

IZABELA CHOJNICKA, WIRGINIA JANISZOWSKA

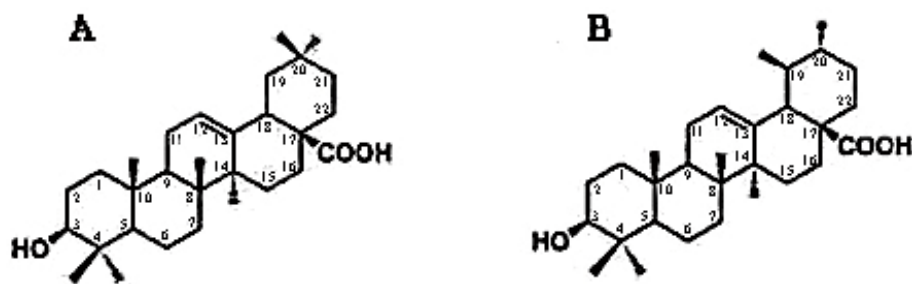
*Zakład Biochemii Roślin
Instytut Biochemii
Uniwersytet Warszawski
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
Email: iza@adr-4.com
wjaniez@biol.uw.edu.pl*

PRZECIWNOWOTWOROWE DZIAŁANIE ROŚLINNYCH TRITERPENOIDÓW: KWASU OLEANOLOWEGO I URSOLOWEGO ORAZ ICH POCHODNYCH

WSTĘP

Leczenie pacjentów z chorobą nowotworową oparte na stosowaniu syntetycznych farmaceutyków prowadzi często do wielu powikłań. Dlatego też, poszukiwane są naturalne substancje, które można by zastosować zarówno w profilaktyce, chemioterapii, jak i znoszeniu efektów działania związków mutagennych. Zauważono, że głównymi komponentami ekstraktów roślinnych, stosowanych od tysiącleci w medycynie naturalnej, są pentacykliczne triterpenoidy, stanowiące najliczniejszą grupę terpenoidów występujących w roślinach dwuliściennych. Nie odgrywają one istotnej roli w metabolizmie podstawowym, lecz pełnią funkcje w procesach przystosowania się roślin do przeżycia w otaczającym środowisku. Wiele z nich stanowi swoistą broń chemiczną, skierowaną przeciwko konkurencyjnym roślinom, patogenom i roślinom (MALEPSZY 2004). Do związków tych

należą m.in. kwas oleanolowy i jego izomer – kwas ursolowy (Ryc. 1). Kwas oleanolowy występuje w postaci wolnej, jednak znacznie częściej w postaci glikozydów, glikozydoestrów i estrów, nazwanych saponinami ze względu na swoją zdolność obniżania napięcia powierzchniowego roztworów wodnych z wytworzeniem piany (KOHLMÜNZER 1998, CHOŁUJ i JANISZOWSKA 2005). Z kolei, kwas ursolowy występuje najczęściej w postaci wolnej, jednak znane są także jego pochodne glikozydowe, glikozydoestrowe oraz estrowe (PEACH i TRACEY 1955). Badania ostatnich lat wykazały, że kwasy oleanolowy i ursolowy, a także wiele ich pochodnych, zapobiegają tworzeniu raka, hamują promocję nowotworu, różnicowanie komórek nowotworowych, angiogenezę oraz wykazują aktywność antymutagenną. Oznacza to, że potencjalnie mogłyby być stosowane jako środki zapobiegają-



Ryc. 1. Budowa kwasu oleanolowego (A) i kwasu ursolowego (B).

ce rozwojowi raka, jak i leki oddziałujące na komórki zezłośliwione na poszczególnych etapach choroby nowotworowej. Dotychczasowe artykuły wymieniały różne saponiny i wolne kwasy triterpenowe wykazujące właściwości przeciwnowotworowe. Niniejsza

praca to próba przeanalizowania na jakim etapie kancerogenezy i w jaki sposób kwas oleanolowy, kwas ursolowy, a także niektóre ich pochodne oddziałują na zmienione komórki.

KANCEROGENEZA

Kancerogeneza to długotrwały, wieloetapowy proces powstawania nowotworu, obejmujący trzy etapy: fazę inicjacji, promocji oraz progresji. Faza inicjacji polega na przekształceniu się w wyniku mutacji zdrowej komórki w komórkę rakową. Zmiana ta ma charakter nieodwracalny, a morfologicznie objawia się hiperplazją, czyli rozrostem tkanki, lub dysplazją, czyli nieprawidłowościami w jej strukturze. Faza promocji polega na niekontrolowanym namnażaniu zmutowanej komórki. Na tym etapie komórki charakteryzuje zwiększona ruchliwość, utrata funkcjonalnej łączności z sąsiednimi komórkami, utrata swoistych funkcji oraz inwazyjność. Ostatni etap rozwoju nowotworu stanowi progresja. W tej fazie wzrost komórek rakowych staje

się niezależny od czynników wzrostowych, hormonów oraz czynników regulatorowych, wysyłanych przez inne komórki, i rozpoczyna się proces angiogenezy, czyli unaczynienia. Zmienione komórki wydzielają autokryne czynniki wzrostowe, intensyfikujące podziały, oraz peptydy, które pobudzają zdrowe komórki do wydzielania czynników wzmagających inwazyjność i zdolność do przemieszczania komórek rakowych. Dochodzi do licznych aberracji DNA, pojawia się aneuploidia, czyli zaburzenie ilości materiału genetycznego. Komórki nowotworowe przenikają do naczyń krwionośnych i limfatycznych, kolonizują nowe tkanki, tworząc przerzuty (READ 1997, LODISH 1999, ALBERTS 2002, GOŁĄB i współaut. 2002, WĘGLEŃSKI 2002).

CHEMOPREWENCJA

Chemoprewencja polega na stosowaniu naturalnych lub syntetycznych substancji chemicznych w celu zapobiegania, zahamowania lub odwrócenia transformacji nowotworowej tkanki. W procesach powstawania nowotworów badany jest udział dwóch grup enzymów: cyklooksygenaz (COX) i lipooksygenaz (LOX), które związane są z generowaniem wolnych rodników. Wolne rodniki, wywołując destrukcję białek oraz inicjując procesy utleniania lipidów, powodują nieodwracalne zmiany w komórkach organizmu, mogące zapoczątkować rozwój nowotworu. Cyklooksygenazy katalizują przemianę kwasu arachidonowego do m.in. prostaglandyn (PG), które są hormonami prozapalnymi, działającymi miejscowo, mogącymi wywołać zezłośliwienie, bowiem hamują reakcje odpornościowe organizmu oraz aktywują namnażanie komórek i angiogenezę. Z kolei, lipooksygenazy katalizują biosyntezę leukotrienów, substancji prozapalnych, uczestniczących w reakcjach nadwrażliwości układu immunologicznego, które wraz z prostaglandynami należą do dużej grupy biologicznie aktywnych, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, zwanych

eikozanoidami (JAŻWA 2005). W organizmie człowieka występują dwie izoformy enzymu COX, posiadające odmienne funkcje biologiczne. Enzym COX-1 bierze udział w utrzymaniu homeostazy, natomiast ekspresja COX-2 występuje w procesach zapalnych, w komórkach transformowanych nowotworowo i w wielu postaciach raka. COX-2 pobudza migrację komórek śródbłonna, angiogenezę, a także zapobiega apoptozie, czyli programowanej śmierci komórki. Wydawało się więc, że regulacja ekspresji genu *cox-2* oraz hamowanie aktywności enzymu COX-2 jest obiecującym krokiem w zapobieganiu i leczeniu nowotworów, dlatego chemoprewencyjne strategie skupiły się na poszukiwaniu silnych inhibitorów tego enzymu (DINKOVA-KOSTOVA i współaut. 2005). Jednakże stosowane do tej pory w leczeniu syntetyczne inhibitory cyklooksygenazy 2 wywołują liczne skutki uboczne (DEGOWSKA i RYDZEWSKA 2005). Stąd poszukiwania naturalnych związków hamujących aktywność COX-2, które mogą być bezpieczniejszymi środkami chemoprewencyjnymi. Wykazano (SUBBARAMAIAH i współaut. 2000), że kwas ursolowy, znany z właściwości prze-

ciwzapałnych, zatrzymywał wywołaną nadekspresją genu *cox-2* angiogenezę i apoptozę w komórkach epitelialnych sutków i jamy ustnej. Kwas ursolowy hamował dwa główne szlaki przekazywania sygnału, tzn. ścieżkę transdukcji sygnału przez cykliczny adenylozomonofosforan (cAMP), jak i fosfolipazę C (PLC), a w efekcie hamował aktywację transkrypcji genu *cox-2*. Potwierdziły to również badania ekstraktu acetonowego uzyskanego z rośliny *Calluna vulgaris*, zawierającego kwas ursolowy, który hamował aktywność produktów enzymów LOX i COX u zróżnicowanych leukocytów HL60 (użytych jako odpowiedników neutrofilów) (SIMON i współaut. 1992). Wykazano także (NAJID i współaut. 1992), że wolny kwas ursolowy blokował metabolizm kwasu arachidonowego już przy stężeniu 1 μM u mysich makrofagów otrzewnowych, ludzkich trombocytów i zróżnicowanych leukocytów HL60. Działanie kwasu ursolowego porównano ze stosowanymi w medycynie inhibitorami LOX i COX, t.j. kwasem nordihydrogwajaretowym (NDGA), 3-amino-

1-(3-trifluorometylofenylo)-2-pyrazoliną-HCl (BW755C) i kwasem kofeinowym. Wykazano, że zarówno u makrofagów, jak i zróżnicowanych leukocytów HL60 jest on słabszym inhibitorem działania LOX i COX niż NDGA i BW755C, ale silniejszym niż kwas kofeinowy. Natomiast, w płytkach krwi, efekt działania kwasu ursolowego był znacznie większy niż NDGA oraz kwasu kofeinowego i porównywalny z działaniem BW755C. Badania te potwierdzają możliwość stosowania kwasu ursolowego w zapobieganiu rozwojowi nowotworów. W chemoprewencji raka niezwykle istotna jest także aktywność antymutagenowa, którą wykazują niektóre pochodne kwasu oleanolowego, jak np. wyekstrahowany z nagietka polnego, *Calendula arvensis*, monoglukozyd, hamujący *in vitro* mutagenne działanie benzopirenu, czy, zawierająca dwie reszty cukrowe, saponina βH występująca w bluszczu, *Hedera helix*, hamująca mutagenne działanie stężonego moczu palacza (ELIAS i współaut. 1990).

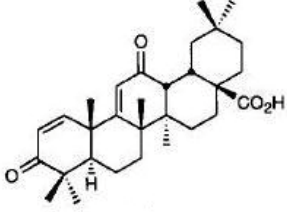
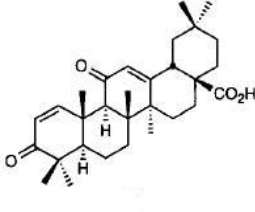
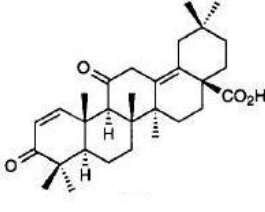
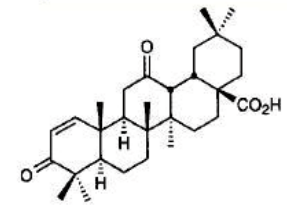
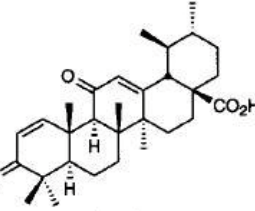
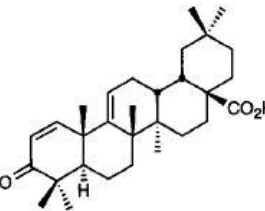
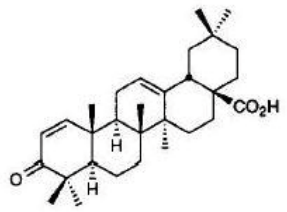
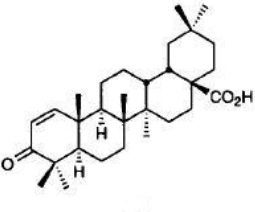
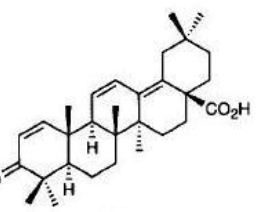
AKTYWNOŚĆ CYTOTOKSYCZNA I HAMOWANIE PROLIFERACJI

Równie ważne jak zapobieganie tworzeniu się raka, jest zahamowanie proliferacji bądź indukowanie śmierci w zmienionych komórkach. CHOI i współaut. (2001) postawili interesującą hipotezę, że przeciwnowotworowe właściwości kwasu oleanolowego polegają na indukowaniu sekrecji tlenu azotu i czynnika martwicy nowotworu α (ang. tumor necrosis factor, TNF- α) przez makrofagi. Tlenek azotu jest główną cząsteczką zaangażowaną w niespecyficzną odpowiedź immunologiczną oraz destrukcję bakterii i komórek nowotworowych. Jego działanie polega między innymi na uszkodzeniu DNA i wywołaniu apoptozy komórki. W mitochondriach makrofagów wysokie stężenie NO stymuluje produkcję O_2^- i H_2O_2 . W wyniku połączenia NO i O_2^- powstaje jon nadazotynowy ONOO^- , odpowiedzialny za uszkodzanie DNA i błon lipidowych. Zarówno NO, jak i ONOO^- w wysokich stężeniach prowadzą do dezaminacji zasad azotowych DNA, co z kolei prowadzi do apoptozy i zwiększenia poziomu białka p53. Apoptoza to aktywny fizjologicznie proces eliminowania, bez indukowania odpowiedzi zapalnej, niepotrzebnych komórek, podczas którego uruchamiana jest kaskada enzymów proteolitycznych, m.in. proteaz cysteinowych, takich jak kaspaza 3, będąca głównym egzekutorem,

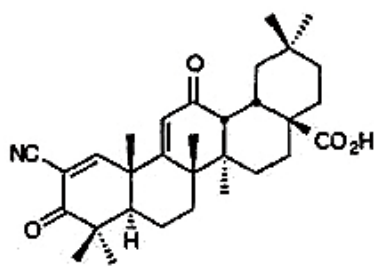
czy kaspaza 1, która jest zaangażowana zarówno w apoptozę, jak i reakcję zapalną. Z kolei, białko p53, znane jako supresor nowotworowy, łączy się z DNA i aktywuje transkrypcję m.in. genu *p21*, którego produkt zatrzymuje komórkę w fazie G1, czyli we wzrostowej fazie cyklu komórkowego, poprzedzającej replikację. W komórkach nowotworowych białko p53 jest nieaktywne, co umożliwia rozwój raka. Natomiast związana z procesem zapalnym glikoproteina TNF- α , produkowana głównie przez aktywowane makrofagi, łącząc się z receptorem na powierzchni komórki rakowej, uruchamia kaskadę reakcji kwasu arachidonowego, co wywołuje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych rodników i w efekcie śmierć komórki. CHOI i współautorzy (2001) zbadali wpływ kwasu oleanolowego na wydzielanie NO i TNF- α z komórek oraz na poziom ekspresji genów kodujących syntetazę tlenu azotu (iNOS) i TNF- α w mysich makrofagach otrzewnowych, a także w komórkach mysich makrofagów białaczkowych. Okazało się, że wzrost poziomu mRNA iNOS i mRNA TNF- α , indukowany przy stężeniu kwasu oleanolowego od 1 μM do 50 μM , był spowodowany przez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κB , występującego w pobliżu promotorów genów wielu

cytokin. W makrofagach, NF- κ B, współpracując z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, koordynuje ekspresję genu kodującego iNOS. Sprawdzono w ten sam sposób działanie kwasu ursolowego (YOU i współaut. 2001) i wykazano, że stymulował on, w zakresie stężeń od 1 μ M do 10 μ M, produkcję NO i TNF- α u makrofagów nieaktywowanych wcześniej bakteryjnym lipopolisacharydem (LPS). Natomiast obniżał on zaindukowaną przez LPS sekrecję NO i ekspresję iNOS. Kwas ursolowy, w przeciwieństwie do kwasu oleanolowego, wykazuje zatem dwójaki wpływ na ekspresję iNOS, zależny od tego czy makrofagi zostały wcześniej zaktywowane przez LPS czy nie. W przypadku nieaktywowanych komórek kwas

ursolowy jest skuteczniejszy przy pięciokrotnie niższym stężeniu niż kwas oleanolowy. Oba kwasy triterpenowe wpływają zarówno na uwalnianie NO, jak i TNF- α , albo też tylko na uwalnianie TNF- α , który produkowany jako pierwszy, indukuje uwalnianie NO na drodze auto- lub parakrynej. Ciekawe badania wykonali HONDA i współaut. (1997), którzy zsyntetyzowali ok. 60 zmodyfikowanych pochodnych kwasu oleanolowego i ursolowego, różniących się między sobą stopniem utlenienia, t.j. obecnością jednej bądź dwóch grup ketonowych, liczbą i miejscem występowania wiązań podwójnych w pierścieniach, a także wolną albo zablockowaną grupą karboksylową. Analizowali zależności między

		
Kwas 3,12-dioksoolean-1,9-dien-28-owy (1)	Kwas 3,11-dioksoolean-1,12-dien-28-owy (2)	Kwas 3,11-dioksoolean-1,13-dien-28-owy (3)
		
Kwas 3,12-dioksoolean-1-en-28-owy (4)	Kwas 3,11-dioksours-1,12-dien-28-owy (5)	Kwas 3-oksoolean-1,9-dien-28-owy (6)
		
Kwas 3-oksoolean-1,12-dien-28-owy (7)	Kwas 3-oksoolean-1-en-28-owy (8)	Kwas 3-oksoolean-1,11,13-trien-28-owy (9)

Ryc. 2. Zmodyfikowane pochodne kwasu oleanolowego i ursolowego. Numery w nawiasach wskazują na rosnącą wartość IC_{50} .



Ryc. 3. Kwas 2-cjano-3,12-dioksoolean-1,9-dien-28-owy.

strukturą otrzymanych triterpenoidów, a ich wpływem na produkcję tlenku azotu, indukowaną interferonem gamma ($\text{INF-}\gamma$) w makrofagach myszy. Okazało się, że 9 spośród zmodyfikowanych związków wykazywało aktywność hamującą już przy stężeniu $1\ \mu\text{M}$ (Ryc. 2). Żaden spośród tych 9 związków nie był toksyczny w stężeniu do $40\ \mu\text{M}$. Wśród nich znalazła się tylko jedna zmodyfikowana pochodna kwasu ursolowego, t.j. kwas 3,12-dioksours-1,9-dien-28-owy (Ryc. 2, 5). Spośród badanych cząsteczek najwyższą aktywność ($\text{IC}_{50} = 0,9\ \mu\text{M}$) wykazał kwas 3,12-dioksoolean-1,9-dien-28-owy (Ryc. 2, 1). Następnie (HONDA i współaut. 1998) zbadano zsyntetyzowane pochodne kwasu oleanolowego z różnymi podstawnikami przy węglu C-2. Najefektywniej działał kwas 2-cjano-3,12-dioksoolean-1,9-dien-28-owy (CDDO) ($\text{IC}_{50} = 0,4\ \text{nM}$) (Ryc. 3), który okazał się 400 razy bardziej efektywny jako inhibitor syntezy NO u makrofagów niż wcześniej testowane zmodyfikowane pochodne. Jego aktywność jest porównywalna z deksametazonem, lekiem o działaniu przeciwzapalnym, przeciwalergicznym i immunosupresyjnym. Ponadto wykazano, iż CDDO hamuje syntezę *de novo* iNOS i COX-2 u makrofagów myszy, a także proliferację komórek wielu ludzkich linii nowotworowych (HONDA i współaut. 1999). Liczne badania wskazują również na proapoptotyczne działanie kwasu ursolowego. Sprawdzano zdolność indukowania apoptozy przez kwas

ursolowy w komórkach linii HepG2, ludzkiego wątrobiaka zarodkowego i wykazano, że stosowany w stężeniu $30\ \mu\text{M}$ wywoływał fragmentację DNA, powstanie komórek subdiploidalnych, czyli o niższej, charakterystycznej dla apoptozy zawartości DNA, uwolnienie cytochromu c oraz zależnej od niego kaspazy 3 (KIM i współaut. 2000). Działanie proapoptotyczne kwasu ursolowego testowano również na linii komórek HaCat (HARMAND i współaut. 2003). Podobnie jak w przypadku komórek ludzkiego wątrobiaka zarodkowego, kwas ursolowy obniżał ich żywotność w zależności od stężenia i czasu podania. Kwas ursolowy do stężenia $10\ \mu\text{M}$ stymulował proliferację komórek, natomiast przy wyższych stężeniach stopniowo ją hamował. W tym czasie białko p53 było fosforylowane i transportowane do jądra, podwyższona była także ekspresja białka p21, komórki były zablokowane w fazie G1, a po 48h nastąpiło nagromadzenie się komórek w fazie Sub-G1. Zachodziła także aktywacja kaspazy 3, której aktywność pojawiała się wcześniej niż typowe cechy apoptozy, co oznacza, że aktywował ją kwas ursolowy. Nie obserwowano natomiast aktywacji kaspazy 1, uczestniczącej zarówno w apoptozie, jak i procesie zapalnym. Działanie cytotoksyczne *in vitro* wykazują także pochodne kwasu oleanolowego, takie jak metyloglukuronozyd z *Viguiera decurrens*, kwas 3β -[(α -L-arabinopiranozylo)-oksy]-23-hydroksyolean-12-en-28-owy z krwiściaga lekarskiego, *Sanguisorba officinalis* L., czy pochodna kwasu ursolowego, cis-karenina, występująca w oleandrze, *Nerium oleander*. Pochodne kwasu oleanolowego, takie jak kwas mazlinowy czy jego prekursor – β -amyryna, oraz pochodne kwasu ursolowego, jak kwas 2- α -hydroksyursolowy, występujące w ekstrakcie z komórek kalusa aktinidii ostrolistnej, *Actinidia arguta*, zatrzymywały proliferację transformowanych nowotworowo komórek ssaczych poprzez hamowanie aktywności polimerazy DNA α i β oraz topoizomerazy II (MIZUSHINA i współaut. 2003).

HAMOWANIE ANGIOGENEZY

Angiogeneza to proces formowania nowych naczyń krwionośnych, charakterystyczna dla embriogenezy, formowania ciała żółtego, gojenia ran, a także w kancerogenezie i chorobach zapalnych. Aktywacja komórek śródbłonna przez sygnał angiogeny stymulu-

je je do uwalniania enzymów degradujących ścianę naczyń. W rezultacie komórki rozpoczynają migrację, proliferują i na koniec różnicują się w celu uformowania nowych naczyń. Każdy z tych etapów może być potencjalnym celem dla interwencji farmakolo-

gicznej. W przypadku rozwoju raka czynniki angiogenne wydzielane z komórek nowotworowych stymulują komórki endotelialne żyłek, do degradacji waskularnej błony podstawnej i do migracji w kierunku masy nowotworowej, a dalej, do promowania proliferacji komórek śródbłonna w załączku naczyń krwionośnych. W konsekwencji, hamowanie angiogenezy może pozwolić na kontrolowanie wzrostu nowotworu i metastazy. Badano hamowanie angiogenezy przez kwas ursolowy i oleanolowy, stosując technikę CAM, która pozwala na określenie unaczynienia błony

kosmówkowo-omoczniowej zarodka kurzego (SOHN i współaut. 1995). Kwas ursolowy okazał się osiem razy bardziej efektywnym inhibitorem niż kwas oleanolowy. Jako kontrolę zastosowano kwas retinowy, o znanej aktywności antyangiogennej. Porównując działanie kwasu ursolowego i oleanolowego z kwasem retinowym, stwierdzono, że były one tylko nieco słabsze niż związek kontrolny, a także nie wywoływały zakrzepicy ani krwotoków, co oznacza, że potencjalnie mogłyby być stosowane w terapii.

PODSUMOWANIE

Leczenie pacjentów chorych na raka oparte na stosowaniu syntetycznych farmaceutyków prowadzi do wielu powikłań, zatem poszukiwane są naturalne substancje pochodzenia roślinnego, które mogłyby być stosowane zarówno w chemoprewencji, jak i terapii nowotworowej. Badania ostatnich lat wykazały, że takimi związkami mogłyby być triterpenowe kwasy oleanolowy i ursolowy, a także niektóre ich pochodne, gdyż wykazują aktywności antymutagenne, antyoksydacyjne i cytotoksyczne, zapobiegają powstawaniu raka, hamują proliferację i różnicowanie komórek zezłośliwionych oraz angiogenezę. Związki te występują w wielu roślinach stosowanych w medycynie naturalnej i kosmetyce, jak i spożywanych na co dzień, między innymi w czarnej jagodzie, czarnym bzie, buraku zwyczajnym, mącznicy lekarskiej, szalwii lekarskiej, ziele barwinka, owocach głogu, rozmarynie, melisie, mięcie pieprzowej,

lawendzie, oregano czy w tymianku. Jako składniki diety przeciwdziałają zmianom nowotworowym w komórkach naszego organizmu. Z kolei, stosowane w postaci farmaceutyków służyłyby w terapii już rozpoczętej transformacji rakowej. Jednak zatwierdzenie tych związków jako leków i podawanie ich w tym charakterze pacjentom wymaga dokładniejszych badań; dotyczy to zwłaszcza pochodnych tych triterpenoidów, jako że do tej pory badacze testowali głównie wolne kwasy. Ponadto dotychczas sprawdzano działanie tych związków przede wszystkim w warunkach *in vitro* na komórki transformowane nowotworowo, natomiast rzadko badania prowadzone były *in vivo* w organizmie zwierzęcia, gdzie współpracuje i oddziałuje na siebie wiele układów i organów, a wynik tej kooperacji jest zależny od olbrzymiej ilości czynników i trudny do przewidzenia.

ANTITUMOR ACTIVITY OF PLANT TRITERPENOIDS: OLEANOLIC ACID, URSOLIC ACID AND THEIR DERIVATIVES

Summary

Oleanolic acid and ursolic acid occur widely in species of the *Magnoliopsylidia* class. They are classified as pentacyclic triterpenoids, which belong to a large group of compounds known as secondary metabolites. Glycoside derivatives of oleanolic and ursolic acids are saponins, so-called because of their ability to form in water a stable soapy foam.

Oleanolic acid and ursolic acid as well as their derivatives reveal antioxidant, antimutagenic and cytotoxic activity. They prevent formation of cancer, inhibit tumor promotion, differentiation of cancer cells and angiogenesis. Therefore potentially they can be used in chemoprevention as well as in cancer therapy.

LITERATURA

- ALBERTS B., 2002. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Science, New York.
CHOI C. Y., YOU H. J., JEONG H. G., 2001. *Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- α Production by*

- Oleanolic Acid via Nuclear Factor- κ B Activation in Macrophages*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 288, 49–55.

- CHOLUJ A., JANISZOWSKA W., 2005. *Pochodne kwasu oleanolowego i ich działanie farmakologiczne*. Herba Polonica 51, 66–75.
- DEGOWSKA M., RYDZEWSKA G., 2005. *Chemoprewencja raka jelita grubego*. Przewodnik Lekarski 10, 46–51.
- DINKOVA-KOSTOVA A. T., LIBY K. T., STEPHENSON K. K., HOLTZCLAW W. D., GAO X., SUH N., WILLIAMS C., RISINGSONG R., HONDA T., GRIBBLE G. W., SPORN M. B., TALALAY P., 2005. *Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: Correlations of protection against oxidant and inflammatory stress*. Proc. Natl. Acad. Sci. 22, 4584–4589.
- ELIAS R., MEO M. D., VIDAL-OLLIVIER E., LAGET M., BALANSARD G., DUMENIL G., 1990. *Antimutagenic activity of some saponins isolated from Calendula officinalis L., C. arvensis and Hedera helix L.* Mutagenesis 5, 327–331.
- GOŁĄB J., JAKÓBISIAK M., LASEK W., 2002. *Immunologia*. PWN, Warszawa.
- HARMAND P. O., DUVAL R., LIAGRE B., JAYAT-VIGNOLES C., BENEYTOUT J. L., DELAGE C., SIMON A., 2003. *Ursolic acid induces apoptosis through caspase-3 activation and cell cycle arrest in HaCat cells*. Int. J. Oncol. 23, 105–112.
- HONDA T., FINLAY H. J., GRIBBLE G. W., SUH N., SPORN M. B., 1997. *New enone derivatives of oleanolic acid and ursolic acid as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 7, 1623–1628.
- HONDA T., ROUNDS B. V., BORE L., FAVALORO F. G., GRIBBLE G. W., SUH N., WANG Y., SPORN M. B., 1999. *Novel syntetic oleanane triterpenoids: a series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 9, 3429–3434.
- HONDA T., ROUNDS B. V., GRIBBLE G. W., SUH N., WANG Y., SPORN M. B., 1998. *Design and synthesis of 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid, a novel and highly active inhibitor of nitric oxide production in mouse macrophages*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 8, 2711–2714.
- JĄŻWA A., 2005. *Leukotrieny cysteinylowe - mediatorzy zapalenia astmatycznego*. <http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Jazwa04>.
- KIM D. K., BAEK J. H., KANG C. M., YOO M. A., SUNG J. W., CHUNG H. Y., KIM N. D., CHOI Y. H., LEE S. H., KIM K. W., 2000. *Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication*. Int. J. Cancer 87, 629–36.
- KOHLMÜNZER S., 1998. *Farmakognozja*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- LODISH H., 1999. *Molecular Cell Biology*. WH Freeman & Company, New York.
- MALEPSZY S., 2004. *Biotechnologia roślin*. PWN, Warszawa.
- MIZUSHINA Y., IKUTA A., ENDOH K., OSHIGE M., KASAI N., KAMIYA K., SATAKE T., TAKAZAWA H., MORITA H., TOMIYASU H., YOSHIDA H., SUGAWARA F., SAKAGUCHI K., 2003. *Inhibition of DNA polymerases and DNA topoisomerase II by triterpenes produced by plant callus*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 305, 365–373.
- NAJID A., SIMON A., COOK J., CHABLE-RABINOVITCH E. L., DELAGE C., CHULIA A. J., RIGAUD M., 1992. *Characterization of ursolic acid as a lipooxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells*. FEBS Lett. 299, 213–217.
- PAECH K., TRACEY M. V., 1955. *Moderne Methoden Der Pflanzenanalyse*. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- READ A. P., 1997. *Human Molecular Genetics*. John Wiley & Sons, New York.
- SIMON A., NAJID A., CHULIA A. J., DELAGE C., RIGAUD M., 1992. *Inhibition of lipooxygenase activity on HL60 leukemic cell proliferation by ursolic acid isolated from heater flowers (Calluna vulgaris)*. Biochim. Biophys. Acta 1125, 68–72.
- SOHN K. H., LEE H. Y., CHUNG H. Y., YOUNG H. S., YI S. Y., KIM K. W., 1995. *Anti-angiogenic activity of triterpene acids*. Cancer Lett. 94, 213–218.
- SUBBARAMAIAH K., MICHALLUART P., SPORN M. B., DANNERBERG A. J., 2000. *Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells*. Cancer Res. 60, 2399–2404.
- WĘGLEŃSKI P., 2002. *Genetyka molekularna*. PWN, Warszawa.
- YOU H. J., CHOI C. Y., KIM J. Y., PARK S. J., HAHM K. S., JEONG H. G., 2001. *Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production via nuclear factor-kappaB activation in the resting macrophages*. FEBS Lett. 509, 156–60.