumu, kas var svārstīties no 54% līdz 82% no sausnas [16].

## Betulīna un lupana ķīmiskā struktūra.



27, Betulin

Daudzi pētījumi ir parādījuši, ka BE ir daudzveidīgas un plašas bioloģiskas un farmakoloģiskas īpašības, tostarp antibakteriālas, pretsēnišu un pretvīrusu aktivitātes. Tomēr lielākā uzmanība tiek pievērsta BE pretvēža un ķīmijpreventīvajam potenciālam [ [11](#) ].

### BE kavē dažādu vēža veidu izplatīšanos un invāziju

Ir pierādīts, ka BE ir pretvēža darbība, kavējot vēža šūnu augšanu. BE citotoksicitāte un antiproliferatīvais potenciāls ir pētīts vairākās noteiktās vēža šūnu līnijās, kā arī primārās audzēja šūnu kultūrās.

#### 1. Tabula

*In vitro* BE antiproliferatīvā iedarbība uz cilvēku un dzīvnieku vēža šūnu līnijām, izmantojot IC<sub>50</sub> vērtības

Vēža veids	Šūnu līnija	IC <sub>50</sub> μM	IC <sub>50</sub> μg/ml	Atsauces
Cilvēka mieloleikoze	K562	14.5 >225.9 <b>&gt;250,0</b>	6.4 >100,0 >111,0	[ <a href="#">25</a> ] [ <a href="#">26</a> ] [ <a href="#">35</a> ]
Cilvēka neuroblastoma	SK-N-AS	2.5	1.1	[ <a href="#">23</a> ]
Cilvēka rabdomiosarkoma/medulloblastoma	TE671	10.3	4.6	
Cilvēka neuroblastoma	IET UZ	17.1	7.6	[ <a href="#">25</a> ]
Cilvēka neuroblastoma	NB-1	16.5	7.3	
Žurku glioma	C6	5.9	2.6	[ <a href="#">23</a> ]
Cilvēka vairogdziedzera karcinoma	FTC 238	6.8	3.0	
Cilvēka plaušu vēzis	Lu1	>45.2	>20,0	[ <a href="#">19</a> ]
Cilvēka nesīkšūnu plaušu karcinoma	NCI-H460	63.5	<b>28.1</b>	[ <a href="#">26</a> ]
Cilvēka plaušu karcinoma	A549	20.0 33.4 7.4 3.8	8.9 <b>14.8</b> 3.3 1.7	[ <a href="#">29</a> ] [ <a href="#">26</a> ] [ <a href="#">23</a> ] [ <a href="#">27, 28</a> ]
Human breast adenocarcinoma	MCF-7	23.3	10.3	

Vēža veids	Šūnu līnija	$IC_{50}$ $\mu M$	$\mu g / ml$	Atsauces
		30.7	<b>13.6</b>	[26]
		<b>8.32</b>	3.7	[32]
Human breast carcinoma	T47D	<b>5.2</b> <b>73.2</b>	2.3 32.4	[23] [33]
Human cervical carcinoma	HeLa	74.1 57.1 34.4 22.6 <b>6.7</b>	<b>32.8</b> <b>25.3</b> <b>15.2</b> <b>10.0</b> 2.9	24 h [24] 48 h [24] 72 h [24] [26] [32]
Human ovarian carcinoma cells	A2780	>45.2	<b>&gt;20.0</b>	[21]
Human prostate adenocarcinoma	PC-3	<b>17.9</b> 82.9	7.9 <b>36.7</b>	[27, 28] [26]
Hormone-dependent human prostate cancer	LNCaP	>45.2	<b>&gt;20.0</b>	[19]
Human gastric carcinoma	EPG85-257P	<b>18.7</b>	8.3	[36]
Human pancreatic carcinoma	EPP85-181P	<b>21.1</b>	9.3	
Human colorectal adenocarcinoma	DLD-1	<b>6.6</b>	2.9	[27, 28]
Human colorectal adenocarcinoma	HT-29	<b>4.3</b>	1.9	[23]
Human colon cancer	Col2	45.2	<b>&gt;20.0</b>	[19]
Human colorectal adenocarcinoma	SW707	<b>51.7</b>	22.9	[33]
Human hepatoma	HepG2	22.8	<b>10.1</b>	[26]
Human hepatocarcinoma	SK-HEP-1	132.1	<b>58.5</b>	
Human melanoma	G361	<b>12.4</b>	5.5	[25]
Human melanoma	SK-MEL-28	<b>16.2</b>	7.2	
Mouse melanoma	B16-F1	<b>13.8</b>	6.1	[27]
Mouse melanoma	B16 2F2	<b>27.4</b>	12.1	[37]
Human melanoma	MEL-2	>45.2	<b>&gt;20.0</b>	[38]
Human melanoma	SK-MEL2	<b>&gt;250.0</b>	>111.0	[35]
Human skin epidermoid carcinoma	A431	<b>6.8</b>	3.0	[32]
Human promyeloblastic leukaemia	HL60	<b>14.7</b>	6.5	[25]
Cilvēka leikēmija	U937	<b>14.4</b>	6.4	
Cilvēka T limfoblastu leikēmija	Jurkat E6.1	<b>6.7</b>	3.0	[23]

Vēža veids	Šūnu līnija	$IC_{50}$ $\mu M$	$\mu g / ml$	Atsauces
Peļu leikēmija	P388	<b>12.4</b>	5.5	
Cilvēka leikēmija	CCRF/CEM	<b>24.6</b>	10.9	[ <a href="#">33</a> ]
Cilvēka multiplā mieloma	RPMI 8226	<b>6.4</b>	2.8	[ <a href="#">23</a> ]
Cilvēka mutes epidermoīda karcinoma	KB	>45.2	<b>&gt;20,0</b>	[ <a href="#">19</a> ]
Kuņķa karcinoma, netipisks mitoksantrona MDR variants	EPG85-257RNOV	<b>12.3</b>	5.4	
Kuņķa karcinoma, klasiskais daunorubicīna MDR variants	EPG85-257RDB	<b>11.0</b>	4.9	[ <a href="#">36</a> ]
Aizkuņķa dziedzera karcinoma, netipisks mitoksantrona MDR variants	EPP85-181RNOV	<b>20.6</b>	9.1	
Aizkuņķa dziedzera karcinoma, klasiskais daunorubicīna MDR variants	EPP85-181RDB	<b>26.5</b>	11.7	
Cilvēka mieloleikēmija (rezistenta pret paklitakselu)	K562-Nodoklis	<b>250,0</b>	111,0	[ <a href="#">35</a> ]

#### Atvērt atsevišķā logā

Lai atvieglotu salīdzināšanu, devas tika pārrēķinātas uz  $\mu M$  vai  $\mu g / ml$ . Sākotnējie dati ir parādīti treknrakstā.

#### 2. tabula

BE *in vitro* antiproliferatīvā iedarbība uz cilvēka audzēju primārajām kultūrām, izmantojot  $IC_{50}$  vērtības (inhibējošā koncentrācija 50%).

Audzēja veids	Primārā kultūra	$IC_{50}$ $\mu M$	$\mu g / ml$	Atsauces
Olnīcu karcinoma	HPOC	<b>2.8</b>	1.2	
Dzemdes kakla karcinoma	HPCC	<b>3.4</b>	1.5	[ <a href="#">23</a> ]
Multiformā glioblastoma	HPGBM	<b>3.4</b>	1.5	

Lai atvieglotu salīdzināšanu, devas tika pārrēķinātas uz  $\mu M$  vai  $\mu g / ml$ . Sākotnējie dati ir parādīti treknrakstā.

Tiek uzskatīts, ka BE izraisa antiproliferatīvu un citotoksisku aktivitāti neatkarīgi no dabiskā avota. BE, kas izolēts no *Chaenomeles sinensis* KOEHNE, ir inhibējošs efekts (ar  $IC_{50}$  20,9  $\mu M$ ) uz mīksto agara koloniju veidošanos, ko inducē TPA (12 - O -tetradekanoilforbol-13 acetāts) peles epidermas šūnās (JB6 Cl 22, Cl 41). šūnas) [ [18](#) ], savukārt BE no *Celtis philippinensis* zariem kavēja plaušu vēža šūnu proliferāciju [ [19](#) ], un BE no *Belamcanda chinensis* (L.) DC saknēm bija efektīvs pret krūts, prostatas un kuņķa vēža šūnām [ [20](#) ]. Tāpat BE no *Coussarea paniculata* zariem samazināja cilvēka olnīcu karcinomas šūnu proliferāciju [ [21](#) ], savukārt BE no *Cyrtomium fortunei* (J.) kavēja cilvēka prostatas un kuņķa vēža šūnu līniju augšanu [ [22](#) ].

BE ir uzrādījis diezgan atšķirīgu antiproliferatīvās aktivitātes diapazonu atkarībā no vēža šūnu veida, sākot no vājas šūnu proliferācijas kavēšanas cilvēka eritroleikēmijas šūnu līnijā (K562), līdz spēcīgai inhibīcijai cilvēka neuroblastomas šūnās (SK-N-AS), kur efekts ir bijis visizteiktākais (1. tabula un atsauces tajā). Turklāt ir konstatēts, ka BE arī uzrāda nozīmīgu citotoksicitati pret primāro vēža šūnu kultūrām, kas izolētas no olnīcu, dzemdes kakla karcinomas un glioblastomas, kur  $IC_{50}$  vērtības ir svārstījušās no 2,8 līdz 3,4  $\mu M$  [ [23](#) ].2. tabula), kas ir ievērojami zemāks, salīdzinot ar citu audzēju šūnu līnijām [ [21](#) , [24](#) ].

Citi pētījumi ir parādījuši skaidri izteiktu BE ietekmi uz cilvēka nervu audzēju šūnu līnijām ar IC<sub>50</sub> vērtību 10,3  $\mu\text{M}$  TE671 (rabdomiosarkoma/medulloblastoma), neuroblastomas šūnām – 2,5  $\mu\text{M}$  SK-N-AS [ 23 ], 17,1  $\mu\text{M}$ . GOTO un 16,5  $\mu\text{M}$  NB-1 šūnu līnijā [ 25 ], un glias audzēju gadījumā - 5,9  $\mu\text{M}$  C6 (žurku glioma) [ 23 ].

Jāpiemin, ka BE ir arī izraisījis ievērojamu antiproliferatīvu potenciālu pret cilvēka vairogdziedzera karcinomas FTC 238 šūnām un koncentrācija 6,8  $\mu\text{M}$  ir efektīvi kavējusi 50% šūnu proliferāciju pēc 48 stundu ārstēšanas [ 23 ].

Ir pētīts BE pretvēža potenciāls cilvēka plaušu vēža šūnās Lu1 (ar IC<sub>50</sub> vērtībām >45,2  $\mu\text{M}$ ) [ 19 ], NCI-H460 (nesīksūnu plaušu karcinoma, IC<sub>50</sub> vērtība 63,5  $\mu\text{M}$ ) [ 26 ] un A549. Interesanti, ka A549 šūnu līniju ir plaši pētījuši vairāki autori, un IC<sub>50</sub> vērtības ir skaidri svārstījušās no 3,8  $\mu\text{M}$  [ 27 , 28 ] līdz 7,4  $\mu\text{M}$  [ 23 ] un 20  $\mu\text{M}$  [ 29 ] līdz 33,4  $\mu\text{M}$  [ 29 ]. Cits pētījums parādīja, ka BE deva, kas nepieciešama, lai sasniegta 10% šūnu dzīvotspējas inhibīciju (ID<sub>10</sub>) A549 šūnās, ir bijusi 0,7  $\mu\text{M}$  un efekts, kas iegūts pēc 24 stundām, ir gandrīz dubultojies, kad ārstēšana tika pagarināta līdz 48 h (0,4  $\mu\text{M}$ ) [ 30 ]. **Turklāt tika atklāts, ka BE ir arī nedaudz spēcīgāks pretvēža līdzeklis nekā cisplatīns (IC<sub>50</sub> vērtība 25  $\mu\text{M}$ ) attiecībā uz cilvēka plaušu vēža A549 šūnu līniju [ 29 ], tomēr tika pierādīts, ka tas ir arī neaktīvs pret nesīksūnu bronhopulmonāru karcinomu. NSCLC-N6) [ 31 ].**

BE ir novērtēts *in vitro* arī attiecībā uz tā pretvēža potenciālu attiecībā uz visbiežāk diagnosticētajiem vēža veidiem sievietēm visā pasaule [ 1 ]. Ir pierādīta tā inhibējošā iedarbība uz cilvēka krūts, dzemdes kakla un olnīcu karcinomas šūnu augšanu. BE kavēja šūnu proliferāciju par 53,2% koncentrācijā 20  $\mu\text{M}$  MCF-7 un *Bcap*-37 šūnu līnijas (abās krūts vēža šūnu līnijas) [ 20 ]. Citi pētījumi ir parādījuši, ka BE koncentrācijā 10  $\mu\text{M}$  (4,43  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) un 30  $\mu\text{M}$  (13,28  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) inhibēja attiecīgi par 25,81% un 35,54% MCF-7 šūnu proliferāciju. Vairākos citos pētījumos ziņots par ievērojami augstākām IC<sub>50</sub> vērtībām MCF-7 šūnām - 23,3  $\mu\text{M}$  [ 27 , 28 ] un 30,7  $\mu\text{M}$  [ 26 ]. T47D šūnu līnijai ir būtiski mainījusies jutība pret BE antiproliferatīvajām īpašībām ar IC<sub>50</sub> vērtību no 5,2  $\mu\text{M}$  [ 23 ] līdz 73,2  $\mu\text{M}$  [ 33 ]. No otras puses, ir pierādīts, ka BE izraisa apmēram trīs reizes vājāku antiproliferatīvo aktivitāti (IC<sub>50</sub> vērtība 17  $\mu\text{M}$ ), salīdzinoši ar citostatisko līdzekli 5-fluoruracilu (5-FU, ar IC<sub>50</sub> vērtību 5,34  $\mu\text{M}$ ) pret MCF-7 šūnu līniju [ 34 ]. Cilvēka dzemdes kakla vēža šūnu (HeLa šūnu līnija) proliferācija tiek inhibēta atkarībā no devas un lietošanas laika. IC<sub>50</sub> vērtības pēc 24 stundām bija 74,1  $\mu\text{M}$  [ 24 ], pēc 48 h 22,6  $\mu\text{M}$  [ 26 ] un 57,1  $\mu\text{M}$  [ 24 ], un 6,67  $\mu\text{M}$  [ 32 ] un 34,4  $\mu\text{M}$  pēc [ 24 h. Citi autori ir ziņojuši, ka BE kavē HeLa šūnu proliferāciju koncentrācijā 10  $\mu\text{M}$  (4,43  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) un 30  $\mu\text{M}$  (13,28  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) attiecīgi par 73,02% un 81,39% [ 16 ]. Ir pierādīts, ka BE koncentrācijā >45,2  $\mu\text{M}$  sasniedz 50% šūnu proliferācijas inhibīciju cilvēka olnīcu karcinomas šūnās (A2780 šūnu līnija) [ 21 ].

Turklāt daži pētījumi ir arī snieguši pierādījumus tam, ka BE izraisa antiproliferatīvu aktivitāti pret cilvēka prostatas vēzi, tostarp no androgēniem atkarīgo veidu. Tomēr lielas neatbilstības parādās, salīdzinot IC<sub>50</sub> vērtības ar to pašu šūnu līniju PC-3, sākot no 17,9  $\mu\text{M}$  [ 27 , 28 ] līdz 82,9  $\mu\text{M}$  [ 26 ] līdz > 250  $\mu\text{M}$  [ 35 ]. Piemēram, BE inhibēja PC-3 šūnu proliferāciju par 18,4% [ 22 ] un par 17,3% koncentrācijā 20  $\mu\text{M}$  [ 20 ], savukārt LNCaP šūnās (no androgēniem atkarīga cilvēka prostatas vēža šūnu līnija) IC<sub>50</sub> bija virs 45,2  $\mu\text{M}$  [ 19 ].

Ir arī pierādīts, ka BE piemīt antiproliferatīva aktivitāti pret cilvēka gremošanas sistēmas vēzi. BE ir inhibējis proliferāciju par 50% aizkuņga dziedzera karcinomas (EPP85-181) un cilvēka kuņķa (EPG85-257) šūnu līnijas, attiecīgi 21,09  $\mu\text{M}$  un 18,74  $\mu\text{M}$  koncentrācijā [ 36 ]. Citas kuņķa vēža šūnu līnijas (MGC-803) proliferācija tika inhibēta par 43,7% [ 20 ] un 45,1% [ 22 ] koncentrācijā 20  $\mu\text{M}$ . Ir pētīts, ka BE ir antiproliferatīvs potenciāls pret cilvēka kolorektālo adenokarcinomu, DLD-1, HT-29, Col2 un SW707 šūnām. Šūnu proliferācijas kavēšana, reaģējot uz BE, ir bijusi ļoti atkarīga no šūnu līnijas. Betulīna IC<sub>50</sub> DLD-1 [ 27 , 28 ] un HT-29 resnās zarnas vēža šūnu [ 23 ] vērtības ir bijušas salīdzināmas, attiecīgi 6,6  $\mu\text{M}$  un 4,3  $\mu\text{M}$ , un ievērojami zemākas nekā Col2 šūnām ar IC<sub>50</sub> vērtībām 45,2  $\mu\text{M}$  [ 19 ], bet SW707 šūnām - 51,7  $\mu\text{M}$  [ 33 ]. Un otrādi, BE ir neefektīvs pret HT-29 šūnām, kur IC<sub>50</sub> vērtība ir lielāka par 250  $\mu\text{M}$  [ 35 ].

BE ir arī pierādījis ārkārtīgi daudzveidīgu antiproliferatīvu iedarbību uz cilvēka hepatomas šūnu līnijām. IC<sub>50</sub> vērtības ir svārstījušās no 22,8 μM HepG2 šūnās līdz 132,1 μM SK - HEP-1 šūnām [ 26 ]. BE deva, kas nepieciešama, lai sasniegtu ID<sub>10</sub> HepG2, ir bijusi 1,02 μM , un antiproliferatīvais efekts, kas iegūts pēc 24 stundām, ir gandrīz dubultojies pēc ārstēšanas laika pagarināšanas līdz 48 stundām (0,5 μM ) [ 30 ].

Turklāt BE ir pārbaudīts ar daudzsološiem rezultātiem attiecībā uz tā citotoksicitāti un inhibējošo aktivitāti pret vairākām melanomas šūnu līnijām. BE IC<sub>50</sub> vērtības cilvēka melanomas šūnās G361 un SK-MEL-28 ir bijušas salīdzināmas, attiecīgi 12,4 μM un 16,2 μM [ 25 ], līdzīgi kā peļu melanomas B16-F1 šūnām — 13,8 μM [ 27 ], **kas liecina, ka BE antiproliferatīvais potenciāls nav bijis atkarīgs no šūnu izcelmes (cilvēka vai dzīvnieka)**. Līdzīgi, BE (koncentrācijā 10 μM) uzrādīja izteiktu citu peles melanomas B16A45 šūnu līnijas dzīvotspējas samazināšanos, kā rezultātā dzīvotspējīgo šūnu skaits samazinājās par 52%, salīdzinot ar kontroli [ 39 ], bet tai ir mērena aktivitāte pret mutes KB šūnu epidermoīdo karcinomu (IC<sub>50</sub> vērtība ).>45,2 μM ) [ 38 ] un kopējā neaktivitāte pret melanomas SK- MEL2 šūnām ar IC<sub>50</sub> vērtību, kas lielāka par 250 μM [ 35 ]. Cita ādas vēža epidermoīda karcinomas A431 šūnu līnija bija daudz jutīgāka pret BE ārstēšanu; koncentrācijas 10 μM (4,43 μg /mL) un 30 μM (13,28 μg/mL) ir inhibējuši proliferāciju attiecīgi par 63,42% un 70,30% [ 16 ], un IC<sub>50</sub> vērtība bija 6,76 μM [ 32 ].

BE citotoksicitāte un antiproliferatīvā aktivitāte ir apstiprināta arī cilvēku un peļu hematoloģisko ļaundabīgo audzēju panelī *in vitro*. BE izraisa ievērojamu šūnu augšanas nomākšanu vairākos leikēmijas modeļos, HL60 un U937 šūnu līnijās [ 25 ] ar salīdzināmām IC<sub>50</sub> vērtībām attiecīgi 14,7 un 14,4 μM, bet visizteiktākā ietekme ir novērota Jurkat E6.1 šūnās . 6,7 μM [ 23 ]. Ir novērota gandrīz divas reizes vājāka BE aktivitāte pret cilvēka leikēmijas CCRF/CEM šūnām, salīdzinot ar peļu leikēmijas P388 šūnu līniju (IC<sub>50</sub> 24,6 pret 12,4 μM ) [ 33]. Lai gan šos rezultātus apstrīd citi pētījumi, kas liecina par pilnīgu BE aktivitātes trūkumu pret CEM šūnām - IC<sub>50</sub> vērtība> 250 μM [ 35 , 40 , 41 ]. Līdzīgas atšķirības ir pierādītas attiecībā uz cilvēka hronisku mieloleikozi K562, turpretim, no vienas puses, BE tiek ziņots kā aktīvs - ar IC<sub>50</sub> vērtību 14,5 μM [ 25 ], bet, no otras puses, tā ir pilnīgi neaktīva, IC<sub>50</sub> vērtības > 200 μM [ 26 ] un 250 μM [ 35 ]. Papildu pētījumi ir pierādījuši ievērojamu BE aktivitāti cilvēka multiplās mielomas RPMI 8226 šūnu līnijā, kur koncentrācija 6,4 μM kavēja 50% šūnu augšanu pēc 48 stundu ārstēšanas [ 23 ].

Nozīmīgās neatbilstības starp IC<sub>50</sub> BE devām attiecībā uz tām pašām šūnu līnijām, A549 [ 23 , 26-29], T47D [ 23 , 33 ] , PC-3 [ 26-28 , 35 ], CCRF/CEM [ 33 , 35 , 40 , 41 ] un K562 [ 25 , 26 , 35 ], ko novērtējuši dažādi autori, šķiet, ir dažādu BE avotu un ekstrakcijas procedūru, kā arī standartizētu ārstēšanas metožu trūkuma (ārstēšanas laiki, devas un individuālās īpatnības) rezultāts. katrs laboratorijas šūnu celms).

**BE uzrāda antiproliferatīvu un citotoksku aktivitāti pret vēža šūnu līnijām, kas ir rezistentas pret parastajām citostatiskām zālēm, kas liecina par jaunu darbības mehānismu.** Ir pierādīts, ka BE izraisa ievērojami spēcīgāku antiproliferatīvu iedarbību (ar IC<sub>50</sub>) pret daunorubicīnu un mitoksantronu rezistentām vēža šūnām, piemēram, pret DB rezistento cilvēka kuņģa vēža 257RDB šūnu līniju (IC<sub>50</sub> 10,97 μM ) un NOV rezistenta (Novantrone) cilvēka kuņģa vēža 257RNOV šūnu līniju (IC<sub>50</sub> 12,25 μM), kā arī cilvēka aizkuņģa dziedzera karcinomas 181RNOV šūnu līniju (IC<sub>50</sub> 20,62 μM ), savukārt BE ir bijis neaktīvs attiecībā uz K562-Tax (pret paklitakselu rezistentu cilvēka hroniskas mieloleikozes apakšlīniju), ar IC<sub>50</sub> vērtību >250 μM [35], (kas ir ļoti liela deva, tulk. piezīme). Neskatoties uz to, betulīnam ir spēja pārvarēt dažus zāļu rezistences veidus vēža šūnās, kas ir izturīgas pret parastajiem kīmijterapijas līdzekļiem [ 36 ].

Ekstrakcijas un attīrišanas metodēm ir svarīga loma BE un tā atvasinājumu pakārtotajā darbībā. Arvien vairāk pierādījumu liecina, ka BE ekstraktiem, kas satur arī citus lupāna grupas triterpēnus un betulīnskābi, ir labāks terapeitiskais potenciāls nekā tīram BE. Dažos gadījumos ir konstatēts, ka izolēta BE izraisa vājāku antiproliferatīvu aktivitāti pret cilvēka kuņģa audzēja šūnu līniju (EPG85-257P) (1. tabula), salīdzinot ar neapstrādātu bērza mizas ekstraktu, savukārt citos gadījumos tīram BE ir novērota spēcīgāka inhibējošā iedarbība uz aizkuņģa dziedzera karcinomas šūnām (EPP85-181P), salīdzinot ar bērza mizas ekstraktu [ 36 ]. Bērzu ārējā miza satur BE kā galveno sastāvdaļu, bet arī dažus citus pentacikliskos triterpēnus [ 42 ]. Tādējādi dažādu triterpēnu

kombinācijas ar dažādām aktivitātēm un darbības veidiem sinerģiskā iedarbība zināmā mērā varētu izskaidrot *in vitro* iegūto rezultātu atšķirības starp bērza mizas ekstraktu un attīritu BE. Lai gan šī darbība vai darbību kombinācija ir atkarīga no bērza sugas veida. Ir konstatēts, ka no Eiropas baltajiem bērziem, iegūtais ekstrakts uzrāda izteiktāku antiproliferatīvo potenciālu pret daunorubicīnu un mitoksantronu rezistentajām cilvēka kuņģa un aizkuņģa dziedzera karcinomas šūnu līnijām - ( $IC_{50}$  vērtības  $4,29\text{--}7,08 \mu M$  un  $9,07\text{--}23,03 \mu M$ ). Tāpat ar BE bagātais (apmēram 97%) bērza mizas ekstrakts (*B. pendula* Roth) uzrādījis spēcīgu antiproliferatīvu potenciālu pret cilvēka vēža šūnu līnijām A431, A2780, HeLa un MCF7 *in vitro* ar  $IC_{50}$  vērtībām no  $2,26 \mu M$ . Līdz  $11,29 \mu M$  (1 un 5  $\mu g / mL$ ) [43]. Citā pētījumā *B. pendula* Roth mizas ekstrakts ar 57,01% BE saturu koncentrācijā  $17,53 \mu M$  ( $7,76 \mu g / mL$ ) un  $52,61 \mu M$  ( $23,29 \mu g / mL$ ) ir kavējis A431 proliferāciju (ar 70,02% un 78,70%, resp.), MCF-7 (par 45,54% un 55,55%, attiecīgi) un HeLa (par 70,62% un 76,23%, attiecīgi), kas liecina, ka tas ir spēcīgākas par tīru BE [16]. Augsti attīrīts triterpēna ekstrakts (TE) no *Betulae* tāss ar BE kā galveno komponentu (līdz 87,3 % identificēto triterpēnu) uzrādīja no devas atkarīgu citotoksicitāti no  $0,090 \mu M$  ( $0,04 \mu g / mL$ ) līdz  $90,35 \mu M$  ( $40 \mu g / mL$ ) cilvēka nemirstīgos keratinocītos (HaCaT) un ādas vēža A431 (plakanšūnu karcinomas) šūnu līnijās. Ir pierādīts, ka betulīns veido veido oleogēlu, kas atvieglo tā uzklāšanu uz ādas, ja ir dermatoloģisks indikācijas [44].

**Būtiska priekšrocība, izmantojot BE kā bioaktīvu līdzekli, ir tā zemā toksicitāte pret normālām šūnām** [45]. BE ir uzrādījis salīdzinoši nelielu citotoksicitāti pret cilvēka ādas fibroblastiem. Devām, kas mazākas par  $10 \mu M$ , nav acīmredzamas toksicitātes [23]. Attiecībā uz peles fibroblastu šūnu līniju (Balb3T3)  $IC_{50}$  vērtība ir  $106,8 \mu M$  ( $47,3 \mu g / mL$ ) [33].

No otras puses, BE ir uzrādījis ievērojamu antiproliferatīvu iedarbību pret cilvēka normālas ādas fibroblastiem (WS1), ar  $IC_{50}$  vērtību  $3,6 \mu M$  [27, 28] un normāliem plaušu fibroblastiem WI38 ( $IC_{50} 15 \mu M$ ) [25]. Lai gan ir tikai daži ziņojumi par BE ietekmi uz normālām šūnām, ir apstiprināts, ka dažādas izceļsmes nevēža šūnas ir izturīgākas pret BE ārstēšanu nekā audzēja šūnas, kas norāda uz zināmu šūnu tipa selektivitāti. Šie iepriecinošie *in vitro* pētījumu rezultāti padara BE par daudzsološu terapeitisku kandidātu pret dažāda veida audzējiem.

Ir pierādīts, ka BE ievērojami kavē vairāku vēža šūnu veidu, tostarp plaušu (plaušu karcinomas A549 šūnas) un centrālās nervu sistēmas audzēju (šūnu līnijas C6-glioma un TE671-rabdomiosarkoma/medulloblastoma) šūnu migrāciju [23].

**Ir ziņots arī par BE antiangiogēno iedarbību *in vivo* pētījumos.** Izmantojot vistu embriju horioalantoiskās membrānas (CAM) modeli, tika pētīta asinsvadu veidošanās, BE antiangiogēnā aktivitāte tika pierādīta, jo tas inhibēja jaunu kapilāru veidošanos, kas, iespējams, baroja endotēlija šūnas [43]. Šo aktivitāti var vēl vairāk uzlabot, izmantojot BE nanoemulsijas sastāvā, lai palielinātu iekļūšanu ārpuseembrionālajos audos [46]. Līdzīgi melanomas audzēja lieluma samazināšanās C57BL / 6J peļu modelī (pēc B164A5 audzēja šūnu inokulācijas) pēc BE ārstēšanas ir saistīta ar tā antiangiogēno aktivitāti. Patiešām, imūncitoķīmiskās analīzes parādīja samazinātu VEGF (asinsvadu endotēlija augšanas faktors) ekspresiju pelēm, kas tika ārstētas ar BE- $\gamma$ -ciklodekstrīna atvasinājuma (GCDG) salīdzinājumā ar kontroles grupu [39]. Joprojām ir jānosaka BE antimigrācijas un antiangiogēno aktivitāšu molekulārais pamats.

**Strauji pieaugošais pētījumu skaits ir parādījis, ka apoptozes (šūnu nāves) ierosināšana, ko veicina, tostarp, arī betulīns, ir būtisks pretvēža līdzekļu darbības mehānisms** [47-49]. Ir pierādīts, ka apoptozes mehānismu darbības traucējumi ir tipiska audzēja šūnu īpašība [50-52]. Apoptoze ir ieprogrammētas šūnu nāves veids, ko raksturo virkne sarežģītu, specifisku bioķīmisku un citomorfologisko notikumu. Ir identificēti divi galvenie apoptozes ceļi: ārējais (ar nāves receptoriem saistīts) un iekšējais (atkarīgs no mitohondrijiem). Ārējo ceļu ierosina ārējie signāli, piemēram, molekulu (ligandu), tostarp, Fas, TNF vai TRAIL, saistīšanās ar attiecīgajiem nāves receptoriem, kas lokalizēti šūnas virsmā. Iekšējo apoptozes ceļu aktivizē dažādi stimuli, piemēram, DNS bojājumi, oksidatīvais stress, starojums un augšanas faktora trūkums [53].

Ir pierādīts, ka spēja izraisīt apoptozi audzēja šūnās ir viens no mehānismiem, kas ir BE citotoksicitātes un tā antiproliferatīvā potenciāla pamatā. Ārstēšana ar BE ir izraisījusi citomorfoloģiskas izmaiņas, kas raksturīgas šūnām, kurās notiek apoptoze, piemēram, šūnu noapaļošanās, hromatīna kondensācija, kodola fragmentācija, membrānas burbuļošana un apoptotisku šūnas organelu veidošanās [ 26 ]. Tāpat HeLa šūnu (šūnas laboratorijas apstākļos, ko kultivē kā nemirstīgas) proliferācijas kavēšanu pavada morfoloģiskas izmaiņas, kas raksturīgas apoptozei: šūnas ir kļuvušas mazākas un morfoloģija uzrādīja kariopiknozi pēc 24 stundu ilgas BE iedarbības. Efekts bija atkarīgs no devas [ 24 ]. Peļu melanomas šūnu B164A5 ārstēšana ar BE ir parādījusi gandrīz vienādu daudzumu apoptotisku un mirušu (nekrotisku) šūnu [ 39 ]. Ir pierādīts, ka BE *in vitro* izraisa apoptotisku šūnu nāvi cilvēka plaušu adenokarcinomas šūnās (A549 šūnu līnija). Apoptotisko šūnu daudzums ir ievērojami palielinājies - par 27,64%, salīdzinot ar kontroles, neapstrādātām šūnām [ 29 ]. Ir pierādīts, ka BE būtiski palielina citozola oligonukleosomu fragmentu skaitu A549 šūnu līnijā [ 23 ]. Detalizētāki pētījumi ir parādījuši, ka BE inducē cilvēka vēža šūnu apoptozi caur mitohondriju (iekšējo) ceļu A549, Jurkat [ 54 ] un HeLa vēža šūnu līnijās [ 26 , 54 ]. BE proapoptotiskā aktivitāte HeLa šūnās ir saistīta ar kaspāžu 9, 3 un 7 secīgu aktivāciju un ADP-ribozes polimerāzes (PARP) šķelšanos [ 24 ].

Ir novērota kaspāzes-3 substrāta PARP šķelšanās līdz proteīna 85 kDa formai, kas norāda uz kaspāzes aktivētu apoptotisku šūnu nāvi. Kaspāzes-8 aktivitāte palika nemainīga, kas liecina par ārējā ceļa aktivācijas trūkumu, savukārt ir pierādīts, ka kaspāzes-9 sākotnēji tika aktivizēts, kam seko citohroma c / Smac proteīnu izdalīšanās no mitohondriju starpmembrānu telpas, mitohondriju membrānas potenciāla depolarizācija un ātra Baksa un Bak proteīnu (proapoptotisko Bcl-2 radniecīgu locekļu) translokācija uz mitohondrijiem [ 26 ]. Citā pētījumā BE neietekmēja kopējo Bax un Bcl-2 ekspresiju, mRNS, kā arī proteīna līmeni un Bak proteīna kopējo ekspresiju HT-29 vēža šūnās [ 23 ]. Tomēr daži ziņojumi ir parādījuši, ka ārstēšana ar BE izraisīja citu šūnu proteīnu ekspresiju, kas netieši iesaistīti apoptozē. Ir pierādīts, ka, izmantojot proteomisko pieejumu, BE pārregulē akonitāta hidratāzi un malāta dehidrogenāzi vēža šūnās. Tie ir enzīmi, kas iesaistīti ATF veidošanā, atbalstot mitohondriju ceļa iesaistīšanos kā galvenos BE izraisītās apoptotiskās šūnu nāves mehānismus [ 29 ].

BE terapija izraisīja arī poli (rC) saistošā proteīna ekspresijas samazināšanos. Tika ziņots, ka poli (rC) saistošais proteīns 1 aizsargā šūnas no dažādiem apoptozes induktoriem un modulē karstuma šoka proteīna 90 -  $\alpha$  2 (HSP90-  $\alpha$  2) ekspresiju, kas ir iesaistīts mitohondriju membrānas caurlaidības un citohroma C izdalīšanās regulēšanā. Tas varētu būt mehānisms, ar kura palīdzību BE sensibilizē vēža šūnas, lai tās pakļautos apoptozei. Turklāt attīrīts bērza tāss ekstrakts no dažādu bērzu tāss, kas satur BE kā galveno sastāvdaļu, parāda no devas atkarīgu proapoptotisku iedarbību uz HaCaT un A431 šūnām, līdzīgi kā no betulīna atvasināta betulīnskābe (BS) [ 44 ].

Apoptozes indukcija bieži ir šūnu cikla traucējumu sekas. Šūnu cikla progresēšanu kontrolē ciklīni, kas ir no šūnu cikla atkarīgo kināžu (CDK) regulējošo proteīnu saime [ 55 ]. Šūnu cikla regulēšana ir kļuvusi par izaicinājumu un daudzsoļošu mērķi vēža terapijai [ 56 ]. Tādējādi ir ziņots, ka daudzi pretvēža līdzekļi aptur šūnu ciklu  $G_0$  /  $G_1$ , S vai  $G_2$  / M fāzēs un attiecīgi izraisa vēža šūnu apoptozi [ 57-60 ].

Pārsteidzoši, ka BE šūnu cikla regulēšanā vēža šūnās ir pievērsta ierobežota uzmanība. Ir pierādīts, ka BE koncentrācijā 10  $\mu$ M izraisa peles melanomas B164A5 šūnu apstāšanos S fāzē, vienlaikus samazinot šūnu skaitu  $G_0$  /  $G_1$  fāzēs [ 39 ]. HepG2 šūnu (hepatomas) ārstēšana izmantojot BE, izraisīja vēlinās stadijas  $G_0$  /  $G_1$  fāzes šūnu cikla apstāšanos un, agrīnā stadijā, S fāzi ar sekojošu šūnu daudzuma samazināšanos  $G_2$  / M fāzēs, salīdzinoši zemā koncentrācijas (11,29  $\mu$ M / 5  $\mu$ g/ml). Līmenī. Cits pētījums, kurā tika izmantotas hepatomas Hep3B šūnas, parādīja, ka BE terapija izraisīja šūnu cikla apstāšanos  $G_2$  / M fāzē, parādot atšķirīgu BE ietekmi uz šūnu cikla regulēšanu atkarībā no hepatomas šūnu veida. Turklāt ir ziņots, ka BE nedaudz samazina DNS replikāciju, neietekmējot šūnu ciklu regulējošo gēnu p21 un p53 ekspresijas līmeni hepatomas šūnās [ 61 ]. p21 un p53 ( p21 un p53 proteīni ir ciklīnatkarīgo kināžu inhibitori, kas aptur bojāto šūnu reprodukciiju) ekspresijas līmenis netika ietekmēts arī pēc ārstēšanas ar BE citās audzēju šūnu līnijās, kuru izcelsmē ir centrālās nervu sistēmas (meduloblastoma/rabdomiosarkoma, neiroblastoma un glioma) šūnas un audi, kā arī dažādiem perifēriem vēža veidiem, tostarp plaušu, resnās zarnas, vairogdziedzera, krūts, leikēmijas, multiplās mielomas, un vairākas citas audzēju primārās kultūras [ 23 ].

Šūnu dalīšanās traucējumi pēc ārstēšanas ar BE var būt saistīti ar tiešu mijiedarbību ar DNS topoizomerāzem (Topo), bet ne ar DNS, koncentrācijās, kas ir salīdzināmas ar labi zināmā inhibitora etopozīda koncentrāciju. Ir ziņots, ka BE, starp citiem lupāna un oleanāna tipa triterpenoīdiem no *Phyllanthus flexuosus* mizas, selektīvi inhibē cilvēka Topo II aktivitāti atkarībā no devas. Ir zināms, ka Topo ir būtiska loma DNS metabolismā, ietekmējot replikāciju, transkripciju, rekombināciju un mitotisko hromosomu segregāciju [ 62 ]. Tādējādi Topo varētu būt BE pretvēža aktivitātes mērķis. Ir zināms, ka Topo I inhibitori izraisa apoptozi vēža šūnās [ 63 , 64].

Vēl viens enzīms, kas iesaistīts šūnu dalīšanā un ko ietekmē BE ārstēšana ( $IC_{50}$  20  $\mu M$ ), ir cAK (cikliskā AMP atkarīgā proteīnkināze), ko aktivizē daudzi ārpussūnu un intracelulāri signāli. Centrālais tīkla spēlētājs cAK ir iesaistīts dažādu Šūnu procesu regulēšanā, tostarp metabolismā, šūnu dalīšanā, specifiskā gēnu ekspresijā un attīstībā [ 65 ]. CAK inhibīcija ar BE ir specifiska, jo netika novērotas izmaiņas ERK1/2 un AKT kināžu aktivitātē [ 23 ]; abas pēdējās kināzes bieži ir patoloģiski hiperaktivētas vairākos cilvēka vēža veidos [ 66 , 67 ].

Ir meklēta BE ietekme uz cilvēka melanokortīna (MC) receptoru signālu ceļu. Cilvēka MC receptorus ekspresējošās COS-7 šūnas saista BE ar atšķirīgu specifiku atkarībā no MC apakštipa. BE afinitāte pret MCR ir  $MC1 > MC3 > MC5 > MC4$ . Turklat BE zināmā mērā antagonizē  $\alpha$ -melanocītus stimulējošā hormona ( $\alpha$ -MSH-) izraisītu cAMP uzkrāšanos peles melanomas šūnu līnijā B16-F1, kas dabiski ekspresē MC1 receptoru, nestimulējot ar MC receptoriem saistītu cAMP veidošanos [ 68 ]. MC1 receptoru apakštips izpaužas gandrīz katrā ādas šūnu tipā, imūnās un melanomas šūnās [ 69 , 70 ]. Ir arī vērts pieminēt, ka ir ierosināts, ka MC1 receptors ir būtisks epidermas melanocītu proliferācijas un diferenciācijas modulators [ 71 , 72 ], un tas ir ierosināts kā svarīgs BE un tā strukturāli līdzīgu vielu antimelanomas aktivitātes mērķis. BA [ 68 ].

#### 4. Kanceroģēzes un antimutagēnas aktivitātes inhibīcija *in vivo*

**BE ir apstiprināts kā spēcīgs ādas kanceroģēzes antimutagēns līdzeklis.** Lokālais preparāts ar BE nanoemulsiju ir pārbaudīts uz C57BL/6J tipa peļu ādas, ko ķīmiski sabojājis DMBA (7,12-dimetilbenz[ $\alpha$ ]antracēns) kā audzēja ierosinātājs un 12-O-tetradekanoilforbol-13-acetāts (TPA). Kā audzēja veicinātājs. Potenciāli jebkurš ādas virsmas bojājums var izraisīt nopietnas patoloģijas, piemēram, ādas neoplazmu. Ādas bojājumu novērojumi ir atklājuši BE aktivitāti ādas bojājumu un kairinājuma mazināšanā, ievērojami samazinot eritēmu [ 73 ]. BE lokālai lietošanai ir bijusi attāla iedarbība, kas ietekmējusi izolētu aknu mitohondriju funkciju, pelēm izraisītas ādas karcinomas divpakāpju modelī. Ir novērota aknu mitohondriju skābekļa patēriņa uzlabošanās. Kancerogēniem nokļūstot uz ādas virsmas, var veidoties toksiska ietekme uz iekšējiem orgāniem, BE var traucēt arī kancerogēnu iekļūšanu organismā un samazināt bojājumus galvenajos orgānos, piemēram, aknās. Ir arī pierādīts, ka BE kavē ādas audzēju parādišanos un veidošanos [ 46 ].

Bērza mizas sausais ekstrakts (BMSE), ar BE kā galveno sastāvdaļu — vismaz 70%, tika uzklāts uz ādu pelēm ar ķīmiski inducētu mutaģenēzi. 150 un 1500 mg/kg BDE ievadišana pelēm neizraisīja mutagēnu iedarbības. Šūnu skaits ar hromosomu aberācijām bija salīdzināms stāp kontroles un ar BMSE ārstētiem dzīvniekiem. Turklat BMSE devās 50, 150 un 450 mg/kg ievērojami samazināja mutagēnu, dioksīdīna (2,3-bis-(hidroksimetil)hinoksalīna 1,4-di-N-oksīds, DN) un ciklofosfamīda citoģētisko iedarbību. Vienreizēja apstrāde ar BMSE 50 un 150 mg/kg devās rada aptuveni tādu pašu antimutagēno efektu un samazina DN kaitīgo aktivitāti attiecīgi par 53–60% un 60%. BMSE inhibē brīvo radikālu oksidāciju un tādējādi DN proksidantu mutagēno aktivitāti. BMSE aizsargājošo aktivitāti, iespējams, ietekmē dažādi mehānismi, piemēram, citohroma P450 aktivācija, kam ir izšķiroša nozīme ceruloplazmīna metabolismā, vai stimulējot interferonu ražošanu, kas var uzlabot DNS atjaunošanos [ 74 ].

## 5. Iespējamais pielietojums terapijā

---

Līdz šim nav publicēti tipiski klīniskie pētījumi, izmantojot BE cilvēka vēža ārstēšanai [ 12 ]. Tomēr nerandomizēts izmēģinājuma pētījums, kurā tika izmantots bērza mizas ekstrakts, lai ārstētu aktīniskās keratozes (AK) [ 75 , 76 ], liecina par profilaktisku un ārstniecisku BE iedarbību ādas patoloģiju gadījumā. To apliecina arī *in vivo* pētījumi[ 73 ]. Tieks uzskatīts, ka AK ir agrīna un neinvazīva plakanšunu karcinomu *in situ* histoloģiskās līdzības dēļ [ 77 ]. Tā kā parasti diagnosticētie ādas bojājumi, ko izraisa ultravioletā gaisma, ir jāārstē, lai izvairītos no nemelanomas ādas vēža attīstības, BE šeit ir būtiska nozīme [ 78 ]. Bērzu mizas ziede (satur aptuveni 87% triterpēnu ar dominējošo BE saturu, 80%), ko lietoja kā monoterapiju AK ārstēšanai, izraisīja vairāk nekā 75% bojājumu remisiju 79% pacientu. Betulīnu saturošs oleogēls ir apstiprināts lietošanai kā kosmētikas līdzeklis Vācijā [ 75 ]. Turklāt nesenie testi ar bezūdens oleogēlu uz BE bāzes, kas satur augstāku ekstrakta koncentrāciju, ir apstiprinājuši uz BE balstītas stratēģijas efektivitāti AK terapijā. Ārstēšana izraisīja pilnīgu bojājumu izuzušanu 64% un daļēju remisiju (vairāk nekā 75% bojājumu) 86% pacientu pēc trīs mēnešu ārstēšanas perioda, salīdzinot ar standarta terapiju (krioterapiju) [ 76 ]. Turklāt ir ziņots par BE un krioterapijas kombinācijas sinerģisku efektu bez novērojamām nevēlamām sekām [ 75 ]. Turklāt BE bāzes oleogēls samazināja epidermas displāzijas pakāpi un diskeratožu skaitu ārstētiem pacientiem prospektīvā, randomizētā un salīdzinošā klīniskā 2.a fāzes pētījumā. Tika pamanīta arī lieliska ādas tolerance pret oleogēlu, kas sagatavots no standartizēta triterpēna sausa bērza mizas ekstrakta [ 76 ]. Šī iemesla dēļ ārstēšana ar bērza mizas ziedi vai oleogēlu uz BE bāzes tiek uzskatīta par jaunu aktuālu alternatīvu pašreizējai AK terapijai un daudzsološu ķīmijpreventīvu līdzekli, jo īpaši tāpēc, ka AK progresēšanas risks līdz invazīva tipa plakanšunu karcinomai ir novērtēts kā augsts[ 79 ].

Dzīvnieku modeļos un izmēģinājuma pētījumos ar BE, BE bāzes oleogēlu vai triterpēna bērza mizas ekstraktu nopietnas nelabvēlīgas ietekmes netika novērotas. BE, tāpat kā citi pentacikliskie triterpēni, arī nav uzrādījuši toksicitāti. Ikdienas BE ievadišana (devas 540 mg/kg ķermeņa svara ip žurkām un 300 mg/kg sc suņiem) izraisīja ļoti zemu toksicitāti, ja tāda bija [ 42 ]. Tādējādi šķiet, ka triterpēna bērza mizas ekstrakts un tā reprezentatīvais savienojums BE ir droši lietojami *in vivo* .

## 6. Nobeiguma piezīmes

---

Arvien vairāk pētījumu apstiprina BE antineoplastisko aktivitāti. Bērza tāss ekstrakta bioloģiskās un farmakoloģiskās efektivitātes ierobežojums ir tā sliktā šķidība. Risinājums varētu būt kompleksa veidošana ar hidrofiliem nesējiem. Patiešām, BE šķidību ūdenī var ievērojami uzlabot, izmantojot ļoti hidrofilo pussintētisko  $\beta$ - ciklodekstrīnu [ 80 ] un  $\gamma$  - ciklodekstrīna atvasinājumus [ 39 ] kā nesējus, kam ir uzlabots BE antiprolieratīvais potenciāls attiecībā uz vēža šunu līnijām [ 80 ], un iekļaušana nanoemulsijā. [ 46 ], kas var palielināt tā biopieejamību un attiecīgi uzlabot tā aktivitāti *in vitro* un *in vivo*. Ķīmiski sintezēti ciklodekstrīna atvasinājumi piedāvā iespēju sagatavot ļoti stabilus kompleksus gan ar BE, gan citiem terpēniem, piemēram, BA [ 81 ], un, iespējams, drīzumā tie tiks iesniegti klīniskiem pētījumiem. Tāpat holesterīnu saturošu BE-liposomu pielietošanu var uzskatīt par daudzsološu metodi, lai atvieglotu BE lietošanu pretvēža terapijas kontekstā [ 54 ].

Tā kā BE ir daudzmērķu aktivitāte pret vēža šūnām, to var lietot kombinācijā ar plaši lietotām ķīmijterapijas zālēm, jo to sinerģiskā iedarbība var palīdzēt iznīcināt vēža šūnas, tostarp pret zālēm rezistentās šūnas [ 36 ]. Vēl viena jauna pieeja BE pielietošanai vēža terapijā var būt tā ķīmiskā modificēšana ar dažādiem ligandiem, kas ļauj iegūt pastiprinātu citotoksicitāti pret audzēja šūnām, labāku šķidību un biopieejamību nekā sākotnējam savienojumam [ 33 ]. Tāpēc BE ir mēģināts izmantot kā prekursoru jaunu BE atvasinājumu sintēzē ar uzlabotām pretvēža un farmakokinētiskām īpašībām.

Daudzi no tāss ekstrakta molekulārajiem darbības mehānismiem joprojām ir nenotverami, kas ierobežo mūsu izpratni par šo potenciāli labvēlīgo dabisko savienojumu grupu.

## References

---

1. Ferlay J., Shin H.-R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*. 2010;127(12):2893–2917. doi: 10.1002/ijc.25516. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
2. Jemal A., Center M. M., DeSantis C., Ward E. M. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2010;19(8):1893–1907. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0437. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
3. Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J., Ward E., Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61(2):69–90. doi: 10.3322/caac.20107. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
4. Joseph B., Marchetti P., Formstecher P., Kroemer G., Lewensohn R., Zhivotovsky B. Mitochondrial dysfunction is an essential step for killing of non-small cell lung carcinomas resistant to conventional treatment. *Oncogene*. 2002;21(1):65–77. doi: 10.1038/sj.onc.1205018. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
5. Newman D. J., Cragg G. M., Snader K. M. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*. 2000;17(3):215–234. doi: 10.1039/a902202c. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
6. McChesney J. D., Venkataraman S. K., Henri J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry*. 2007;68(14):2015–2022. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.04.032. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
7. Newman D. J., Cragg G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*. 2007;70(3):461–477. doi: 10.1021/np068054v. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
8. Oberlies N. H., Kroll D. J. Camptothecin and taxol : historic achievements in natural products research. *Journal of Natural Products*. 2004;67(2):129–135. doi: 10.1021/np030498t. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
9. van der Heijden R., Jacobs D. I., Snoeijer W., Hallard D., Verpoorte R. The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Current Medicinal Chemistry*. 2004;11(5):607–628. doi: 10.2174/0929867043455846. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
10. Bouvier F., Rahier A., Camara B. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in Lipid Research*. 2005;44(6):357–429. doi: 10.1016/j.plipres.2005.09.003. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
11. Alakurtti S., Mäkelä T., Koskimies S., Yli-Kauhaluoma J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006;29(1):1–13. doi: 10.1016/j.ejps.2006.04.006. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
12. Laszczyk M. N. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Medica*. 2009;75(15):1549–1560. doi: 10.1055/s-0029-1186102. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
13. Drag-Zalesinska M., Kulbacka J., Saczko J., et al. Esters of betulin and betulinic acid with amino acids have improved water solubility and are selectively cytotoxic toward cancer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2009;19(16):4814–4817. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.06.046. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
14. Patočka J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *Journal of Applied Biomedicine*. 2012;10(3):7–12. [\[Google Scholar\]](#)
15. Ekman R. The submarin monomers and triterpenoids from the outer bark of betula verrucosa EHRH. *Holzforschung*. 1983;37(4):205–211. doi: 10.1515/hfsg.1983.37.4.205. [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
16. Šoica C. M., Dehelean C. A., Peev C., et al. Physico-chemical comparison of betulinic acid, betulin and birch bark extract and in vitro investigation of their cytotoxic effects towards skin epidermoid carcinoma (A431), breast carcinoma (MCF7) and cervix adenocarcinoma (HeLa) cell lines. *Natural Product Research*. 2012;26(10):968–974. doi: 10.1080/14786419.2010.545352. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
17. Diouf P. N., Stevanovic T., Boutin Y. The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts. *Industrial Crops and Products*. 2009;30(2):297–303. doi: 10.1016/j.indcrop.2009.05.008. [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
18. Gao H., Wu L., Kuroyanagi M., et al. Antitumor-promoting constituents from Chaenomeles sinensis KOEHN and their activities in JB6 mouse epidermal cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2003;51(11):1318–1321. doi: 10.1248/cpb.51.1318. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
19. Hwang B. Y., Chai H.-B., Kardono L. B. S., et al. Cytotoxic triterpenes from the twigs of *Celtis philippinensis*. *Phytochemistry*. 2003;62(2):197–201. doi: 10.1016/S0031-9422(02)00520-4. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
20. Liu M., Yeng S., Jin L., Hu D., Wu Z., Yang S. Chemical constituents of the ethyl acetate extract of belamcanda chinensis (L.) DC roots and their antitumor activities. *Molecules*. 2012;17(5):6156–6169. doi: 10.3390/molecules17056156. [\[PMC free article\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
21. Prakash Chaturvedula V. S., Schilling J. K., Johnson R. K., Kingston D. G. I. New cytotoxic lupane triterpenoids from the twigs of *Coussarea paniculata*. *Journal of Natural Products*. 2003;66(3):419–422. doi: 10.1021/np0204848. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

22. Yang S., Liu M., Liang N., Zhao Q., Zhang Y., Xue W. Discovery and antitumor activities of constituents from *Cyrtomium fortunei* (J.) Smith rhizomes. *Chemistry Central Journal*. 2013;7(1, article 24) doi: 10.1186/1752-153X-7-24. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
23. Rzeski W., Stepulak A., Szymański M., et al. Betulin elicits anti-cancer effects in tumour primary cultures and cell lines in vitro. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2009;105(6):425–432. doi: 10.1111/j.1742-7843.2009.00471.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
24. Wang D.-Y., Liu J., Yin M.-Z., et al. Betulin induces apoptosis of HeLa cell lines in vitro and its possible mechanism. *Tumor*. 2012;32(4):234–238. doi: 10.3781/j.issn.1109-0721.2012.04.002. [CrossRef] [Google Scholar]
25. Hata K., Hori K., Ogasawara H., Takahashi S. Anti-leukemia activities of Lup-28-al-20(29)-en-3-one, a lupane triterpene. *Toxicology Letters*. 2003;143(1):1–7. doi: 10.1016/S0378-4274(03)00092-4. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
26. Li Y., He K., Huang Y., et al. Betulin induces mitochondrial cytochrome c release associated apoptosis in human cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*. 2010;49(7):630–640. doi: 10.1002/mc.20638. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
27. Gauthier C., Legault J., Lebrun M., Dufour P., Pichette A. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2006;14(19):6713–6725. doi: 10.1016/j.bmc.2006.05.075. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
28. Gauthier C., Legault J., Lavoie S., Rondeau S., Tremblay S., Pichette A. Synthesis and cytotoxicity of bidesmosidic betulin and betulinic acid saponins. *Journal of Natural Products*. 2009;72(1):72–81. doi: 10.1021/np800579x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
29. Jae S. P., Si H. R., Dae K. K., et al. Anti-cancer effect of betulin on a human lung cancer cell line: a pharmacoproteomic approach using 2 D SDS PAGE coupled with nano-HPLC tandem mass spectrometry. *Planta Medica*. 2009;75(2):127–131. doi: 10.1055/s-0028-1088366. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
30. Pacifico S., Gallicchio M., Fiorentino A., Fischer A., Meyer U., Stintzing F. C. Antioxidant properties and cytotoxic effects on human cancer cell lines of aqueous fermented and lipophilic quince (*Cydonia oblonga* Mill.) preparations. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(11):4130–4135. doi: 10.1016/j.fct.2012.07.061. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
31. Mutai C., Abatis D., Vagias C., Moreau D., Roussakis C., Rouassis V. Cytotoxic lupane-type triterpenoids from *Acacia mellifera*. *Phytochemistry*. 2004;65(8):1159–1164. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.03.002. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
32. Dehelean C. A., Feflea S., Molnár J., Zupko I., Soica C. Betulin as an antitumor agent tested in vitro on A431, HeLa and MCF7, and as an angiogenic inhibitor in vivo in the CAM assay. *Natural Product Communications*. 2012;7(8):981–985. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
33. Boryczka S., Bebenek E., Wietrzyk J., et al. Synthesis, structure and cytotoxic activity of new acetylenic derivatives of betulin. *Molecules*. 2013;18(4):4526–4543. doi: 10.3390/molecules18044526. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
34. Amico V., Barresi V., Condorelli D., Spatafora C., Tringali C. Antiproliferative terpenoids from almond hulls (*Prunus dulcis*): identification and structure-activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(3):810–814. doi: 10.1021/jf052812q. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
35. Sarek J., Kvasnica M., Urban M., Klinot J., Hajduch M. Correlation of cytotoxic activity of betulinines and their hydroxy analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2005;15(19):4196–4200. doi: 10.1016/j.bmcl.2005.06.087. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
36. Drag M., Surowiak P., Małgorzata D.-Z., Dietel M., Lage H., Oleksyszyn J. Comparision of the cytotoxic effects of birch bark extract, betulin and betulinic acid towards human gastric carcinoma and pancreatic carcinoma drug-sensitive and drug-resistant cell lines. *Molecules*. 2009;14(4):1639–1651. doi: 10.3390/molecules14041639. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
37. Hata K., Hori K., Takahashi S. Differentiation- and apoptosis-inducing activities by pentacyclic triterpenes on a mouse melanoma cell line. *Journal of Natural Products*. 2002;65(5):645–648. doi: 10.1021/np0104673. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
38. Kim D. S. H. L., Pezzuto J. M., Pisha E. Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1998;8(13):1707–1712. doi: 10.1016/S0960-894X(98)00295-9. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
39. Šoica C., Dehelean C., Danciu C., et al. Betulin complex in  $\gamma$ -cyclodextrin derivatives: properties and antineoplastic activities in in vitro and in vivo tumor models. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(11):14992–15011. doi: 10.3390/ijms131114992. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
40. Urban M., Sarek J., Kvasnica M., Tislerova I., Hajduch M. triterpenoid pyrazines and benzopyrazines with cytotoxic activity. *Journal of Natural Products*. 2007;70(4):526–532. doi: 10.1021/np060436d. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
41. Urban M., Vlk M., Dzubak P., Hajduch M., Sarek J. Cytotoxic heterocyclic triterpenoids derived from betulin and betulinic acid. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2012;20(11):3666–3674. doi: 10.1016/j.bmc.2012.03.066. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
42. Jäger S., Laszczyk M. N., Scheffler A. A preliminary pharmacokinetic study of betulin, the main pentacyclic triterpene from extract of outer bark of birch (*Betulae alba cortex*) *Molecules*. 2008;13(12):3224–3235. doi: 10.3390/molecules13123224. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
43. Dehelean C. A., Šoica C., Ledeti I., et al. Study of the betulin enriched birch bark extracts effects on human carcinoma cells and ear inflammation. *Chemistry Central Journal*. 2012;6(1, article 137) doi: 10.1186/1752-153X-6-137. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
44. Laszczyk M., Jäger S., Simon-Haarhaus B., Scheffler A., Schempp C. M. Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from the outer bark of birch (*Betulae cortex*) *Planta Medica*. 2006;72(15):1389–1395. doi: 10.1055/s-2006-951723. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

45. Krasutsky P. A. Birch bark research and development. *Natural Product Reports*. 2006;23(6):919–942. doi: 10.1039/b606816b. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
46. Dehelean C. A., Feflea S., Gheorgheosu D., et al. Anti-angiogenic and anti-cancer evaluation of betulin nanoemulsion in chicken chorioallantoic membrane and skin carcinoma in Balb/c mice. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2013;9(4):577–589. doi: 10.1166/jbn.2013.1563. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
47. Brown M., Attardi L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5(3):231–237. doi: 10.1038/nrc1570. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
48. Fulda S., Debatin K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006;25(34):4798–4811. doi: 10.1038/sj.onc.1209608. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
49. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 2007;35(4):495–516. doi: 10.1080/01926230701320337. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
50. Del Poeta G., Bruno A., Del Principe M. I., et al. Dereulation of the mitochondrial apoptotic machinery and development of molecular targeted drugs in acute myeloid leukemia. *Current Cancer Drug Targets*. 2008;8(3):207–222. doi: 10.2174/156800908784293640. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
51. Plati J., Bucur O., Khosravi-Far R. Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2008;104(4):1124–1149. doi: 10.1002/jcb.21707. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
52. Lavrik I. N. Regulation of death receptor-induced apoptosis induced via CD95/FAS and other death receptors. *Molekuliarnaia Biologija*. 2011;45(1):173–179. [PubMed] [Google Scholar]
53. Green D. R., Knight R. A., Melino G., Finazzi-Agro A., Orrenius S. Ten years of publication in cell death. *Cell Death and Differentiation*. 2004;11(1):2–3. doi: 10.1038/sj.cdd.4401355. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
54. Mullauer F. B., Kessler J. H., Medema J. P. Betulin is a potent anti-tumor agent that is enhanced-by cholesterol. *PLoS ONE*. 2009;4(4, article e1) doi: 10.1371/journal.pone.0005361.e5361 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
55. Sherr C. J. The pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Research*. 2000;60(14):3689–3695. [PubMed] [Google Scholar]
56. Schwartz G. K., Shah M. A. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(36):9408–9421. doi: 10.1200/JCO.2005.01.5594. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
57. Harada H., Yamashita U., Kurihara H., Fukushima E., Kawabata J., Kamei Y. Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. *Anticancer Research*. 2002;22(5):2587–2590. [PubMed] [Google Scholar]
58. Cheng Y.-L., Chang W.-L., Lee S.-C., et al. Acetone extract of Angelica sinensis inhibits proliferation of human cancer cells via inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Life Sciences*. 2004;75(13):1579–1594. doi: 10.1016/j.lfs.2004.03.009. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
59. Sun J., Hai Liu R. Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Letters*. 2006;241(1):124–134. doi: 10.1016/j.canlet.2005.10.027. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
60. Hu X., Zhang X., Qiu S., Yu D., Lin S. Salidroside induces cell-cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;398(1):62–67. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.033. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
61. Oh S. H., Choi J. E., Lim S. C. Protection of betulin against cadmium-induced apoptosis in hepatoma cells. *Toxicology*. 2006;220(1):1–12. doi: 10.1016/j.tox.2005.08.025. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
62. Wada S.-I., Iida A., Tanaka R. Screening of triterpenoids isolated from *Phyllanthus flexuosus* for DNA topoisomerase inhibitory activity. *Journal of Natural Products*. 2001;64(12):1545–1547. doi: 10.1021/np010176u. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
63. Simizu S., Takada M., Umezawa K., Imoto M. Requirement of caspase-3-(like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(41):26900–26907. doi: 10.1074/jbc.273.41.26900. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
64. Wood D. E., Newcomb E. W. Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(12):8309–8315. doi: 10.1074/jbc.274.12.8309. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
65. Wang B. H., Polya G. M. Selective inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by amphiphilic triterpenoids and related compounds. *Phytochemistry*. 1996;41(1):55–63. doi: 10.1016/0031-9422(95)00583-8. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
66. Tokunaga E., Oki E., Egashira A., et al. Dereulation of the akt pathway in human cancer. *Current Cancer Drug Targets*. 2008;8(1):27–36. doi: 10.2174/156800908783497140. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
67. Roberts P. J., Der C. J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007;26(22):3291–3310. doi: 10.1038/sj.onc.1210422. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
68. Muceniece R., Saleniece K., Riekstina U., Krigere L., Tirzitis G., Ancans J. Betulin binds to melanocortin receptors and antagonizes  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone induced cAMP generation in mouse melanoma cells. *Cell Biochemistry and Function*. 2007;25(5):591–596. doi: 10.1002/cbf.1427. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
69. Xia Y., Muceniece R., Wikberg J. E. S. Immunological localisation of melanocortin 1 receptor on the cell surface of WM266-4 human melanoma cells. *Cancer Letters*. 1996;98(2):157–162. doi: 10.1016/0304-3835(95)04015-3. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

70. Chhajlani V. Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 1996;38(1):73–80. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

71. Wikberg J. E. S., Muceniece R., Mandrika I., et al. New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacological Research*. 2000;42(5):393–420. doi: 10.1006/phrs.2000.0725. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

72. Catania A., Gatti S., Colombo G., Lipton J. M. Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacological Reviews*. 2004;56(1):1–29. doi: 10.1124/pr.56.1.1. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

73. Ciurlea S. A., Tiulea C., Csanyi E., et al. A pharmacotoxicological evaluation of a betulin topical formulation tested on C57BL/6J mouse experimental nevi and skin lesions. *Studia Universitatis Vasile Goldis Arad, Seria Stiintele Vietii*. 2010;20(4):5–9. [\[Google Scholar\]](#)

74. Zhanataev A. K., Presnova G. A., Chistyakov A. N., Durnev A. D. Effect of Betula bark extract on spontaneous and induced mutagenesis in mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2004;138(5):475–478. doi: 10.1007/s10517-005-0074-z. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

75. Huyke C., Laszczyk M., Scheffler A., Ernst R., Schempp C. M. Treatment of actinic keratoses with birch bark extract: a pilot study. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2006;4(2):132–136. doi: 10.1111/j.1610-0387.2006.05906.x. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

76. Huyke C., Reuter J., Rödig M., et al. Treatment of actinic keratoses with a novel betulin-based oleogel. A prospective, randomized, comparative pilot study. *Journal of the German Society of Dermatology*. 2009;7(2):128–134. doi: 10.1111/j.1610-0387.2008.06865.x. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

77. Fu W., Cocherell C. J. The actinic (solar) keratosis: a 21st-century perspective. *Archives of Dermatology*. 2003;139(1):66–70. doi: 10.1001/archderm.139.1.66. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

78. Ceilley R. I., Jorizzo J. L. Current issues in the management of actinic keratosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2013;68(1, supplement 1):S28–S38. doi: 10.1016/j.jaad.2012.09.051. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

79. Glogau R. G. The risk of progression to invasive disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2000;42(1, part 2):S23–S24. doi: 10.1067/mjd.2000.103339. [\[CrossRef\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

80. Šoica C. M., Peev C. I., Ciurlea S., Ambrus R., Dehelean C. Physico-chemical and toxicological evaluations of betulin and betulinic acid interactions with hydrophilic cyclodextrins. *Farmacia*. 2010;58(5):611–619. [\[Google Scholar\]](#)

81. Wang H. M., Šoica C. M., Wenz G. A comparison investigation on the solubilization of betulin and betulinic acid in cyclodextrin derivatives. *Natural Product Communications*. 2012;7(3):289–291. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)