

Received: 2016.01.27
Accepted: 2017.02.20
Published: 2017.05.17

Farmakologiczne właściwości ostolu

Pharmacological features of osthole

Agata Jarzab¹, Aneta Grabarska¹, Krystyna Skalicka-Woźniak², Andrzej Stepulak^{1,3}

¹Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

²Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

³Oddział Otolaryngologii Szpitala MSWiA w Lublinie

Streszczenie

Kumaryny są dużą grupą naturalnych związków, powszechnie występujących w świecie roślin. Wspomniane związki chemiczne i ich pochodne wykazują szeroki zakres aktywności biologicznych.

Jedną z naturalnie występujących kumaryn jest ostol, występujący najczęściej w roślinach z rodziny *Apiaceae* np. *Cnidium monnieri*, (L.) Cusson ex Juss. *Angelica pubescens* Maxim. i *Peucedanum ostruthium* (L.) W. D. J. Koch. Wykazano właściwości antyproliferacyjne, przeciwzapalne, przeciwdrgawkowe i przeciwalergiczne tej substancji, hamuje także agregację płytek krwi. Wykazano wpływ ostolu na metabolizm tkanki kostnej, potwierdzono także jego właściwości hepatoprotekcyjne i neuroprotekcjne. Udowodniono hamujące działanie na rozwój chorób neurodegeneracyjnych w modelach doświadczalnych. Wykazano także przeciwnowotworowe właściwości ostolu zarówno w warunkach *in vitro* na różnych liniach komórkowych, jak również *in vivo* z użyciem zwierząt doświadczalnych. Ostol powodował obniżenie proliferacji, ruchliwości i inwazyjności komórek nowotworowych. Hamowanie proliferacji może być związane z indukcją apoptozy i spowolnieniem przebiegu cyklu komórkowego, ale mechanizm działania ostolu nie został w pełni wyjaśniony. Wykazano także synergistyczne działanie ostolu z innymi substancjami o właściwościach przeciwnowotworowych. Modyfikacja jego struktury chemicznej doprowadziła do zsyntetyzowania licznych pochodnych o znaczących właściwościach przeciwnowotworowych. Sugeruje to, że ostol może być jednym ze składników nowych chemioterapeutyków.

Podsumowując, ostol może się stać ważną metodą terapeutyczną, zarówno ze względu na jego bezpośrednie działanie na komórki nowotworowe, jak również działanie neuroprotekcjne, czy przeciwzapalne. Istnieją zatem szanse na wykorzystanie ostolu lub jego syntetycznych pochodnych w leczeniu chorych nowotworowych w najbliższej przyszłości.

Słowa kluczowe: kumaryny • ostol • proliferacja • apoptoza • cykl komórkowy • ekspresja genowa

Summary

Coumarins are a group of naturally occurring compounds common in the plant world. These substances and their derivatives exhibit a broad range of biological activities.

One of the naturally occurring coumarins is osthole, which can most frequently be found in plants of the *Apiaceae* family. *Cnidium monnieri* (L.) Cusson ex Juss. *Angelica pubescens* Maxim. and *Peucedanum ostruthium* (L.). It has anti-proliferative, anti-inflammatory, anti-convulsant, and antiallergic properties; apart from that, inhibition of platelet aggregation has also been proved. The impact of osthole on bone metabolism has been demonstrated; also its hepatoprotective and neuroprotective properties have been confirmed. The inhibitory effect of this

compound on the development of neurodegenerative diseases has been proved in experimental models. Anticancer features of osthole have been also demonstrated both *in vitro* on different cell lines, and *in vivo* using animals xenografts. Osthole inhibited proliferation, motility and invasiveness of tumor cells, which may be associated with the induction of apoptosis and cell cycle slowdown. The exact molecular mechanism of osthole anti-cancer mode of action has not been fully elucidated. A synergistic effect of osthole with other anti-tumor substances has been also reported. Modification of its chemical structure led to the synthesis of many derivatives with significant anticancer effects.

To sum up, osthole is an interesting therapeutic option, due to both its direct effect on tumor cells, as well as its neuroprotective or anti-inflammatory properties. Thus, there is a chance to use osthole or its synthetic derivatives in the treatment of cancer.

Keywords: coumarins • osthole • proliferation • apoptosis • cell cycle • gene expression

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1238139>

Word count: 4002
Tables: –
Figures: 2
References: 82

Adres autorki: dr n. med. Agata Jarzab, Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Witolda Chodźki 1, 20-093 Lublin; e-mail: agata.jarzab@umlub.pl

Wykaz skrótów: **ALP** – fosfataza alkaliczna (alkaline phosphatase) (EC 3.1.3.1), **BMPs** – białka morfogenetyczne (bone morphogenetic proteins), **CPTIA** – transferaza palmitynowa typu I (carnitine O-palmitoyl-transferase I) (E.C.2.3.1.2.1), **CYP7A-7-α** – hydroksylaza cholesterolowa (cholesterol 7 alpha-hydroxylase) (E.C.1.14.13.17), **DGAT** – acylotransferaza diacyloglicerolowa (diacylglycerol acyltransferase) (E.C.2.3.1.20), **ECM** – macierz pozakomórkowa (extracellular matrix), **ERK1/2** – kinazy regulowane zewnątrzkomórkowo (extracellular signal – regulated kinases), **FASN** – gen syntazy kwasów tłuszczowych (fatty acid synthase gene), **FFA** – wolny kwas tłuszczowy (free fatty acid), **GPX** – peroksydaza glutationowa (glutathione peroxidase) (E.C. 1.11.1.9), **HBsAg** – antygen zapalenia wątroby typu B (antigen of the hepatitis B virus), **HMGCR** – reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylowa koenzymu A (hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase) (E.C. 1.1.1.34), **IFN-γ** – interferon gamma (interferon γ), **IL** – interleukina (interleukin), **JNK1/2** – kinazy N-końcowe c-Jun (c-Jun N-terminal kinases), **LPS** – lipopolisacharyd (lipopolysaccharide), **MAPK** – kinazy białkowe aktywowane przez mitogen (mitogen-activated protein kinases), **MMP** – metaloproteinazy macierzy (matrix metalloproteinases), **NF-κB** – czynnik jądrowy kappa B), **OPG** – osteoprotegeryna (osteoprotegerin), **PPAR** – receptor aktywowany przez proliferatory peroksyosomów (peroxisome proliferator-activated receptor), **RANK** – receptor aktywujący jądrowy czynnik NF-κB (receptor activator of nuclear factor NF-κB), **RANKL** – ligand RANK (receptor activator of nuclear factor NF-κB ligand), **SMAD** – związane białka Sma i Mad (Sma and Mad related proteins), **TC** – całkowity cholesterol (total cholesterol), **TG** – triacyloglicerol (triacylglycerol), **TNF** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor).

WSTĘP

Kumaryny są grupą związków biologicznie czynnych, które charakteryzuje różnorodność działań farmakologicznych. Wiąże się to bezpośrednio z różnicami w budowie cząsteczek poszczególnych związków. Kumaryny są pochodnymi α-pirolu – aromatycznego związku heterocyklicznego. Można je także traktować jako cykliczne laktony kwasu *cis*-o-hydroksycynamonowego (kwas kumarynowy). Kwas ten ma samoistną tenden-

cję do tworzenia wewnętrznego wiązania estrowego, w wyniku którego powstaje lakton nazywany kumaryną. Pod względem budowy kumaryny dzieli się na kumaryny proste (podstawowa część cząsteczki tworzona jest przez benzo-α-piron), furanokumaryny (kumaryna jest skondensowana z cząsteczką furanu) i piranokumaryny (kumaryna jest połączona z cząsteczką piranu). Różnorodność kumaryn jest związana z modyfikacjami chemicznymi ich struktur, polegającymi najczęściej na obecności w cząsteczkach grup hydroksylowych, metok-

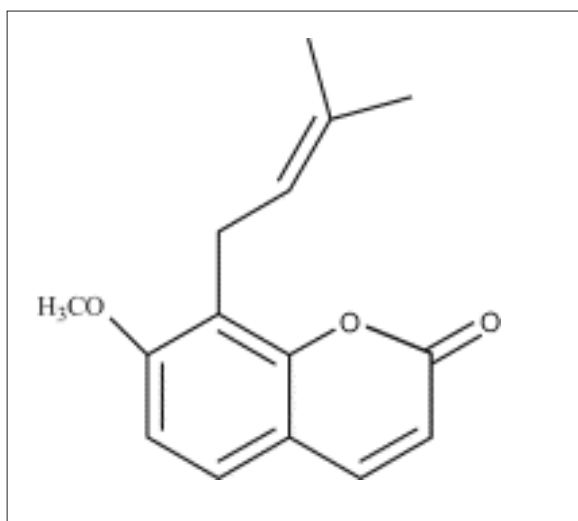
sylowych lub alifatycznych. Grupy te są najczciej lokowane w pozycjach C-5, C-6, C-7 i C-8 [3,19]. Kumaryny należą do związków określanych mianem metabolitów wtórnych. Można je znaleźć w naturalnie występujących olejkach, np. furaokumaryny w olejkach cytrusowych. Spotykane są również w roślinach z rodziny *Rutaceae* i *Umbelliferae*, gdzie występują najliczniej, oraz w *Fabaceae*, *Rubiaceae*, *Asteraceae*, *Oleaceae* *Hippocastanaceae* [27]. Wyizolowano je również z mikroorganizmów (grzyby, bakterie) [30,55]. Odkryto liczne wlcnoci kumaryn, m.in. antybakteryjne [61], przeciwwirusowe [20], przeciwdrgawkowe [39,40], przeciwwzkrzepowe [31] czy przeciwnowotworowe [30,54]. Wspomnie naley o fotoczulajcym działaniu furanokumaryn, co znalazło zastosowanie w leczeniu w postaci terapii PUVA. Pochodne psoralenu – zwszcza bergapten i ksantotoksyna, tworzą wiązania z zasadami pirymidynowymi kwasu deoksyrybonukleinowego pod wplywem promienia nadfioletowego (UVA, 320-400 nm). Dochodzi wczas do denaturacji DNA komórek naskórki, co hamuje ich wzmożony podział. W terapii bielactwa, stosowanie psoralenów z naświetlaniem promieniami UV powoduje wzrost namnażania się melanocytów, a co za tym idzie repigmentacji skóry [50]. Kumaryny znane są z wlcnoci antykoagulacyjnych, a najstarszym lekiem o takim działaniu jest dikumarol [9]. Piranokumaryny wykazują działanie spazmolityczne na misnie gładkie i jako antagoniści jonów wapniowych znajdują zastosowanie w leczeniu chorób układu krwionośnego i serca (np. dusznicy) czy dychawicy oskrzelowej [9,28].

Ostol (7-metoksy-8-izopentenokumaryna) jest przedstawicielem kumaryn prostych, izolowanym z owoców *Cnidium monnieri* (L.) Cusson ex Juss (selernica), *Angelica pubescens* Maxim. i *Peucedanum ostruthium* (L.) W. D. J. Koch. (gorysz miarz) czy korzeni *Angelica officinalis* L. (arcydzięgiel litwor), *Prangos ferulacea* (L.) Lindl. Jego zawartość w korzeniach arcydzięgla wynosi około 0,2%, [27], a Wei i wsp. z 308 g surowego ekstraktu wyizolowali 88,3 mg czystego związku [70].

Obecnie trwarz badania nad ostolem jako potencjalnym lekiem w równych schorzeniach. Udowodniono jego działanie przeciwwzapalne [35,71], przeciwwirusowe [20,66], antykoagulacyjne [72], przeciwdrgawkowe [39,40,72] i przeciwalergiczne [42]. Związek był testowany pod kątem potencjalnego wykorzystania w profilaktyce i leczeniu osteoporozy [29,44,67,79], chorobach wątroby [12,65,68,80,82], schorzeniach związanych z układem nerwowym [5,17,25,37,41]. W badaniach *in vivo* i *in vitro* wykazano także jego wlcnoci przeciwnowotworowe [8,24,73,74]. W artykule opisano wiele wybranych dziaa farmakologicznych ostolu oraz potencjalne zastosowanie w leczeniu równego typu schorzeń, ze szczególnym uwzględnieniem chorób nowotworowych (rycina 1).

WPLYW OSTOLU NA METABOLIZM TKANKI KOSTNEJ

Homeostaza układu kostnego wymaga zrównoważonych interakcji między osteoblastami i osteoklastami.



Ryc. 1. Budowa chemiczna ostolu

Osteoporoza powoduje zmniejszenie masy kostnej, co wynika z zaburzeń w tworzeniu i resorpcji kości. Dotychczasowa terapia opiera się na obniżeniu aktywności osteoklastów. Przykładami tak działających lekww są bisfosfoniany, analogi receptora estrogenowego [67]. Wykazano, że ostol hamowa resorpcj kości przez spadek aktywności metabolicznej osteoklastów [78]. Badania ostatnich lat koncentruj się głownie na mechanizmie pobudzenia aktywności osteoblastów. Jedną z substancji mających wplyw na proces proliferacji i rznicowania osteoblastów jest ostol. Dyskutowana jest możliwości jego wykorzystania jako leku w terapii osteoporozy [33]. Wstępne doświadczenia wykazały aktywacj osteoblastów, związaną z procesem przebudowy kości pod wplywem ostolu [43]. W wielu pwniejszych publikacjach wykazano, że ostol zwiększa proliferacj osteoblastów *in vitro* [43,67,78,79]. Zdecydowanie rzadsze są doniesienia mówiące o tym, że ostol nie powoduje żadnych istotnych zmian w proliferacji tych komórek [44,45].

Ostol wplywa także na rznicowanie osteoblastów, co wykazano oznaczają *in vitro* aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP), która jest markerem wczesnej fazy rznicowania osteoblastów oraz badają sekrecj osteokalcyne, związanej z pwn faz ich rznicowania (faza mineralizacji kości) [44,45,79]. Ostol znacząco zwiększa aktywność ALP i sekrecj osteokalcyne [29,44,67,79]. Powodowa także wzrost magazynowania wapnia i fosforanów w komórkach, prowadząc do wzrostu mineralizacji kości [44,45,67,79].

Powyższe zmiany mogą być następstwem wzrostu ekspresji czynników troficznych: insulinopodobnego czynnika wzrostu I (IGF I), czynnika wzrostu fibroblastów (FGF) oraz białek morfogenetycznych rodziny BMP i kolagenu typu I pod wplywem ostolu [45]. Ostol mógłby doprowadzi również do uwolnienia wspomnianych czynników wzrostu z macierzy pozakomórkowej, stymulując dojrzewanie prekursorów osteoblastów i induku-

jąc aktywność ALP. Skutkiem tego byłby nasilony proces różnicowania osteoblastów [45].

Inny z proponowanych mechanizmów działania ostolu na poziomie molekularnym w procesie różnicowania osteoblastów dotyczy aktywacji czynników transkrypcyjnych SMAD oraz kinaz MAP – kinazy p38 i kinaz ERK1/2, zależnie lub niezależnie od szlaku białka BMP2. Sugerowany jest udział tych szlaków sygnalizacyjnych w różnicowaniu osteoblastów pod wpływem ostolu, przy czym aktywacja kinazy p38 miałaby być odpowiedzialna za wczesną fazę, natomiast aktywacja kinaz ERK1/2 za późną fazę procesu różnicowania osteoblastów linii MG-63 i hFOB (płodowych komórek osteoblastycznych) [29]. Prawdopodobny jest również udział szlaku Wnt w tym procesie. Znaczenie funkcjonalne szlaku Wnt w indukcji różnicowania osteoblastów zostało potwierdzone przez eksperyment powodujący wyciszenie ekspresji genów dla β -kateniny i BMP2. Zmniejszona ekspresja tych genów hamowała pobudzające działanie badanej substancji na różnicowanie osteoblastów, co potwierdziło, że różnicowanie osteoblastów odbywa się przynajmniej częściowo przez aktywację szlaku sygnalizacyjnego Wnt/ β -kateniny-BMP2 [67]. Prawdopodobne jest również oddziaływanie ostolu na szlak OPG/RANKL/RANK. Prawdopodobna przebudowa kości jest zapewniona m.in. przez dynamiczną równowagę w wydzielaniu cytokin typu RANKL przez osteoblasty, stymulujące ich dojrzewanie i aktywność oraz OPG, która hamuje ten proces przez wiązanie się z RANKL. Zaburzenia w układzie RANKL/OPG wiążą się z nieprawidłowościami w metabolizmie kostnym, prowadzącymi do osteopenii i rozwoju osteoporozy [58,63]. Podawanie ostolu zwierzętom doprowadziło do wzrostu ekspresji mRNA dla OPG, natomiast do zmniejszenia ekspresji mRNA IL-8, RANKL, czynnika stymulujący kolonie makrofagów (M-CSF) i peptydu parathormonopodobnego (PTHrP) [58]. Badania *in vivo* w innego typu modelu doświadczalnym osteoporozy wykonywano na kastrowanych (po usunięciu jajników) szczurach. Osłabia to masę kostną, a stan po zabiegu jest porównywalny z okresem postmenopauzalnym u kobiet. Porównano działanie ostolu do 17 β -estradiolu, który obecnie jest jednym z leków w terapii osteoporozy. Podawanie ostolu doprowadziło do stopniowej poprawy właściwości biomechanicznych kości u szczurów i zahamowania utraty masy kostnej, podobnie jak to powodował 17 β -estradiol. W odróżnieniu jednak od 17 β -estradiolu, ostol nie oddziaływał na śluzówkę macicy oraz znacząco zmniejszał ryzyko zachorowania na raka piersi i jajników [33,43]. Podsumowując, ostol wpływa na liczne szlaki metaboliczne w tkance kostnej, przez stymulowanie procesu kościotworzenia i zapobiegając jego zahamowaniu, co wydaje się obiecującą zapowiedzią zastosowania ostolu w przyszłości jako skutecznego leku nowej generacji w terapii osteoporozy.

OSTOL JAKO SUBSTANCJA HEPATOPROTEKCYJNA

Zaburzenia gospodarki lipidowej organizmu powodują występowanie chorób cywilizacyjnych, takich jak

cukrzyca, miażdżycy naczyń, stłuszczenie wątroby. Postępowanie terapeutyczne polega na zmianie diety, abstynencji alkoholowej, podawaniu antyoksydantów czy leków obniżających stężenie lipidów [13]. O ile stosowanie statyn pozwala na utrzymanie prawidłowego profilu lipidowego we krwi, to skuteczność leczenia stłuszczenia wątroby w dalszym ciągu jest niezadowalająca. Ostol wydaje się jedną z potencjalnych substancji, mogących mieć zastosowanie w profilaktyce i leczeniu stłuszczenia wątroby.

Zarówno w modelu przekarmiania szczurów mlekiem zawierającym nadmiar lipidów [10,80,82], jak i w modelu alkoholowego stłuszczenia wątroby [51,64,65,77], obserwowano podobne obniżenie parametrów lipidowych we krwi zwierząt doświadczalnych oraz zmniejszoną akumulację lipidów w skrawkach tkankowych po zastosowaniu ostolu [10,51,62,65,77,80,82]. Zaobserwowano spadek ilości całkowitego cholesterolu (TC) i trójglicerydów (TG) [10,51,62,65], frakcji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) [62] oraz wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) w surowicy zwierząt [10,51]. Obniżył się również poziom TC [10,62,65], TG [10,51,62,65], FFA [10,51], jak również enzymów - lipazy lipoproteinowej (LPL), wątrobowej (HL) [82] oraz całkowitej akumulacji lipidów w skrawkach tkanki wątrobowej [10,62,77,80,82]. Może się to wiązać z obserwowanym na poziomie molekularnym obniżeniem ekspresji genów kodujących acylotransferazę diacyloglicerolową (DGAT) [64,77,80], reduktazę 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A (HMGCR) [47,64], receptora LDL [81], jak również wzrostem ekspresji genów kodujących transferazę karnityno-palmitynianową typu I (CPTIA) [34,47,77], 7- α -hydroksylazę cholesterolową (CYP7A) [64,80,81], białko wiążące kwasy tłuszczowe (FABP) i białko transportujące kwasy tłuszczowe (FATP4) pod wpływem ostolu w komórkach wątroby [80].

Powyższe zmiany parametrów lipidowych krwi oraz zmniejszenie akumulacji lipidów w tkance wątrobowej mogą mieć również związek z obserwowanym obniżeniem poziomu stresu oksydacyjnego w tym narządzie po zastosowaniu ostolu, wyrażającym się hamowaniem wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS), prawdopodobnie pod wpływem zwiększenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych, głównie dysmutazy ponadtlenkowej [35,62,65,77]. W modelu stłuszczenia wątroby spowodowanym hiperglikemiczną dietą, dodatkowym czynnikiem, indukowanym podawaniem ostolu, był wzrost sekrecji adiponektyny [51].

W szczurzym modelu *in vivo*, rozwijającym spontaniczne nadciśnienie tętnicze, a w konsekwencji udar mózgu, ostol hamował wzrost ciśnienia skurczowego krwi bez zmian profilu lipidowego osocza. Proponowany mechanizm działania ostolu w tym przypadku polega na zwiększeniu ekspresji mRNA dla dehydrogenazy acylo-CoA i CPTIA, a w konsekwencji akceleracji β -oksydacji kwasów tłuszczowych [47]. Aktywność hepatoprotekcyjna ostolu może być związana z regulacją ekspresji genów

kodujących DGAT, HMG-CoA-R i CYP7A przez zwiększenie ekspresji receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksyosomów (PPAR α/γ) na poziomie mRNA [34,59,80,81]. W jednej z publikacji stwierdzono, że ostol może być traktowany jako agonista PPAR α/γ , zwiększa bowiem aktywność tych receptorów i indukcji różnicowania się preadipocytów w badaniach *in vitro* [34]. W modelu zwierzęcym pobudzenie PPAR- γ przez ostol doprowadziło także do wzrostu ilości hormonu adiponektyny w surowicy, podnosząc tym samym insulino-wrażliwość tkanek [25,34], co jest istotne w przypadku rosnącej oporności na insulinę obserwowanej w stłuszczeniu wątroby.

Skutkiem stłuszczenia wątroby może być jej marskość, czego wykładnikiem jest stan zapalny i włóknienie narządu. Obiecujące wydaje się więc działanie ostolu, polegające na hamowaniu tych procesów. Badania prowadzone na zwierzętach wykazały przeciwzapalne działanie tej substancji [48,49,65]. Zaobserwowano, że ostol przyczynił się do obniżenia poziomu aminotransferazy alaninowej we krwi [48,49]. Inne badania *in vivo* wykazały zahamowanie reakcji zapalnych w szczurzym modelu zwłóknieniu wątroby, przez inkubację z ostolem, co doprowadziło do obniżenia poziomu mRNA dla następujących genów: *tnf- α* , *interleukin-1 β* , *inos*. Inkubacja z ostolem spowodowała także obniżenie syntezy CXCL1, będącego ligandem rodziny receptorów chemokin CXC [38].

Potencjalne właściwości przeciwzapalne ostolu oceniano w hodowlach makrofagów J774A.1 przy braku lub w obecności pobudzającego je bakteryjnego lipopolisacharydu (LPS). Na poziomie molekularnym działanie przeciwzapalne ostolu może być związane z osłabieniem aktywności kinaz białkowych C- α/ϵ (PKC- α/ϵ) po inkubacji z ostolem makrofagów pobudzanych LPS [35]. Metoda Western-blot wykazała także zmniejszenie fosforylacji i aktywności kinazy p38 i kinazy N-końcowych c-Jun (JNK1/2), natomiast wzrost fosforylacji i aktywności ERK1/2 [35]. Obserwowano także hamowanie fosforylacji kinazy inhibitora czynnika KB (IKK- α) i inhibitora alfa czynnika jądrowego kappa ($\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$) w pobudzonych LPS makrofagach, zatem pośrednie zahamowanie aktywności czynnika jądrowego kappa B (NF- κB) pod wpływem ostolu. Ponadto, potwierdzono zmniejszenie aktywności transkrypcyjnej samego NF- κB . Spostrzeżenia te mogą sugerować, że ostol wpływa na hamowanie kaskady sygnałowej NF- κB [35].

Oceniano także oddziaływanie ostolu na indukcję apoptozy w mechanizmie zewnątrzpocho-dnym w komórkach wątroby z udziałem receptora Fas z rodziny receptorów śmierci TNF. Badana substancja zmniejszyła aktywność głównego enzymu efektorowego apoptozy – kaspazy-3 we krwi i przedłużyła czas życia zwierzętom po podaniu letalnej dawki przeciwciała anty-Fas [48]. Ostol może również hamować uszkodzenie wątroby spowodowane przez wirusy hepatotropowe zmniejszając sekrecję powierzchniowego antygeny zapalenia wątroby typu B

(HBsAg) w liniach komórkowych, które zostały poddane wcześniej transfekcji wirusem HBV oraz zwiększając stopień glikozylacji HBsAg, co może zmniejszyć namnażanie się wirusa w komórkach [20].

Ostol może być również rozpatrywany jako potencjalny lek w cukrzycy typu 2 [20,25]. Zaobserwowano obniżenie stężenia glukozy we krwi zwierząt po podaniu ostolu [20,25]. Mechanizm tego zjawiska nie został wyjaśniony. Sugerowano, że potencjalną przyczyną może być zwiększenie translokacji przenośnika glukozy GLUT4 do błony komórkowej, czego skutkiem było zwiększenie zależnego od dawki wychwytu glukozy w badaniach *in vitro* w komórkach mięśni szkieletowych [25]. Na poziomie molekularnym sugerowany jest związek działania ostolu ze zwiększeniem stosunku AMP/ATP oraz wzmożonej fosforylacji i aktywacji kinazy aktywowanej 5'AMP (AMPK) i karboksylazy acetylo-CoA [20,25]. Jednocześnie interesujące jest to, że ostol nie wpływał na zmniejszenie poziomu insuliny we krwi, tak jak inni agoniści PPAR [34].

W związku ze słabą rozpuszczalnością ostolu w wodzie, są syntetyzowane pochodne ostolu, które mogą się stać lekami hepatoprotekcyjnymi, stosowanymi doustnie [49].

OSTOL JAKO POTENCJALNA SUBSTANCJA LECZNICZA W CHORO-BACH OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO

Ostol wydaje się jedną z potencjalnych substancji o działaniu neuroprotekcijnym. Badania jego wpływu na chorobę niedokrwienną mózgu prowadzono na zwierzęcym modelu tego schorzenia. Stwierdzono, że zmniejszał deficyt poznawczy i hamował śmierć neuronów [12,25], obniżał deficyty neurologiczne [12,25], rozległość zawału [12] i obrzęk mózgu [25] obejmujący również hipokamp. Hipokamp odgrywa znaczącą rolę w procesach uczenia i zapamiętywania, przenosi wspomnienia z pamięci krótkotrwałej do długotrwałej. W badaniach *in vivo* na mysim modelu starzenia stwierdzono, że ostol poprawiał zdolności zapamiętywania [57]. Natomiast w badaniach *in vitro*, w których neurony korowe inkubowano z ostolem wykazano znaczący wzrost przeżywalności neuronów i blokowanie uwolnienia dehydrogenazy mleczanowej (LDH) jako markera cytotoxyczości [5]. Działanie neuroprotekcyjne ostolu jest związane również z nasilaniem przewodnictwa neuronalnego w hipokampie przez zwiększenie presynaptycznego uwalniania glutaminianu, uwarunkowanego na poziomie molekularnym przez aktywację szlaku kinazy zależnej od cGMP [69] lub zwiększenie przepustowości bliżej niesprecyzowanych kanałów wapniowych [69,71] i sodowych [32]. W szczurzym modelu udaru wywołanego przejściowym niedokrwieniem obserwowano wzrost aktywności macierzowych metaloproteinaz (MMP) degradujących macierz pozakomórkową (ECM). Po podawaniu ostolu w diecie obserwowano obniżenie ekspresji MMP-9 [41].

W mysim modelu maksymalnego elektroszoku drgawkowego wykazano przeciwdrgawkowe działanie ostolu.

W przyszłości może się więc stać ważnym związkiem w leczeniu epilepsji, wymagającym jednak dalszych badań przedklinicznych m.in. na innych modelach zwierzęcych [39,40]. Stwierdzono, że właściwości przeciwdrgawkowe ostolu są podobne do zaobserwowanych dla kwasu walproinowego, który jest klasycznym lekiem przeciwpadaczkowym [40]. Eksperymenty z zastosowaniem rekombinowanych receptorów GABA wykazały pobudzający wpływ ostolu, przy czym wiązanie się badanej substancji z receptorem odbywało się w miejscu różnym od wiązania się benzodiazepin [60]. Działanie neuroprotektoryjne ostolu obserwowano także na modelu urazowego uszkodzenia mózgu (TBI). Stwierdzono znaczącą redukcję deficytów neurologicznych, obrzęku mózgu i śmierci neuronów hipokampa [17]. Wiązano to ze wzmożeniem aktywności antyoksydacyjnej – wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), poziomu glutationu i peroksydazy glutationowej (GPX) [17,25], a także stosunku mitochondrialnych białek Bcl-2/Bax, warunkujących apoptozę, czego wyrazem mógł być obserwowany spadek ilości aktywnej kaspazy-3 i liczby komórek apoptotycznych [17].

Stwierdzono również, że szlaki kinaz JNK/p38 i kinaz ERK1/2 wykazują przeciwstawne skutki w stosunku do neuronalnej apoptozy w warunkach *in vitro* i zaburzenia równowagi między nimi mogą prowadzić do przeżycia lub do śmierci komórek. Kinazy MAP wykazują wysoką ekspresję w CUN, a ich aktywność zmienia się w tkankach dotkniętych niedokrwieniem. Obserwowano, że pobudzenie szlaku kinaz ERK1/2 powodowało wystąpienie neuroprotekcji [5]. Inne badania donoszą, że aktywacja tego szlaku świadczy o skutkach neurotoksycznych [56]. Jest to prawdopodobnie zależne od rodzaju komórek oraz rodzaju uszkodzenia, przez które ten szlak jest uaktywniany [46]. Aktywacja kinaz JNK i p38 wpływa natomiast neurotoksycznie na neurony [46]. W badaniach *in vitro* na komórkach linii szczurzych neuronów korowych ostol zwiększał fosforylację kinaz ERK1/2 i tym samym doprowadził do ich aktywacji, natomiast osłabiał aktywność kinaz JNK [5]. Obserwacje te potwierdzają właściwości neuroprotektoryjne ostolu i sugerują potencjalny mechanizm jego działania na poziomie molekularnym w komórkach nerwowych.

Udowodniono również hamujący wpływ ostolu i innych kumaryn na rozwój chorób neurodegeneracyjnych w modelach doświadczalnych, m.in. choroby Parkinsona [37]. Jej wystąpienie jest związane z utratą neuronów dopaminergicznych w substancji czarnej i obniżeniem stężenia dopaminy w prążkowie [37]. Badania *in vitro* prowadzono na komórkach nowotworowych guza chromochłonnego kory nadnerczy linii PC12, indukowanych aktywną postacią neurotoksyny MTP jako modelu imitującego chorobę Parkinsona. Toksyna ta wywołuje śmierć neuronów, obniża mitochondrialny potencjał błonowy oraz wzrost przepuszczalności błony mitochondrialnej. Po inkubacji komórek z ostolem zaobserwowano wzrost ich przeżywalności w porównaniu z komórkami kontrolnymi, traktowanymi neurotoksyną. Zjawisko to mogło

być związane zarówno z właściwościami antyoksydacyjnymi jak i antyapoptotycznymi ostolu. Zauważono, że ostol zwiększał także aktywność enzymów antyoksydacyjnych, zwłaszcza SOD i GPX. Jednak wykazywał działanie antyapoptotyczne, wpływał na wzrost ekspresji genu Bcl-2, natomiast zmniejszał ekspresję Bax [37].

Ostol działał także przeciwzapalnie w OUN, ograniczając rozwój autoimmunologicznego zapalenia mózgu u myszy C57 BL/6. Przypuszcza się, że ten ochronny wpływ może być związany ze zwiększeniem stężenia czynnika wzrostu nerwów (NGF) i zmniejszeniem ilości IFN- γ we krwi. Zbadano także ekspresję genów tych cytokin. Wykazano wzrost ekspresji genu dla NGF i zmniejszenie ekspresji genu IFN- γ [6]. Podsumowując, wpływ ostolu na poziom ekspresji cytokin zapalnych w zapaleniu mózgu może opóźnić rozwój choroby i złagodzić jej przebieg. Ostol mógłby być zatem rozpatrywany w przyszłości jako potencjalny terapeutyczny w leczeniu chorych z chorobami neurodegeneracyjnymi [6].

OSTOL JAKO SUBSTANCJA PRZECIWNOWOTWOROWA

Niedawne doniesienia wskazują, że ostol może być rozważany jako potencjalny chemioterapeutyczny w profilaktyce i terapii chorób nowotworowych. Jego działanie hamujące proliferację komórek nowotworowych zależnie od czasu i dawki, zostało potwierdzone badaniami *in vitro* na komórkach raka szyjki macicy HL-60 [8], komórkach rdzeniaka zarodkowego (medulloblastoma) TE671 i komórkach raka krtani RK33 [24], raka płuc A549 [73] oraz *in vivo* z wykorzystaniem mysiego modelu białaczki P-388 D1 [8]. Hamowanie proliferacji komórek pod wpływem ostolu może mieć związek z aktywacją apoptozy lub też ze spowolnieniem przebiegu cyklu komórkowego. Doniesienia z piśmiennictwa potwierdzają indukcję apoptozy pod wpływem ostolu w komórkach linii A549 [73], linii białaczki limfatycznej P-388 D1 [8], komórkach linii raka piersi MCF-7 i MDA-MB 231 [74], komórkach medulloblastoma TE671 [24], komórkach raka krtani RK33 [24] czy fibroblastach izolowanych z przerostu blizny [18]. Wykazano wzrost liczby komórek apoptotycznych pod wpływem inkubacji z tą substancją [8,18,24,73,74], a także typowe cechy morfologiczne apoptozy, takie jak fragmentacja DNA, tworzenie pęcherzykowatych uwypukleń błony komórkowej, kurczenie się cytoplazmy komórek nowotworowych [8,18].

Potencjalne przeciwnowotworowe mechanizmy działania ostolu na poziomie komórkowym są związane m.in. z hamowaniem przebiegu cyklu komórkowego. Wykazano procentowy wzrost liczby komórek linii A549 raka płuc w fazie G2/M [73], a komórek mięśni gładkich w fazie G0/G1 [14] po inkubacji z tą substancją. Wydaje się zatem, że działanie ostolu na progresję cyklu komórkowego jest mało swoiste i może zależeć w znacznym stopniu od rodzaju badanych komórek. Przypuszczalny mechanizm tego procesu wiązany z obniżeniem ekspresji genów kodujących cyklinę B1 i kinazę Cdc2 w linii raka płuc A549 [73]. Na poziomie molekularnym ostol hamo-

wał również aktywność kinazy Akt w tych komórkach [73] oraz w komórkach raka piersi [36]. Postulowany jest też wpływ ostolu na ekspresję genu *TGF-β* [15,18], białek SMAD [15] oraz czynnika transkrypcyjnego NF-κB [15] w linii raka piersi MDA-MB-231BO oraz na szlak HGF/Met, związany z inwazyjnością i przerzutowaniem komórek raka piersi MCF-7 [23]. Dane z piśmiennictwa wykazują, że ostol hamował ekspresję genu dla syntazy kwasów tłuszczowych (FASN) indukowaną obecnością ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu-2 (HER2) w komórkach raka piersi. Działanie to było spowodowane obniżeniem fosforylacji kinaz Akt-mTOR i aktywacji szlaku sygnalizacyjnego, co potwierdzono eksperymentem z indukowaną nadekspresją kinazy Akt. Hamowanie FASN może być zatem kolejnym mechanizmem przeciwnowotworowym działania ostolu. Wydaje się jednak, że ostol [5] oraz inne kumaryny [11] nie przenikają przez błony komórkowe, co może sugerować, że kumaryny wiążą się z receptorami na powierzchni komórki [11,53]. Tym niemniej, szczegółowy mechanizm działania ostolu na poziomie molekularnym nie został wyjaśniony.

Jednym z tego typu potencjalnych działań jest hamujący wpływ ostolu na procesy migracji i inwazyjności komórek nowotworowych, wiązany ze zmianami w ekspresji MMP. MMP tworzą grupę proteaz, zawierających jony cynku Zn^{+2} w miejscu katalitycznym. Syntetyzowane są w postaci nieaktywnej, a następnie są wydzielane poza komórkę lub pozostają związane z błoną komórkową. Główną ich funkcją jest degradowanie białek macierzy pozakomórkowej, takich jak kolagen, proteoglikany czy fibronektyna, co ułatwia migrację komórek. ECM składa się nie tylko z białek strukturalnych, ale także zawiera liczne czynniki wzrostu, uwalniane przez MMP, które w warunkach fizjologicznych kontrolują proces angiogenezy, embriogenezy czy przebudowy tkanek. W niektórych stanach patologicznych (nowotwory, choroby neurodegeneracyjne czy sercowo-naczyniowe) wykazano ich nadmierną aktywność. Zaobserwowano, że ostol skutecznie hamował migrację i indukował apoptozę w komórkach linii raka piersi MCF-7, blokując promotora MMP-2 i obniżając aktywność tej metaloproteiny, co wydaje się mieć istotne znaczenie w przerzutowaniu nowotworów [74]. Potwierdzeniem tej hipotezy może być doniesienie wykazujące, że ostol hamował pojawienie się przerzutów odległych w kościach w mysim modelu raku piersi MDA-MB-231BO [57]. Stwierdzono również, że ostol obniżał aktywność MMP-9 w komórkach linii raka płuc CL1-5 oraz MMP-2 i MMP-9 w innych liniach raka płuc - H1299 i A549 [26]. Ekspresja MMP może być indukowana z udziałem czynnika transkrypcyjnego NF-κB [52]. W związku z tym, że ostol osłabia wiązanie czynnika transkrypcyjnego z DNA promotora genu MMP-9, prawdopodobne jest obniżenie ekspresji tej metaloproteiny w mechanizmie zależnym od NF-κB [26].

Prowadzono także badania, mające na celu wykazanie potencjalnego synergizmu działania ostolu z innymi substancjami pochodzenia roślinnego m.in. z platy-

kodyną D, pochodzącą z wyciągu korzenia *Platycodon grandiflorus* (rozwar wielkokwiatowy), działającą przeciwnowotworowo, wykorzystywaną w leczeniu ostrych i przewlekłych nieżytów dróg oddechowych [7].

Wykazano, że mieszanina platykodyny D z ostolem [16] hamowała proliferację i inwazyjność komórek nowotworowych raka piersi linii 4T1 i MDA-MB-231, podobnie jak komórek raka piersi MDA-MB-231BO, inkubowanych z ostolem, psoralenem i akonityną [15]. Ostol wzmacniał także działanie cytotoksyczne paklitakselu *in vitro* w komórkach nowotworowych raka piersi z nadekspresją receptora HER2 [36].

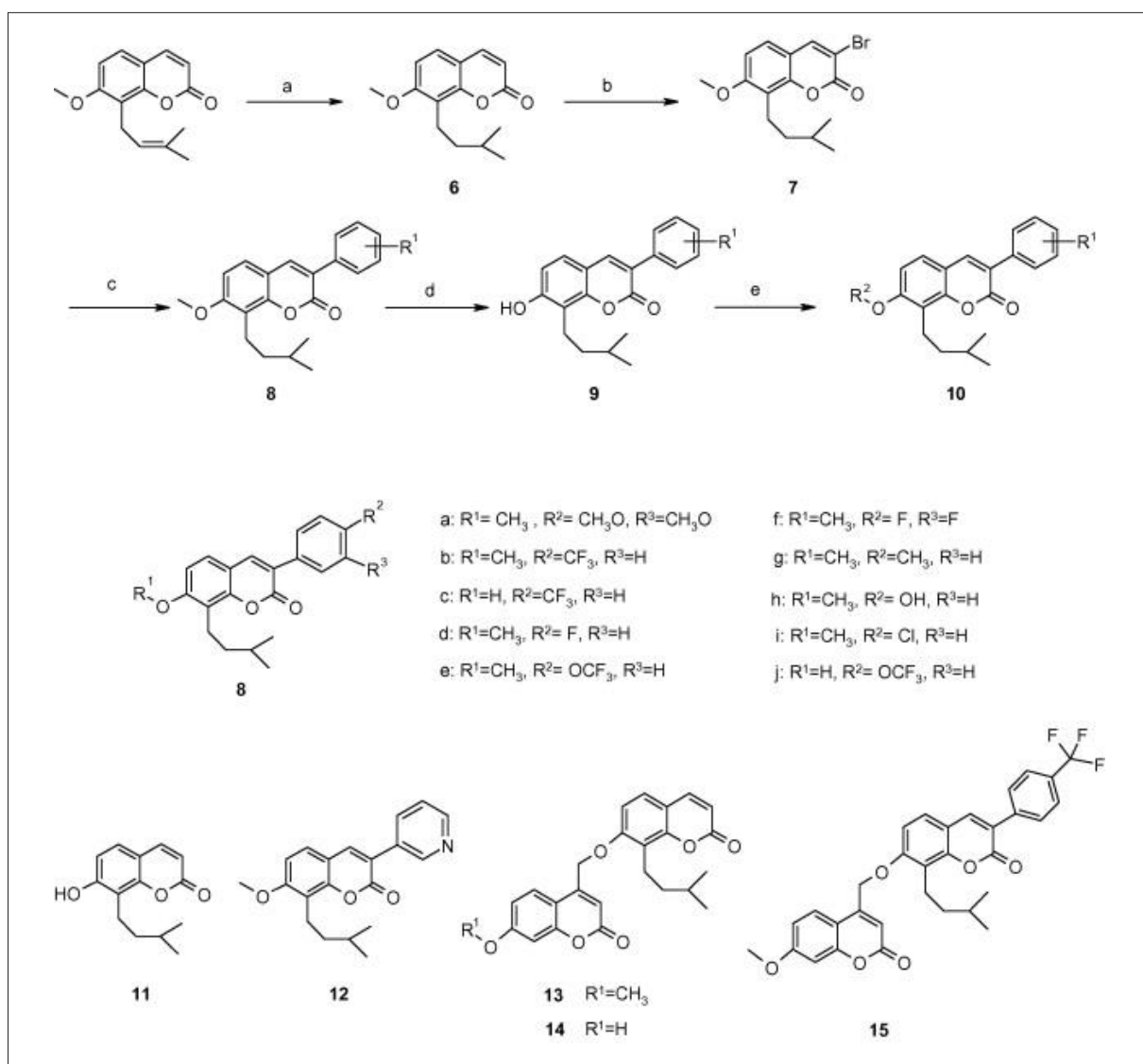
Ze względu na własności chemiczne ostolu może być też związkiem wyjściowym do syntezy nowych generacji leków przeciwnowotworowych. Modyfikacje struktury ostolu doprowadziły do zsyntetyzowania licznych jego pochodnych, charakteryzujących się działaniem przeciwnowotworowym. Zaobserwowano działanie antyproliferacyjne pochodnych ostolu na komórki linii nowotworowych: raka stercza PC-3, niedrobnokomórkowego raka płuc A549 i nowotworu wątroby Hep3B [21,22]. Modyfikacja struktury ostolu przez wprowadzenie w pozycji trzeciej pierścienia furanowego podstawników arylowych, w pozycji 7 pierścienia benzenu grupy metoksylowej, powodowała nawet 100-krotne nasilenie właściwości cytotoksycznych tych substancji na komórki nowotworowe. Jednocześnie stwierdzono brak cytotoksyczności w stosunku do prawidłowych komórek linii HEK-293 wyizolowanej z nerki płodu [76]. Innego typu pochodne ostolu, np. 8-3-hydroksymetylobutyl-7-metoksykumaryna, wykazywały umiarkowane i nieswoiste działanie cytotoksyczne na komórki złośliwego raka nabłonka KB, raka piersi linii MCF-7, ludzkiego gruczolakoraka płuc SK-LU-1 oraz nowotworu wątroby HepG2 [1]. Wskazuje to, że ostol może być jednym ze składników nowych chemioterapeutyków. Podjęto próby syntezy nowego rodzaju substancji leczniczych, polegające na połączeniu w jednej cząsteczce ostolu i niektórych rodzajów inhibitorów deacetylaz histonów. Wykazano, że nasilają one acetylację alfa-tubuliny i histonu H3, a także charakteryzują się zwiększoną selektywnością działania na deacetylazy histonów (HDAC) w porównaniu do innych znanych inhibitorów HDAC (HDI) jak np. kwas suberanilohydroksamowy (SAHA). Wykazano, że nowo zsyntetyzowane związki łatwiej wiążą się z enzymem i nasilają jego inhibicję [21,22].

Wykazano, że ostol jest bardziej cytotoksyczną substancją w stosunku do komórek linii białaczkowej HL-60, nowotworu szyjki macicy HeLa i nowotworu okrężnicy CoLo 205 w porównaniu do innych kumaryn [75]. Zauważono, że grupa prenylowa w strukturze chemicznej ostolu ma istotne znaczenie w obserwowanej cytotoksyczności [75]. Jednocześnie wykazano, że ostol był zdecydowanie mniej toksyczny w stosunku do kultur prawidłowych fibroblastów izolowanych z szyjki macicy [8], czy osteoblastów [79]. Dodatkową zaletą potencjal-

nego zastosowania tej substancji w leczeniu jest jego mała dawka na kilogram masy ciała zwierząt doświadczalnych jaką stosowano w badaniach *in vivo*, podając ostol myszom z białaczką limfatyczną w celu osiągnięcia zamierzonego efektu leczniczego [8].

Ostol jest substancją leczniczą, działającą wielokierunkowo. Oprócz zaobserwowanej aktywności antyproliferacyjnej w stosunku do komórek nowotworowych w badaniach *in vitro* i *in vivo*, wykazuje także inne właściwości, które mogłyby zostać wykorzystane w terapii przeciwnowotworowej. Porównanie działania 17 β -estradiolu i ostolu w leczeniu osteoporozy wykazało wiele podobieństw. Istotną różnicą było jednak to, że ostol nie obniżał ani masy zwierząt doświadczalnych, ani nie powodował spadku masy ich macicy, grasicy, czy tarczycy. Odmienne w porównaniu do estradiolu dzia-

łanie ostolu na narząd rodny mogłoby być korzystne w zahamowaniu rozwoju endometriozy, raka piersi i jajników, których występowanie bywa związane z podawaniem estrogenów [33]. Obserwowany aktywujący udział ostolu w procesie proliferacji i różnicowania osteoblastów mogłoby też zostać wykorzystany w terapii nowotworów, kiedy pacjentom podawane są leki zwiększające resorpcję kości [33]. Leki stosowane w chorobach nowotworowych mogą się także przyczyniać do uszkodzenia wątroby [2]. Ostol wykazuje właściwości ochronne w schorzeniach, przebiegających z wystąpieniem stanu zapalnego tego narządu, a także związanych z jej stłuszczeniem i włóknieniem [48,49,65]. Ostol wykazuje właściwości neuroprotektcyjne, co jest szczególnie ważne w leczeniu przeciwnowotworowym, gdyż większość ze stosowanych leków ma właściwości neurotoksyczne [4].



Ryc. 2. Nowe syntetyczne pochodne ostolu [73]

PODSUMOWANIE

Reasumując, ostol jest ważną propozycją terapeutyczną, zarówno ze względu na jego działanie bezpośrednio na komórki nowotworowe, jak również korzystne, ochronne skutki terapeutyczne w innych narządach organizmu, przy jednoczesnej niewielkiej toksyczności w stosunku do komórek prawidłowych. Obecnie na rynku są dostępne preparaty, zawierające w składzie ostol w postaci ekstraktu z korzenia arcydzięgla. Przykładem może być Nervosol czy Melisal, zalecane w stanach wyczerpania nerwowego czy bezsenności, Iberogast w chorobach żołądka i jelit, czy zioła Bittnera stosowane w dolegliwościach pęcherzyka żółciowego. Innym przykładem jest Rheumafort, stosowany w chorobie zwyrodnieniowej stawów,

reumatoidalnym zapaleniu stawów czy toczeniu rumieniowym. Stwierdzono, że hamuje wytwarzanie zapalnych prostaglandyn i leukotrienów, a także cytokin, odpowiedzialnych za proces zapalenia i niszczenie chrząstki stawowej w chorobach reumatycznych. Ostol może także być w przyszłości rozpatrywany jako potencjalny związek o właściwościach chemioprewencyjnych. Jednak obecnie zbyt mało przeprowadzono badań *in vivo* z wykorzystaniem ostolu, co jest istotnym kryterium w określeniu chemioprewencji danego związku. Wydaje się prawdopodobne, że pochodne ostolu, które zawierają w jednej cząsteczce ostol i inhibitory deacetylaz histonów, mogą być podstawą leków nowej generacji. Istnieją zatem szanse na wykorzystanie ostolu lub jego syntetycznych pochodnych w leczeniu chorób nowotworowych w przyszłości.

PIŚMIENICTWO

- [1] Barthomeuf C., Lim S., Iranshahi M., Chollet P.: Umbelliprenin from *Ferula szowitsiana* inhibits the growth of human M4Beu metastatic pigmented malignant melanoma cells through cell-cycle arrest in G1 and induction of caspase-dependent apoptosis. *Phyto-medicine*, 2008; 15: 103-111
- [2] Begriche K., Massart J., Robin M.A., Borgne-Sanchez A., Fromenty B.: Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J. Hepatol.*, 2011; 54: 773-794
- [3] Borges F., Roleira F., Milhazes N., Santana L., Uriarte E.: Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Curr. Med. Chem.*, 2005; 12: 887-916
- [4] Ceresa C., Cavaletti G.: Drug transporters in chemotherapy induced peripheral neurotoxicity: current knowledge and clinical implications. *Curr. Med. Chem.*, 2011; 18: 329-341
- [5] Chen T., Liu W., Chao X., Qu Y., Zhang L., Luo P., Xie K., Huo J., Fei Z.: Neuroprotective effect of osthole against oxygen and glucose deprivation in rat cortical neurons: involvement of mitogen-activated protein kinase pathway. *Neuroscience*, 2011; 183: 203-211
- [6] Chen X., Pi R., Zou Y., Liu M., Ma X., Jiang Y., Mao X., Hu X.: Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57 BL/6 mice by osthole, a natural coumarin. *Eur. J. Pharmacol.*, 2010; 629: 40-46
- [7] Chiu P.R., Lee W.T., Chu Y.T., Lee M.S., Jong Y.J., Hung C.H.: Effect of the Chinese herb extract osthol on IL-4-induced eotaxin expression in BEAS-2B cells. *Pediatr. Neonatol.*, 2008; 49: 135-140
- [8] Chou S.Y., Hsu C.S., Wang K.T., Wang M.C., Wang C.C.: Antitumor effects of Osthol from *Cnidium monnieri*: an *in vitro* and *in vivo* study. *Phytother. Res.*, 2007; 21: 226-230
- [9] Cisowski W.: Biologiczne właściwości kumaryny. Cz.1. Działanie na rośliny oraz właściwości farmakologiczne i przeciwbakteryjne. *Herba Polonica*, 1983; 29: 301-318
- [10] Du R., Xue J., Wang H.B., Zhang Y., Xie M.L.: Osthol ameliorates fat milk-induced fatty liver in mice by regulation of hepatic sterol regulatory element-binding protein-1c/2-mediated target gene expression. *Eur. J. Pharmacol.*, 2011; 666: 183-188
- [11] Elinos-Báez C.M., Leon F., Santos E.: Effects of coumarin and 7OH-coumarin on bcl-2 and Bax expression in two human lung cancer cell lines *in vitro*. *Cell Biol. Int.*, 2005; 29: 703-708
- [12] Fruman D.A., Meyers R.E., Cantley L.C.: Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, 1998; 67: 481-507
- [13] Gencer B., Moradpour D., Rodondi N.: Lipid-lowering treatment and liver dysfunction. *Rev. Med. Suisse*, 2012; 8: 507-508, 510-512
- [14] Guh J.H., Yu S.M., Ko F.N., Wu T.S., Teng C.M.: Antiproliferative effect in rat vascular smooth muscle cells by osthole, isolated from *Angelica pubescens*. *Eur. J. Pharmacol.*, 1996; 298: 191-197
- [15] Guo B.F., Liu S., Ye Y.Y., Han X.H.: Inhibitory effects of osthole, psoralen and aconitine on invasive activities of breast cancer MDA-MB-231BO cell line and the mechanisms. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 2011; 9: 1110-1117
- [16] Han X.H., Ye Y.Y., Guo B.F., Liu S.: Effects of platycodin D in combination with different active ingredients of Chinese herbs on proliferation and invasion of 4T1 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 2012; 10: 67-75
- [17] He Y., Qu S., Wang J., He X., Lin W., Zhen H., Zhang X.: Neuroprotective effects of osthole pretreatment against traumatic brain injury in rats. *Brain Res.*, 2012; 1433: 127-136
- [18] Hou X.H., Cao B., Liu H.Q., Wang Y.Z., Bai S.F., Chen H.: Effects of osthole on apoptosis and TGF-beta1 of hypertrophic scar fibroblasts. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 2009; 11: 663-669
- [19] Hoult J.R., Payá M.: Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol.*, 1996; 27: 713-722
- [20] Huang R.L., Chen C.C., Huang Y.L., Hsieh D.J., Hu C.P., Chen C.F., Chang C.: Osthole increases glycosylation of hepatitis B surface antigen and suppresses the secretion of hepatitis B virus *in vitro*. *Hepatology*, 1996; 24: 508-515
- [21] Huang W.J., Chen C.C., Chao S.W., Lee S.S., Hsu F.L., Lu Y.L., Hung M.F., Chang C.I.: Synthesis of N-hydroxycinnamides capped with a naturally occurring moiety as inhibitors of histone deacetylase. *Chem. Med. Chem.*, 2010; 5: 598-607
- [22] Huang W.J., Chen C.C., Chao S.W., Yu C.C., Yang C.Y., Guh J.H., Lin Y.C., Kuo C.I., Yang P., Chang C.I.: Synthesis and evaluation of aliphatic-chain hydroxamates capped with osthole derivatives as histone deacetylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, 2011; 46: 4042-4049
- [23] Hung C.M., Kuo D.H., Chou C.H., Su Y.C., Ho C.T., Way T.D.: Osthole suppresses hepatocyte growth factor (HGF)-induced epithelial-mesenchymal transition via repression of the c-Met/Akt/mTOR

pathway in human breast cancer cells. *J. Agric. Food Chem.*, 2011; 59: 9683-9690

[24] Jarzab A., Grabarska A., Kielbus M., Jeleniewicz W., Dmoszyńska-Graniczka M., Skalicka-Woźniak K., Sieniawska E., Polberg K., Stepulak A.: Osthole induces apoptosis, suppresses cell-cycle progression and proliferation of cancer cells. *Anticancer Res.*, 2014; 34: 6473-6480

[25] Ji H.J., Hu J.F., Wang Y.H., Chen X.Y., Zhou R., Chen N.H.: Osthole improves chronic cerebral hypoperfusion induced cognitive deficits and neuronal damage in hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.*, 2010; 636: 96-101

[26] Kao S.J., Su J.L., Chen C.K., Yu M.C., Bai K.J., Chang J.H., Bien M.Y., Yang S.F., Chien M.H.: Osthole inhibits the invasive ability of human lung adenocarcinoma cells via suppression of NF- κ B-mediated matrix metalloproteinase-9 expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2012; 261: 105-115

[27] Kohlmunzer S.: *Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji: Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa; 1998*

[28] Kozawa T., Sakai K., Uchida M., Okuyama T., Shibata S.: Calcium antagonistic action of a coumarin isolated from „Qian-Hu”, a Chinese traditional medicine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1981; 33: 317-320

[29] Kuo P.L., Hsu Y.L., Chang C.H., Chang J.K.: Osthole-mediated cell differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in human osteoblast cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005; 314: 1290-1299

[30] Lacy A., O'Kennedy R.: Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Curr. Pharm. Des.*, 2004; 10: 3797-3811

[31] Lee Y.Y., Lee S., Jin J.L., Yun-Choi H.S.: Platelet anti-aggregatory effects of coumarins from the roots of *Angelica genuflexa* and *A. gigas*. *Arch. Pharm. Res.*, 2003; 26: 723-726

[32] Leung Y.M., Kuo Y.H., Chao C.C., Tsou Y.H., Chou C.H., Lin C.H., Wong K.L.: Osthol is a use-dependent blocker of voltage-gated Na⁺ channels in mouse neuroblastoma N2A cells. *Planta Med.*, 2010; 76: 34-40

[33] Li X.X., Hara I., Matsumiya T.: Effects of osthole on postmenopausal osteoporosis using ovariectomized rats; comparison to the effects of estradiol. *Biol. Pharm. Bull.*, 2002; 25: 738-742

[34] Liang H.J., Suk F.M., Wang C.K., Hung L.F., Liu D.Z., Chen N.Q., Chen Y.C., Chang C.C., Liang Y.C.: Osthole, a potential antidiabetic agent, alleviates hyperglycemia in db/db mice. *Chem. Biol. Interact.*, 2009; 181: 309-315

[35] Liao P.C., Chien S.C., Ho C.L., Wang E.I., Lee S.C., Kuo Y.H., Jeyashoke N., Chen J., Dong W.C., Chao L.K., Hua K.F.: Osthole regulates inflammatory mediator expression through modulating NF- κ B, mitogen-activated protein kinases, protein kinase C, and reactive oxygen species. *J. Agric. Food Chem.*, 2010; 58: 10445-10451

[36] Lin V.C., Chou C.H., Lin Y.C., Lin J.N., Yu C.C., Tang C.H., Lin H.Y., Way T.D.: Osthole suppresses fatty acid synthase expression in HER2-overexpressing breast cancer cells through modulating Akt/mTOR pathway. *J. Agric. Food Chem.*, 2010; 58: 4786-4793

[37] Liu W.B., Zhou J., Qu Y., Li X., Lu C.T., Xie K.L., Sun X.L., Fei Z.: Neuroprotective effect of osthole on MPP⁺-induced cytotoxicity in PC12 cells via inhibition of mitochondrial dysfunction and ROS production. *Neurochem. Int.*, 2010; 57: 206-215

[38] Liu Y.W., Chiu Y.T., Fu S.L., Huang Y.T.: Osthole ameliorates hepatic fibrosis and inhibits hepatic stellate cell activation. *J. Biomed. Sci.*, 2015; 22: 63

[39] Luszczycki J.J., Andres-Mach M., Cisowski W., Mazol I., Glowniak K., Czuczwar S.J.: Osthole suppresses seizures in the mouse maximal electroshock seizure model. *Eur. J. Pharmacol.*, 2009; 607: 107-109

[40] Luszczycki J.J., Wojda E., Andres-Mach M., Cisowski W., Glenski M., Glowniak K., Czuczwar S.J.: Anticonvulsant and acute neurotoxic

effects of imperatorin, osthole and valproate in the maximal electroshock seizure and chimney tests in mice: a comparative study. *Epilepsy Res.*, 2009; 85: 293-299

[41] Mao X., Yin W., Liu M., Ye M., Liu P., Liu J., Lian Q., Xu S., Pi R.: Osthole, a natural coumarin, improves neurobehavioral functions and reduces infarct volume and matrix metalloproteinase-9 activity after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.*, 2011; 1385: 275-280

[42] Matsuda H., Tomohiro N., Ido Y., Kubo M.: Anti-allergic effects of *Cnidium monnieri* fructus (dried fruits of *Cnidium monnieri*) and its major component, osthol. *Biol. Pharm. Bull.*, 2002; 25: 809-812

[43] Meng F., Xiong Z., Sun Y., Li F.: Coumarins from *Cnidium monnieri* (L.) and their proliferation stimulating activity on osteoblast-like UMR106 cells. *Pharmazie*, 2004; 59: 643-645

[44] Ming L.G., Ge B.F., Chen K.M., Ma H.P., Zhai Y.K., Zhou J., Li Z.F.: Effect of Osthol on the proliferation and differentiate of osteoblasts *in vitro*. *Zhongguo Gu Shang*, 2010; 23: 688-691

[45] Ming L.G., Zhou J., Cheng G.Z., Ma H.P., Chen K.M.: Osthol, a coumarin isolated from common *Cnidium* fruit, enhances the differentiation and maturation of osteoblasts *in vitro*. *Pharmacology*, 2011; 88: 33-43

[46] Nozaki K., Nishimura M., Hashimoto N.: Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia. *Mol. Neurobiol.*, 2001; 23: 1-19

[47] Ogawa H., Sasai N., Kamisako T., Baba K.: Effects of osthol on blood pressure and lipid metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Ethnopharmacol.*, 2007; 112: 26-31

[48] Okamoto T., Kawasaki T., Hino O.: Osthole prevents anti-Fas antibody-induced hepatitis in mice by affecting the caspase-3-mediated apoptotic pathway. *Biochem. Pharmacol.*, 2003; 65: 677-681

[49] Okamoto T., Kobayashi T., Yoshida S.: Synthetic derivatives of osthole for the prevention of hepatitis. *Med. Chem.*, 2007; 3: 35-44

[50] Pathak M.A., Fitzpatrick T.B.: The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. *J. Photochem. Photobiol. B*, 1992; 14: 3-22

[51] Qi Z., Xue J., Zhang Y., Wang H., Xie M.: Osthole ameliorates insulin resistance by increment of adiponectin release in high-fat and high-sucrose-induced fatty liver rats. *Planta Med.*, 2011; 77: 231-235

[52] Radhakrishnan S.K., Kamalakaran S.: Pro-apoptotic role of NF- κ B: implications for cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006; 1766: 53-62

[53] Riveiro M.E., De Kimpe N., Moglioni A., Vázquez R., Monczor F., Shayo C., Davio C.: Coumarins: old compounds with novel promising therapeutic perspectives. *Curr. Med. Chem.*, 2010; 17: 1325-1338

[54] Riveiro M.E., Shayo C., Monczor F., Fernández N., Baldi A., De Kimpe N., Rossi J., Debenedetti S., Davio C.: Induction of cell differentiation in human leukemia U-937 cells by 5-oxygenated-6,7-methylenedioxy coumarins from *Pterocaulon polystachyum*. *Cancer Lett.*, 2004; 210: 179-188

[55] Sarker S.D., Nahar L.: Natural medicine: the genus *Angelica*. *Curr. Med. Chem.*, 2004; 11: 1479-1500

[56] Sawe N., Steinberg G., Zhao H.: Dual roles of the MAPK/ERK1/2 cell signaling pathway after stroke. *J. Neurosci. Res.*, 2008; 86: 1659-1669

[57] Shen L.X., Jin L.Q., Zhang D.S., Xue G.P.: Effect of osthol on memory impairment of mice in AlCl₃-induced acute senile model. *Yao Xue Xue Bao*, 2002; 37: 178-180

[58] Sheng L., Wu C.Y., Chen X.F.: Inhibitory acting mechanism of psoralen-osthole on bone metastasis of breast cancer - an exapatiation viewing from OPG/RANKL/RANK system. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 2011; 31: 684-689

[59] Shin E., Lee C., Sung S.H., Kim Y.C., Hwang B.Y., Lee M.K.: Antifi-

- brotic activity of coumarins from *Cnidium monnieri* fruits in HSC-T6 hepatic stellate cells. *J. Nat. Med.*, 2011; 65: 370-374
- [60] Singhuber J., Baburin I., Ecker G.F., Kopp B., Hering S.: Insights into structure-activity relationship of GABAA receptor modulating coumarins and furanocoumarins. *Eur. J. Pharmacol.*, 2011; 668: 57-64
- [61] Smyth T., Ramachandran V.N., Smyth W.F.: A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2009; 33: 421-426
- [62] Song F., Xie M.L., Zhu L.J., Zhang K.P., Xue J., Gu Z.L.: Experimental study of osthole on treatment of hyperlipidemic and alcoholic fatty liver in animals. *World J. Gastroenterol.*, 2006; 12: 4359-4363
- [63] Stanisławowski M., Kmieć Z.: Udział RANK, RANKL i OPG w osteolizie towarzyszącej nowotworom. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 234-241
- [64] Sun F., Xie M.L., Xue J., Wang H.B.: Osthol regulates hepatic PPAR α -mediated lipogenic gene expression in alcoholic fatty liver murine. *Phytomedicine*, 2010; 17: 669-673
- [65] Sun F., Xie M.L., Zhu L.J., Xue J., Gu Z.L.: Inhibitory effect of osthole on alcohol-induced fatty liver in mice. *Dig. Liver Dis.*, 2009; 41: 127-133
- [66] Tamura S., Fujitani T., Kaneko M., Murakami N.: Prenylcoumarin with Rev-export inhibitory activity from *Cnidii Monnieri Fructus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010; 20: 3717-3720
- [67] Tang D.Z., Hou W., Zhou Q., Zhang M., Holz J., Sheu T.J., Li T.F., Cheng S.D., Shi Q., Harris S.E., Chen D., Wang Y.J.: Osthole stimulates osteoblast differentiation and bone formation by activation of beta-catenin-BMP signaling. *J. Bone Miner. Res.*, 2010; 25: 1234-1245
- [68] Vadas O., Burke J.E., Zhang X., Berndt A., Williams R.L.: Structural basis for activation and inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases. *Sci. Signal.*, 2011; 4: re2
- [69] Wang S.J., Lin T.Y., Lu C.W., Huang W.J.: Osthole and imperatorin, the active constituents of *Cnidium monnieri* (L.) Cusson, facilitate glutamate release from rat hippocampal nerve terminals. *Neurochem. Int.*, 2008; 53: 416-423
- [70] Wei Y., Zhang T., Ito Y.: Preparative isolation of osthol and xanthotoxol from common *Cnidium* fruit (Chinese traditional herb) using stepwise elution by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2004; 1033: 373-377
- [71] Wu S.N., Lo Y.K., Chen C.C., Li H.F., Chiang H.T.: Inhibitory effect of the plant-extract osthole on L-type calcium current in NG108-15 neuronal cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2002; 63: 199-206
- [72] Xiang Y.Z., Kang L.Y., Gao X.M., Shang H.C., Zhang J.H., Zhang B.L.: Strategies for antiplatelet targets and agents. *Thromb. Res.*, 2008; 123: 35-49
- [73] Xu X., Zhang Y., Qu D., Jiang T., Li S.: Osthole induces G2/M arrest and apoptosis in lung cancer A549 cells by modulating PI3K/Akt pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2011; 30: 33
- [74] Yang D., Gu T., Wang T., Tang Q., Ma C.: Effects of osthole on migration and invasion in breast cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2010; 74: 1430-1434
- [75] Yang L.L., Wang M.C., Chen L.G., Wang C.C.: Cytotoxic activity of coumarins from the fruits of *Cnidium monnieri* on leukemia cell lines. *Planta Med.*, 2003; 69: 1091-1095
- [76] You L., An R., Wang X., Li Y.: Discovery of novel osthole derivatives as potential anti-breast cancer treatment. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010; 20: 7426-7428
- [77] Zhang J., Xue J., Wang H., Zhang Y., Xie M.: Osthole improves alcohol-induced fatty liver in mice by reduction of hepatic oxidative stress. *Phytother. Res.*, 2011; 25: 638-643
- [78] Zhang Q., Qin L., He W., Van Puyvelde L., Maes D., Adams A., Zheng H., De Kimpe N.: Coumarins from *Cnidium monnieri* and their antiosteoporotic activity. *Planta Med.*, 2007; 73: 13-19
- [79] Zhang W., Ma D., Zhao Q., Ishida T.: The effect of the major components of *Fructus cnidii* on osteoblasts *in vitro*. *J. Acupunct. Meridian Stud.*, 2010; 3: 32-37
- [80] Zhang Y., Xie M., Xue J., Gu Z.: Osthole improves fat milk-induced fatty liver in rats: modulation of hepatic PPAR-alpha/gamma-mediated lipogenic gene expression. *Planta Med.*, 2007; 73: 718-724
- [81] Zhang Y., Xie M.L., Xue J., Gu Z.L.: Osthole regulates enzyme protein expression of CYP7A1 and DGAT2 via activation of PPARalpha/gamma in fat milk-induced fatty liver rats. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 2008; 10: 807-812
- [82] Zhang Y., Xie M.L., Zhu L.J., Gu Z.L.: Therapeutic effect of osthole on hyperlipidemic fatty liver in rats. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2007; 28: 398-403

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.