

JACEK ACHREM-ACHREMOWICZ<sup>1</sup>, ZBIGNIEW JANECKO<sup>1</sup>

## BETULINA – PREKURSOR NOWYCH ŚRODKÓW LECZNICZYCH

*Betulin – precursor of the drugs with a new mode of action. Betulin is a pentacyclic triterpenoid that is widespread in nature, especially in the outer bark of white birches. The compound and its derivatives show several biological activities. The most promising are: highly selective cytotoxicity against human melanoma, glioma and neuroblastoma cell lines, antiviral (tested on HIV), antiinflammatory and antiallergic properties. The review of the current literature on the subject is presented with the respect of the syntheses of some important betulin derivatives that are known for a time.*

Triterpeny są grupą substancji szeroko rozpowszechnionych w świecie roślinnym. Zaliczane są do tzw. wtórnych produktów przemiany materii, chociaż rola jaką spełniają nie jest do końca wyjaśniona. W stanie naturalnym występuje kilka tysięcy triterpenów, które podzielono na 37 typów strukturalnych (1).

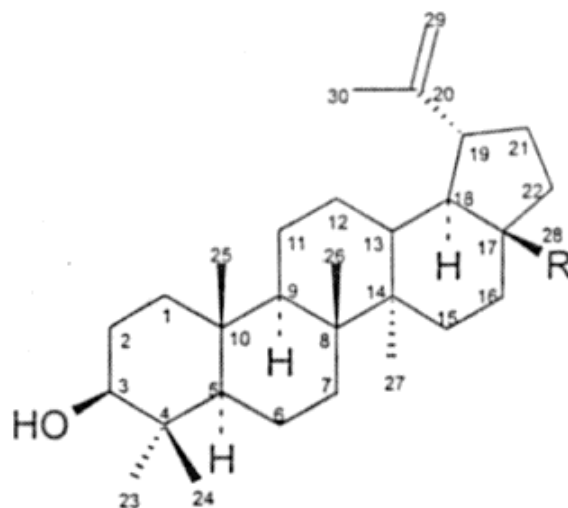
Biogeneza tych związków jest procesem dość złożonym. Przebiega poprzez jednoetapową cyklizację długiego łańcucha 2,3-epoksykwalenu (tzw. reakcja domino) do kationu damarenylu lub protosterylu, które są następnie przekształcane przez odpowiednie enzymy do określonych związków triterpenowych lub steroidowych (2,3).

Jednym z najbardziej rozpowszechnionych triterpenów jest betulina. Jest to triterpen pentacykliczny typu lupanu. Zbudowana jest z czterech pierścieni sześciocłonowych i jednego pięciocłonowego (rycina 1a).

Wszystkie pierścienie ułożone są względem siebie w konfiguracji trans. Taka budowa przypomina steroidy, struktury pełniące niezwykle ważne dla organizmów funkcje regulatorowe. Z aktywnych ugrupowań chemicznych węglowodór ten posiada dwie grupy hydroksylowe przy C3 i C28, oraz grupę izopropenyłową przy C19. Różnice pomiędzy lupeolem, betulina i kwasem betulinowym występują wyłącznie przy węglu C17 (lupeol ma grupę metylową,

betulina – hydroksymetylową, kwas betulinowy – karboksylową).

Betulina jest znana od ponad 200 lat. Związek ten wyizolował w 1788 roku *Lowitz* i jest to zapewne jedna z pierwszych substancji naturalnych uzyskanych z roślin (4). Występuje w ponad dwustu gatunkach roślin. Najwięcej, bo w ilości do 25% w zewnętrznej warstwie kory białych gatunków brzoź, np. rosnących



Rycina 1.

- a) Betulina R=CH<sub>2</sub>OH
- b) lupeol R=CH<sub>3</sub>
- c) kwas betulinowy R=COOH

<sup>1</sup> z Katedry i Zakładu Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego CM UJ w Krakowie, kierownik – dr hab. Z. Janeczko.

pospolicie w Polsce *Betula verrucosa* czy *B. pubescens*.

Betulina i jej pochodne wykazują wiele interesujących właściwości farmakologicznych. Z ważniejszych wymienić można: hamujący wpływ na rozwój niektórych linii nowotworowych (5), bakterii (6), wirusów (7), działanie przeciwzapalne (8,9), przeciwalergiczne (10), przeciwbólowe (11), hepatoprotective (12) i inne.

Renesans zainteresowania triterpenami typu lupanu rozpoczęło w 1995 r. odkrycie, że kwas betulinowy jest czynnikiem indukującym proces apoptozy (tj. samobójczej śmierci) komórek czerniaka ludzkiego linii Mel-1 i Mel-2, nie działającym toksycznie na komórki zdrowe. Dodatkowo w badaniach na myszach stwierdzono, że nie wykazuje on toksyczności nawet w dawce 500 mg/kg m.c. przy wielokrotnym podawaniu dootrzewnym (5). Należy tu nadmienić, że kwas betulinowy może być łatwo otrzymany w wyniku utleniania betuliny i opracowanych jest kilka modyfikacji tej reakcji (13–15). Sama betulina posiada liczne, dotychczas nie poznane, właściwości. Wystarczy wspomnieć jej hamujące działanie na katalityczną, zależną od c-AMP podjednostkę kinazy białkowej PKA wątroby szczurów z  $IC_{50}$  20  $\mu$ M (kwas betulinowy 45  $\mu$ M). Jak wiadomo, kinaza ta fosforyluje wiele kluczowych białek w różnych kaskadach sygnałowych i regulacyjnych (m.in. w powstawaniu niektórych nowotworów). Istnieją doniesienia (niepublikowane), że betulina wspomaga gojenie ran oparzeniowych a także zmniejsza obrzęk po ukąszeniach owadów.

---

#### Właściwości przeciwalergiczne i przeciwzapalne

---

Betulina, kwas betulinowy i lupeol wykazują wyraźne działanie przeciwzapalne i wyizolowano je jako jedne z czynnych związków kilku roślin. Kwas betulinowy, aktywny składnik kłączy wodnej rośliny *Nelumbo nucifera* (*Nymphaeaceae*) wykazuje dużą aktywność przeciwzapalną w obrzęku łapy szczura indukowanym karageniną oraz serotoniną, już w dawce 50 mg/kg m.c. Aktywność ta jest porównywalna z działaniem fenylobutazonu i deksametazonu (16).

Fracja triterpenowa ekstraktu ziela głowienki pospolitej *Prunella vulgaris* (*Lamiaceae*)

posiada właściwości przeciwalergiczne. Zawarte w ekstrakcie triterpeny: kwas betulinowy, ursolowy i jego pochodne, hamują degranulację mastocytów, oraz uwalnianie  $\beta$ -heksozaminidazy i znajdującej się w tych samych ziarnistościach histaminy. Kwas 2  $\alpha$ , 3  $\alpha$ -dihydroksyursolowy ( $IC_{50}$ =57  $\mu$ M) wykazuje aktywność porównywalną z ketotifenem ( $IC_{50}$ =100  $\mu$ M) i azelastyną ( $IC_{50}$ =25  $\mu$ M). Kwas betulinowy ma działanie słabsze, ale istotne statystycznie – wykazuje 30–40% hamowania uwalniania histaminy przy c=100  $\mu$ M (17). Zaobserwowano także hamowanie syntezy tlenku azotu w pobudzanych przez lipopolisacharydy bakteryjne (LPS) modelowych mysich makrofagach RAW 264.7, przy stężeniach od 10 do 30  $\mu$ M (dla porównania  $IC_{50}$  deksametazonu wynosi 0,1  $\mu$ M). Jak wiadomo, zwiększenie produkcji NO odgrywa kluczową rolę w modulowaniu odpowiedzi czynnościowej na stan zapalny (17).

Alkoholowy wyciąg z kory *Crataeva nurvala* Buch.-Ham. (*Capparidaceae*) zawierający: lupeol,  $\alpha$  i  $\beta$  amyrynę, posiada własności przeciwzapalne. Wyizolowany czysty lupeol i jego pochodna – ester z kwasem linolowym, zmniejszają obrzęk łapy szczurów ze sztucznie wywołanym zapaleniem stawów przez czynnik CFA (z *Mycobacterium tuberculosis*). Ester charakteryzuje się silniejszym działaniem – lupeol zmniejsza obrzęk o 39% a jego pochodna o 58%. Ester lupeolu powoduje dodatkowo zmniejszenie śledziony u szczurów z wywołanym stanem zapalnym stawów i wzrost ich masy ciała w porównaniu ze zwierzętami zdrowymi (8).

Inna pochodna lupeolu – ester kwasu eikosa-pentaenowego (EPA) również wykazuje działanie przeciwzapalne w sztucznie pobudzonym artretyzmie. Związany z tym stanem podwyższony poziom glikoprotein osocza jest przez niego normalizowany. Efekt ten jest prawdopodobnie wywołany stabilizującym wpływem tego związku na elastyczność błon lizosomalnych, dzięki czemu nie są uwalniane glikohydrolazy, które niszczą matrycę chrząstkową (8,9).

Ze zmianami reumatoidalnymi związana jest również nasiloną syntezą glikozoaminoglikanów, wpływających na tworzenie nowej substancji podstawowej podczas stanu zapalnego z równoczesnym nasileniem syntezy proteoglikanów i proliferacji komórki. NLPZ poprzez wpływ na cyklazę adenylanową, hamują syntezę glikozoaminoglikanów. Ester lupeolu z kwa-

sem eikozapentaenowym również ma takie działanie (9).

Heksanowy wyciąg z *Himatanthus succuba* podany w dawce 200 mg/kg m.c. *per os*, zawierający m.in. cynamonian lupeolu i  $\alpha$  amyryny, oraz octan lupeolu, zmniejsza obrzęk łapy szczura w teście karageninowym o 54,5% w pierwszej godzinie w stosunku do grupy kontrolnej. Czysty octan lupeolu ma działanie silniejsze – w dawce o połowę mniejszej hamuje obrzęk o 48,2% (11).

### **Właściwości przeciwnowotworowe**

Liczne badania *in vitro* wykazały, że większa część typów indukowanej lekami cytotoxyczności w liniach nowotworowych, jest związana z indukcją apoptozy (20). Uruchomienie programu śmierci obejmuje równoczesną lub następczą aktywację systemów receptora śmierci CD95, zaburzenie potencjału mitochondrialnego i proteolityczne przekształcanie kaspaz, molekularnych efektorów śmierci w apoptozie (19,21).

Kwas betulinowy (KB) wywołuje apoptozę komórek wielu linii ludzkich nowotworów jak np. czerniaka Mel-1, Mel-2 (5), a również słabo podlegających większości czynników proapoptotycznych, złośliwych, chemoopornych komórek nerwiaka niedojrzałego, rdzenia czy glejaka (18). Działanie to jest wyraźne przy bardzo małych stężeniach związku. Przykładowo ED<sub>50</sub> hamowania aktywności ludzkiego czerniaka Mel-2 wynosi 1,2  $\mu$ g/mL, tj. występuje przy stężeniu 2,6 pM (pikomola!).

Mechanizm działania kwasu betulinowego jako czynnika wywołującego apoptozę, jest nietypowy dla środków cytotoxycznych. Indukuje on ten proces z pominięciem kaskad przekaznikowych uruchamiających program śmierci komórki, jak oddziaływanie receptor/ligand śmierci CD95/CD95-L (wywoływane m.in. przez doksorubicynę, cisplatynę czy VP-16) (19). Wyzwolenie programu samobójczej śmierci komórek następuje również bez udziału białka p53, które jest odpowiedzialne za uruchamianie apoptozy w wielu różnych liniach komórkowych. Komórki zmutowane, jak i typu dzikiego z zachowaną aktywnością genu supresji nowotworów p53, kodującego białko p53, ulegają temu procesowi w jednakowym stopniu. Równocześnie niektóre linie komórkowe

traktowane kwasem betulinowym wykazują zwiększoną ekspresję p21, białka, którego podwyższona zawartość związana jest z zatrzymaniem cyklu komórkowego. Jednak nie obserwowano hamowania cyklu komórkowego komórek linii T98G i LN-229 traktowanych kwasem betulinowym w stężeniu 50  $\mu$ M ani w fazie G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>, ani w G<sub>2</sub>-M (20).

Organellami docelowymi działania kwasu betulinowego są mitochondria. Powoduje on zmianę przepuszczalności kompleksu białkowego błon mitochondrialnych, odpowiadającego za utrzymanie odpowiedniej różnicy potencjałów; dodatek kwasu bongkrekinowego hamującego spadek potencjału międzybłonowego zapobiega apoptozie. Zaburzenie przepuszczalności powoduje następnie uwolnienie do cytozolu białek apoptogennych z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów: cytochromu c i czynnika indukcji apoptozy (ang.: AIF), które powodują aktywację kaspaz. Cytochrom c rozszczepia (uaktywnia) kaspazę-3, a AIF zarówno kaspazę-3 jak i kaspazę-8. Rozszczepienie nieczynnych prekursorów wywołuje nieodwracalny już etap programu śmierci komórki, objawiający się uaktywnieniem endonukleaz powodujących fragmentację DNA jądrowego, obkurczenie komórki i jej fagocytozę przez komórki układu odpornościowego (20,21).

Izolowane mitochondria traktowane kwasem betulinowym powodują w ekstrakcie cytoplazmatycznym uwolnienie kaspazy-8, kaspazy-3 i dalej endogennych nukleaz, jak również apoptozę całych komórek nowotworowych, np. ludzkiego nerwiaka niedojrzałego SHEP. Tymczasem ekstrakt cytoplazmatyczny pozbawiony mitochondriów traktowany kwasem betulinowym nie ma własności apoptogennych (21).

Przypuszcza się, że zaburzenie potencjału mitochondrialnego spowodowane jest niezależnym od p53 wpływem modulującym na białka z rodziny BCL/BAX, będących endogennymi inhibitorami zmian przepuszczalności błon mitochondrialnych i kontrolujących aktywację kaspaz (22). Pod wpływem kwasu betulinowego poziom BCL/BAX, jest podwyższony, jednak zostaje pomiędzy nimi zachowana równowaga; zwiększona ilość proapoptotycznego białka BAX rekompensowana jest podwyższoną zawartością antyapoptotycznego BCL-2, które tworząc heterodimer z białkiem BAX, unieczynnia je i przez to uniemożliwia uruchomienie programu śmierci. Poziom innych białek

kontrolujących uwolnienie cytochromu c, tj.: proapoptotycznego BCL-X<sub>S</sub> i antagonistycznego BCL-X<sub>L</sub>, jest niezmienny. Komórki z nadekspresją genów BCL-2 lub BCL-X<sub>L</sub> nie podlegają apoptozie indukowanej przez kwas betulinowy, co zdaje się potwierdzać hipotezę, że triterpen ten wpływa na białka kontrolujące potencjał mitochondrialny (20).

W komórkach glejaków podlegających apoptozie indukowanej kwasem betulinowym zaobserwowano zwiększenie poziomu reaktywnych form tlenu, uzależnione od syntezy bliżej nieznanego białka, którego m-RNA istnieje wcześniej w komórce, niezależnie od podania triterpenu. Obecność tego kwasu nukleinowego przed traktowaniem komórek KB potwierdzono w eksperymentach cykloheksimid/aktynomycyna D.

Obecność czynnych form tlenu (ang. ROS) jest konieczna do aktywacji efektorów śmierci. Zahamowanie wytwarzania ROS przez przeciwutleniacze jak N-tercbutylo- $\alpha$ -fenylnitron (PBN) lub N-acetylocysteinę podane przed lub równocześnie z podaniem KB, zatrzymuje apoptozę. Implikacje tego stanu rzeczy mogą być dla organizmu bardzo groźne.

W związku z bardzo obiecującymi wynikami testów właściwości przeciwnowotworowych kwasu betulinowego, podjęto liczne modyfikacje strukturalne, które pozwoliłyby określić zależność aktywności od budowy, jak również otrzymać nowe aktywniejsze związki o lepszej rozpuszczalności w wodzie. Stwierdzono np., że obecność lub brak wiązania podwójnego w grupie izopropylowej nie ma najprawdopodobniej znaczenia dla aktywności, natomiast rodzaj grupy chemicznej przy C-3 odgrywa istotną rolę. Utlenienie grupy hydroksylowej przy C-3 do ketonowej nasila nieco te właściwości, podczas gdy jej zamiana na aminową nie ma praktycznie żadnego wpływu. Estryfikacja grupy hydroksylowej C-3 dużym podstawnikiem, jak kwas benzoowy, znosi całkowicie aktywność (14).

Szereg amidów kwasu betulinowego z aminokwasami i ich estrami metylowymi ma taką samą lub zwiększoną aktywność, przy czym rozpuszczalność w wodzie tych związków jest lepsza niż wyjściowej cząsteczki. Np.: amid kwasu betulinowego z alaniną i jej estrem metylowym oraz amid z waliną mają rozpuszczalności kolejno o 50, 30 i 5 razy większe niż sam kwas betulinowy (23).

---

## Właściwości antywirusowe

---

W poszukiwaniu roślinnych środków leczniczych przeciw wirusowi HIV, w 1994 r. odkryto, że metanolowy ekstrakt z liści *Syzygium claviflorum* (Roxb.) WALL (*Myrtaceae*) wykazuje takie działanie. Aktywnymi składnikami okazały się: kwas betulinowy i jego nor-pochodna (bez jednego atomu węgla) – kwas platanowy (24). W wyniku poszukiwań półsyntetycznych pochodnych tych aktywnych związków, które miałyby jeszcze silniejsze właściwości przeciwwirusowe odkryto, że kwas dihydrobetulinowy jest nieco aktywniejszy, natomiast pochodna 3-estrowa: kwas 3-O-(3',3'-dimetylobursztyniano)-betulinowy i jego dihydropochodna posiadają nadzwyczaj silne właściwości hamowania wirusa HIV w ostro zainfekowanych limfocytach H9. EC<sub>50</sub> tych związków jest mniejsze od 35 nM, a indeksy terapeutyczne (TI) wynoszą >20000 i >14000; dla porównania EC<sub>50</sub> AZT wynosi 12500. Odpowiednie 2',2'-dimetylo-izomery tych triterpenów (kwas dimetylobursztynowy przyłączony drugim końcem) mają stosunkowo małą aktywność, porównywalną do niepodstawionego kwasu betulinowego (25). Także analogi azotowe tych nadzwyczaj aktywnych pochodnych, kwas 3 $\alpha$ - i 3 $\beta$ -(3',3'-dimetylobursztyniano)amido-3-deoksybetulinowy nie wykazują hamującego działania (26).

W toku dalszych badań stwierdzono, że diester betuliny z kwasem 3,3-dimetyloglutarynowym posiada największą zdolność hamowania replikacji wirusa HIV (większą niż najaktywniejsza pochodna kwasu betulinowego) – TI 21515 i EC<sub>50</sub>=0,66 nM. Co ciekawe podobny diester – z kwasem dimetylobursztynowym ma znikomą aktywność (7).

---

## Właściwości hepatoprotective

---

Betulina działa hepatoprotective, zmniejszając cytotoksyczność chlorku kadmu (II) dla linii hepatocytów ludzkich HepG2. Już przy stężeniu 0,1 mg/mL zniesione jest całkowicie działanie cytotoksyczne chlorku kadmu (II), który przy podanym stężeniu 120 mM, bez uprzedniego traktowania komórek betuliną, powoduje ich 80% umieralność. Jednak najlepszy efekt hepatoprotective uzyskuje się podając betulinę

na 24 h przed intoksykacją związkami kadmu (II), co sugeruje, że działanie ochronne powodowane jest prawdopodobnie przez bliżej niezidentyfikowane białko(a), którego(ych) synteza wywołana jest przez betulinę. Nie jest to jednak metalotioneina – białko którego syntezę indukują w komórce niektóre metale ciężkie, jak np. cynk. Wstępna analiza sekwencji wykazała, że jeden z genów, którego ekspresję indukuje betulina jest identyczny z genem ludzkiego mitochondrialnego cytochromu b (27).

---

### Właściwości przeciwkamicze

---

Betulina i lupeol zmniejszają uszkodzenie kanalików nerkowych i obniżają wskaźniki odkładania kryształów w nerkach szczurów z hiperoksalurią wywołaną niedoborem pirydoksyny. W dawce 35 mg/kg m.c./24 h *per os* triterpeny te zmniejszają ryzyko odkładania szczawianu wapnia a zatem powstawania kamicy nerkowej. Efekt wywołany jest poprzez zwiększanie objętości wydalanego moczu (spada przesycenie moczu), jednocześnie zmniejsza się ilość wydalanych szczawianów co może świadczyć o hamowaniu niektórych enzymów syntetyzujących szczawian z kwasu glikolowego podawanego w diecie. Następuje normalizacja stężenia glikozoaminoglikanów i magnezu w moczu, które to czynniki mają działanie ochronne przed wytrącaniem kamieni (szczawian magnezu ma większy iloczyn rozpuszczalności niż szczawian wapnia, a glikozoaminoglikany utrudniają formowanie kryształów), jednocześnie spada stężenie białek w moczu.

Inne wskaźniki podniesione lub obniżone w hiperoksalurii, jak np. poziom enzymów rąbka szczoteczkowego – alkalicznej fosfatazy, dehydrogenazy mleczanowej,  $\gamma$ -transferazy glutaminianowej, poziom enzymów wskazujących na zmiany lizosomalne –  $\beta$ -glukuronidazy i N-acetyloglukozaminidazy, kwaśnej fosfatazy, zmniejszona aktywność fibrynolityczna, ulegają poprawie.

Lupeol, różniący się od betuliny jedynie brakiem grupy hydroksylowej przy C-28 wykazuje wyraźniejszy od niej efekt normalizujący (12).

---

### Podsumowanie

---

Betulina i związki jej pokrewne wykazują liczne wielokierunkowe działania biologiczne.

Właściwości te są wyraźne, to znaczy występują już przy małych stężeniach. Dodatkową cechą tych substancji, wyróżniających je jako nowe potencjalne leki, jest praktycznie brak toksyczności zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* (5,28).

Spośród omawianych właściwości farmakologicznych, najbardziej obiecujące wydaje się działanie przeciwnowotworowe kwasu betulinowego na niektóre chemiooporne nowotwory, jak czerniak i glejaki. Samobójcza śmierć komórek – apoptoza – indukowana jest przez niego tylko w komórkach chorych. Dzięki temu wykluczona może być część niekorzystnych efektów związanych z chemioterapią nowotworów.

Wiadomo dotychczas, że kwas betulinowy uruchamia program śmierci chorych komórek poprzez spowodowanie spadku mitochondrialnego potencjału międzybłonowego, co z kolei wyzwala system trawiących komórkę „od środka” kaspaz. Dokładny mechanizm działania tego triterpenu nie jest jeszcze poznany. Również określenie zależności aktywności od struktury wymaga dalszych, szczegółowych badań.

Betulina i inne wielopierścieniowe węglowodory wykazują pewne podobieństwa strukturalne do steroidów. Istnieje zatem ryzyko wystąpienia niekorzystnych efektów przy dłuższym ich stosowaniu. Brak jednak danych poruszających ten problem.

Istnieje jeszcze wiele niewiadomych dotyczących betuliny. Dostępność jej jest duża – do 25% zewnętrznej warstwy kory białych gatunków brzoź, dzięki czemu ta interesująca struktura farmakoforowa może być łatwo pozyskana i bez większych ograniczeń poddawana rozmaitym przekształceniom chemicznym, lub biotechnologicznym, celem otrzymania nowych środków leczniczych o nowoczesnych mechanizmach działania.

---

### Piśmiennictwo

---

1. Dictionary of Terpenoids. Vol.2, Chapman & Hall 1991. – 2. Abe I., Rohmer M., Prestwich G.D., Chem. Rev. 93, 2189, 1993. – 3. Kushiro T., Shibuya M., Masuda K., Ebizuka Y., Tetrah. Lett.41, 7705, 2000. – 4. Hayek E.W., Jordis U., Moche W., Sauter F., Phytochem. 28, 2239, 1989. – 5. Pisha E., Chai H., Lee I.S., I wsp. Nat. Med. 1, 1046, 1995. – 6. Nick A., Wright A.D., Rali T., Sticher O., Phytochem. 40,

- 1691, 1995. – 7. Sun I.C., Shen J.K., Wang H.K., *i wsp.* Bioorg. Med. Chem. Lett. 8, 1267, 1998. – 8. Geetha T., Varalakshmi P., Fitoter. 69, 13, 1998. – 9. Latha R.M., Lenin M., Rasool M., Varalakshmi P., Prostagl. Leukotr. & Ess. Fatty Acids 64, 81, 2001. – 10. Wang B.H., Polya G.M., Phytochem. 41, 55, 1996.
11. de Miranda A.L.P., Silva J.R.A., Rezende C.M., *i wsp.* Planta Med. 66, 284, 2000. – 12. Vidya L., Varalakshmi P., Fitoter. 71, 535, 2000. – 13. von Ruzicka L., Lambertson A.H., Christie E. W., Helv. Chim. Acta 21, 1706, 1938. – 14. Kim D.S., Pezzuto J.M., Pisha E., Bioorg. Med. Chem. Lett. 8, 1707, 1998. – 15. Kim D.S., Chen Z., Nguyen T., *i wsp.* Synth. Commun., 27: 1607, 1997. – 16. Mukherjee P.K., Saha K., Das J., *i wsp.* Planta Med. 63, 367, 1997. – 17. Ryu S.Y., Oak M.H., Yoon S.K., *i wsp.* Planta Med. 66, 358, 2000. – 18. Fulda S., Jeremias I., Steiner H.H., *i wsp.* Int. J. Cancer. 82, 435, 1999. – 19. Fulda S., Susin S.A., Kroemer G., *i wsp.* Cancer. Res. 58, 4453, 1998.
20. Wick W., Grimmel C., Wagenknecht B., *i wsp.* J.Pharmacol. Exp. Ther. 289, 1306, 1999. – 21. Fulda S., Scaffidi C., Susin S.A., *i wsp.* J.Biol.Chem. 273, 33942, 1998. – 22. Meng R.D., El-Deiry W.S., Exp. Cell Res. 262: 154, 2001. – 23. Jeong H.J., Chai H.B., Park S.Y., Kim-D.S., Bioorg. Med. Chem. Lett. 9, 1201, 1999. – 24. Fujioka T., Kashiwada Y., Kilkuskie R.E., *i wsp.* J. Nat. Prod. 57, 243, 1994. – 25. Kashiwada Y., Hashimoto F., Cosentino L.M., *i wsp.* J. Med. Chem. 39, 1016, 1996. – 26. Kashiwada Y., Chiyo J., Ikeshiro Y., *i wsp.* Chem. Pharm. Bull. 48, 1387, 2000. – 27. Miura N., Matsumoto Y., Miyairi S., *i wsp.* Mol. Pharmacol. 56, 1324, 1999. – 28. Zuco V., Supino R., Righetti S.C., *i wsp.* Canc. Lett. 175, 17, 2002.
-