

©Borgis

*Agnieszka Galanty, Paulina Koczurkiewicz, Dorota Burakowska, Zbigniew Janeczko

Aktywność biologiczna i farmakologiczna kwasu usninowego

Katedra Farmakognozji Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Kierownik Katedry: prof. dr hab. Zbigniew Janeczko

BIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF USNIC ACID

SUMMARY

Usnic acid is one of the most known and extensively studied lichen secondary metabolites. It was found only in lichen species, especially from the genus Cladonia, Usnea, Lecanora, Ramalina, Evernia or Parmelia. The compound is a yellow, crystal dibenzofurane derivative (2,6-diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl-1,3(2H,9bH)-dibenzo-furandione), easily dissolved in organic solvents but not in water. As a pure compound it can be found in toothpaste and deodorants, where it reveals antimicrobial properties. Usnic acid has been shown also antiviral, antiprotozoal, cytotoxic and antiproliferative, anti-inflammatory and analgesic activity. Some differences in biological and pharmacological activity can be sometimes observed between the two enantiomers of the compound. Usnic acid is also used for weight reduction, but with dangerous side effects. In this review the emphasis is on the biological and pharmacological activity of usnic acid and also on its pharmacokinetics and some toxic effects.

KEY WORDS: USNIC ACID – CYTOTOXIC
– ANTIMICROBIAL – ANTI-INFLAMMATORY

Wprowadzenie

Kwas usninowy jest najbardziej znanym i opisywanym metabolitem porostowym. Pierwsze doniesienia o tym związku sięgają roku 1844, kiedy to Knop opisał izolację tego związku i jego podstawowe własności fizykochemiczne (1). Związek ten badany jest pod kątem potencjalnego wykorzystania w farmacji, biotechnologii, kosmetologii, a nawet rolnictwie.

Kwas usninowy jest związkiem izolowanym jak dotąd wyłącznie z porostów. Występuje w wielu rodzajach i rodzajach porostów, najczęściej rozpowszechniony jest w rodzajach *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina*, *Evernia*, *Parmelia* i *Alectoria* (1). Zawartość tego związku w różnych gatunkach waha się od 0,006% w *Parmelia sooredians* (2) do 5,30% w *Flavocetraria nivalis* (3).

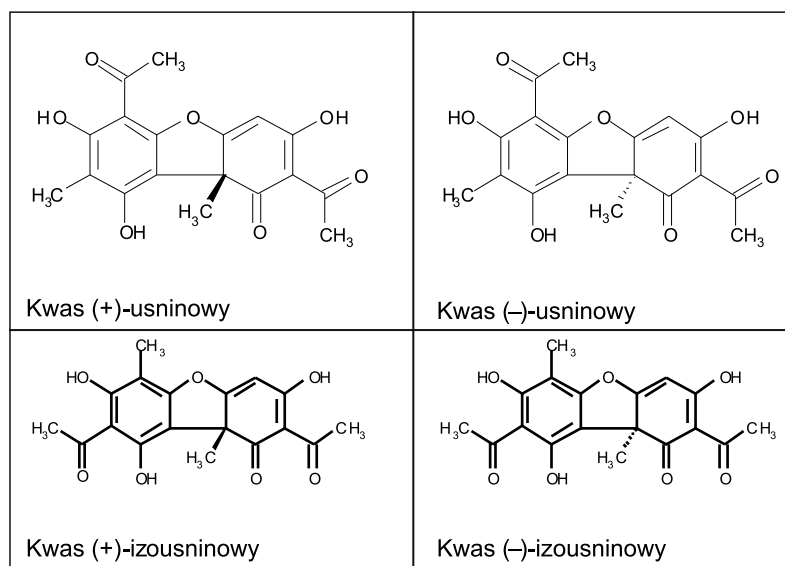
niony jest w rodzajach *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina*, *Evernia*, *Parmelia* i *Alectoria* (1). Zawartość tego związku w różnych gatunkach waha się od 0,006% w *Parmelia sooredians* (2) do 5,30% w *Flavocetraria nivalis* (3).

Własności fizykochemiczne

Kwas usninowy jest pochodną dibenzofuranu (2,6-diacetylo-7,9-dihydroksi-8,9b-dimetylo-1,3(2H,9bH)-dibenzo-furandion), o wzorze sumarycznym $C_{18}H_{16}O_7$. Jest to krystaliczna, żółta substancja, optycznie czynna, o temperaturze topnienia 203-204°C (4). Występuje w formie dwóch enancjomerów, różniących się położeniem grupy metylowej w pozycji 9b (5). Poza enancjomerami kwasu usninowego, w porostach występują również inne izomery: kwas (+)- i (-)-izousinowy (ryc. 1).

Kwas usninowy rozpuszcza się dobrze w benzenie, chloroformie, alkoholu amylovym i lodowatym kwasie octowym, jest słabo rozpuszczalny w etanolu, eterze naftowym i eterze dietylowym, natomiast nierozpuszczalny w wodzie (6). Do celów badania aktywności biologicznej i farmakologicznej *in vitro* niektórzy autorzy wskazują na 2-hydroksypropylo-β-cyklodekstrynę jako optymalny rozpuszczalnik (7). Biogenetycznie kwas usninowy wywodzi się ze szlaku acetylo-polimalynolowego.

Syntezy kwasu usninowego dokonali w 1956 roku Barton i wsp. (8) poprzez oksydacyjne sprzężenie metylofluoroacetofenonu z żelazocyjankiem potasu. Uzyskany w ten sposób dimer acetylowano do postaci dioctanu kwasu usninowego, który po hydrolizie dał kwas usninowy. Proces ten opisano dla obu enancjomerów (8). Udowodniono również, że kwas usninowy może być wytwarzany w warunkach *in vitro* przez hodowlę tkankowe *Cladonia substellata* (9).



Ryc. 1. Enancjomery kwasu usninowego i izousninowego.

Aktywność biologiczna i farmakologiczna

Aktywność przeciwbakteryjna

Aktywność przeciwbakteryjną *in vitro* kwasu usninowego zbadano wobec szeregu szczepów bakterii zarówno Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. W większości przypadków przedmiotem badań był enancjomer (+) (10-16), w jednej pracy opisano aktywność kwasu (-)-usninowego (17), a w innej porównano aktywność obu enancjomerów (18). Zestawienie aktywności przeciwbakteryjnej kwasu usninowego przedstawia tabela 1.

Kwas usninowy wykazał zróżnicowaną, od słabej po umiarkowaną, aktywność przeciwbakteryjną zarówno wobec szczepów Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Aktywność obydwu enancjomerów była identyczna w przypadku szczepów *Clostridium*, *Propionibacterium* i *Staphylococcus*; wobec szczepów *Bacillus* i *Aeromonas* kwas (-)-usninowy wykazał wyższą aktywność od enancjomeru (+), natomiast w pozostałych przypadkach kwas (+)-usninowy był bardziej aktywny.

Interesujący przykład praktycznego wykorzystania aktywności przeciwbakteryjnej kwasu usninowego opisali Francolini i wsp. (19). Badali on wpływ kwasu usninowego na adhezję bakterii na powierzchni polimerów, z których tworzone są urządzenia i drobny sprzęt medyczny. W tym celu dodawano kwas usninowy do poliuretanu, a następnie określano jego zdolność do hamowania powstawania biofilmu bakteryjnego (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) na jego powierzchni. Jako kontrolę stosowano poliuretan bez dodatku kwasu usninowego. Zabieg

dodania kwasu usninowego nie spowodował istotnego zmniejszenia adhezji komórek bakterii do poliuretanu, natomiast wykazywał aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii już przylegających. W przypadku biofilmu wytworzonego przez *Pseudomonas aeruginosa*, kwas usninowy powodował wyraźne zmiany w strukturze warstwy bakteryjnej (19).

Aktywność przeciwwirusowa

Kwas usninowy w nielicznych badaniach wykazał słabą aktywność przeciwwirusową wobec wirusów HSV (*Herpes simplex* typu 1) i PSV1 (wirus polio typu 1), powodując ponad 4-milimetrową strefę zahamowania wzrostu w stężeniu 30 μg /krążek, a w przypadku wirusa HSV również w stężeniu 7,5 μg /krążek (11). W kilku przypadkach opisano wpływ kwasu usninowego na enzymy wirusowe, takie jak integraza czy odwrotna transkryptaza, jak również badano wpływ tego związku na kwasy nukleinowe mysiego wirusa polio. Stwierdzono, że kwas usninowy wykazywał słabą aktywność hamującą aktywność integrazy wirusa HIV-1; wartość IC_{50} wynosiła 126,4 μM (20), natomiast w stężeniu 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nie wykazał aktywności hamującej wobec odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1 (12).

Jedno doniesienie opisuje badanie wpływu kwasu usninowego, podawanego łącznie z siarczanem cynku, u 100 pacjentek cierpiących na zakażenie układu płciowego wirusem brodawczaka HPV, będących po zabiegach chirurgicznych. Pacjentki podzielono na trzy grupy: kontrolną, nieotrzymującą żadnych środków po leczeniu chirurgicznym, grupę otrzymującą dopochwowo kwas usninowy i siarczan cynku przed zabiegiem

Tabela 1. Aktywność przeciwbakteryjna *in vitro* kwasu usninowego.

Szczep	Aktywność kwasu (+)-usninowego	Aktywność kwasu (-)-usninowego	Pozycja piśmiennictwa
<i>Aeromonas hydrophila</i>	–	MIC 1,2 µg	17
	na	–	16
<i>Bacillus cereus</i>	MIC 6,9 µg/ml	–	23
	–	MIC 0,15 µg	17
	na	–	16
<i>Bacillus megaterium</i>	MIC 7,7 µg/ml	–	23
	IZ 10 mm (50 µg)	–	12
<i>Bacillus subtilis</i>	–	MIC 0,61 µg	17
	MIC 6,3 µg/ml	–	23
	IZ 23 mm (250 µg)	–	14
	IZ 10 mm (60 µg)	–	11
	na	–	15
	MIC 0,036 mmol	–	16
<i>Bacteroides thetaiotamicron</i>	MIC 4 µg/ml	MIC 8 µg/ml	18
<i>Bacteroides vulgatus</i>	MIC 4 µg/ml	MIC 8 µg/ml	18
<i>Bacteroides fragilis</i>	MIC 2 µg/ml	MIC 1 µg/ml	18
<i>Bacteroides ruminicola</i> ssp. <i>brevis</i>	MIC 8 µg/ml	MIC 16 µg/ml	18
<i>Bacteroides loeschii</i>	MIC 2 µg/ml	MIC 2 µg/ml	18
<i>Clostridium perfringens</i>	MIC 4 µg/ml	MIC 4 µg/ml	18
<i>Enterococcus faecalis</i>	MIC 4-8 µg/ml	MIC 4-16 µg/ml	18
<i>Enterococcus faecium</i>	MIC 4-16 µg/ml	MIC 4-16 µg/ml	18
<i>Escherichia coli</i>	MIC 4,9 µg/ml	–	23
	na	–	11
	na	–	12
	IZ 5 mm (250 µg)	–	14
	na	–	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	na	–	16
<i>Listeria monocytogenes</i>	–	MIC 0,31 µg	17
	MIC 0,018 mmol	–	16
<i>Mycobacterium aurum</i>	MIC 32 µg/ml	–	13
<i>Propionibacterium acnes</i>	MIC 2 µg/ml	MIC 2 µg/ml	18
<i>Proteus vulgaris</i>	–	MIC 0,15 µg	17
	MIC 0,036 mmol	–	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MIC 5,2 µg/ml	–	23
	na	–	11
	IZ 5 mm (250 µg)	–	14
	na	–	16
<i>Pseudomonas syringae</i>	na	–	16
<i>Salmonella choleraesuis</i>	MIC 6,3 µg/ml	–	23
<i>Salmonella enterica typhi</i>	MIC 8,2 µg/ml	–	23
<i>Salmonella enterica typhimurium</i>	MIC 5,4 µg/ml	–	23
<i>Salmonella typhimurium</i>	na	–	16
<i>Sarcina lutea</i>	MIC 19,1 µg/ml	–	23
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC 8,3 µg/ml	–	23
	–	MIC 2,4 µg	17
	MIC 6,06 µg/ml	–	15
	MIC 0,15 mmol	–	16
	MIC 2-16 µg/ml	MIC 2-16 µg/ml	18
<i>Streptococcus faecalis</i>	–	MIC 0,15 µg	17
	MIC 0,073 mmol	–	16
<i>Yersinia enterocolitica</i>	MIC 0,018 mmol	–	16

MIC – minimalne stężenie hamujące, IZ – strefa zahamowania, na – nieaktywny

i po zabiegu chirurgicznym oraz trzecią grupę, otrzymującą te związki tylko po zabiegu. Oceniano stan uszkodzeń wywołanych wirusem po 1, 2, 3 i 6 miesiącach od zabiegu. W obu grupach otrzymujących kwas usninowy i siarczan cynku zaobserwowano lepsze gojenie się nabłonka dróg rodnych w odniesieniu do grupy kontrolnej; zjawisko to było proporcjonalne do upływającego czasu. W grupie drugiej, której podawano oba związki przed zabiegiem i po zabiegu, reepitelizacja była bardziej efektywna i obejmowała krótszy czas w porównaniu do grupy trzeciej (21).

Aktywność przeciwgrzybicza

Aktywność przeciwgrzybiczą kwasu usninowego zbadano wobec szeregu szczepów, będących zarówno patogenami ludzkimi, jak i roślinnymi, a także wobec gatunków niepatogennych. W większości przypadków badano kwas (+)-usninowy (11, 12, 14-16, 22), jedna praca dotyczyła aktywności kwasu (-)-usninowego (17). Obydwa enancjomery charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością przeciwgrzybiczą wobec większości badanych szczepów, od słabej (11, 12, 14) poprzez umiarkowaną (22), po wysoką (16, 17).

Zestawienie aktywności przeciwgrzybiczej kwasu usninowego przedstawiono w tabeli 2.

Aktywność przeciwpierwotniakowa

Aktywność przeciwpierwotniakową kwasu usninowego zbadano w warunkach *in vitro* wobec *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* oraz *Leishmania amazonensis*. Wobec ostatniego gatunku aktywność kwasu usninowego zbadano również *in vivo*, na modelu mysim.

W badaniach *in vitro* kwas usninowy wykazał aktywność hamującą wzrost pierwotniaka *Trypanosoma cruzi* w zakresie stężeń od 10 do 50 $\mu\text{g/ml}$ (23). Zarówno kwas (+)-usninowy, jak i (-)-usninowy wykazały słabą aktywność przeciwpierwotniakową wobec *Plasmodium falciparum*; wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio 15,3 i 16,1 μmol , podczas gdy dla substancji referencyjnej (chlorochina) aktywność ta wynosiła 0,089 μmol (24). W badaniu innych autorów kwas usninowy w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ nie wykazał aktywności przeciwmalarycznej (12). Kwas (+)-usninowy, izolowany z *Protosnea malacea*, odznaczał się aktywnością przeciwpierwotniakową wobec *Leishmania amazonensis* w stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$ (25).

Tabela 2. Aktywność przeciwgrzybicza *in vitro* kwasu usninowego.

Szczep	Aktywność kwasu (+)-usninowego	Aktywność kwasu (-)-usninowego	Pozycja piśmiennictwa
<i>Alternaria brassicicola</i>	MIC 32,1 $\mu\text{g/ml}$	-	23
<i>Aspergillus flavus</i>	MIC 20,1 $\mu\text{g/ml}$	-	23
<i>Aspergillus nidulans</i>	MIC 14,3 $\mu\text{g/ml}$	-	23
<i>Aspergillus niger</i>	MIC 5,8 $\mu\text{g/ml}$ IZ 5 mm (250 μg)	- -	23 14
<i>Aspergillus ochraceus</i>	MIC 11,3 $\mu\text{g/ml}$	-	23
<i>Aspergillus sojae</i>	MIC 6,4 $\mu\text{g/ml}$	-	23
<i>Candida albicans</i>	MIC 21,4 $\mu\text{g/ml}$ IZ 1 mm (60 μg) MIC 0,002 mmol -	- - - MIC 0,15 μg	23 11 16 17
<i>Candida glabrata</i>	MIC 29,2 $\mu\text{g/ml}$ MIC 0,002 mmol -	- - MIC 0,15 μg	23 16 17
<i>Candida krusei</i>	MIC 30,1 $\mu\text{g/ml}$	-	23
<i>Candida tropicalis</i>	MIC 20,9 $\mu\text{g/ml}$	-	23
<i>Eurotium repens</i>	IZ 1 mm (50 μg)	-	12
<i>Fusarium moniliforme</i>	MIC 18,6 $\mu\text{g/ml}$	-	23
<i>Fusarium oxysporum</i>	na	-	12
<i>Mycotypha microspora</i>	IZ 3 mm (50 μg)	-	12
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	na	-	15
<i>Trichoderma viridae</i>	MIC 14,2 $\mu\text{g/ml}$	-	23
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	MIC 18,0 $\mu\text{g/ml}$ IZ 5 mm (60 μg)	- -	23 11
<i>Ustilago violacea</i>	IZ 1mm (50 μg)	-	12

MIC – minimalne stężenie hamujące, IZ – strefa zahamowania, na – nieaktywny

W badaniach *in vivo* kwas (+)-usninowy w stężeniu 25 mg/kg masy ciała podawano myszom zakażonym *Leishmania amazonensis*, dwa razy dziennie przez 15 dni (doustnie), raz dziennie przez 15 dni (podskórnie) lub w pięciu iniekcjach z 4-dniowymi przerwami, bezpośrednio w zakażone miejsce. Kwas usninowy podawany miejscowo, bezpośrednio w miejsce zakażenia, wykazał znaczący efekt zmniejszający obszar zakażenia o 43,34% oraz liczbę pasożytów o 72,28%, w porównaniu do grupy nieotrzymującej żadnego środka. Podawanie badanego związku pozostałymi drogami nie dało efektów (25).

Działanie fotoochronne

Kwas usninowy został również zbadany pod kątem potencjalnych własności fotoochronnych zarówno na modelach zwierzęcych (26), jak i na zdrowych ochotnikach, u których porównywano aktywność tego związku, chroniącą przed wpływem promieniowania UV, z działaniem kosmetyku stosowanego jako filtr przeciwsłoneczny (27).

W badaniach przeprowadzonych na świnkach morskich wykazano wysoką aktywność fotoochronną kwasu usninowego podawanego w ilości 2 mg/cm² skóry pozbawionej włosów – wyliczona wartość czynnika SPF wynosiła 8,0 ± 0,15, podczas gdy standardowy związek wykazał SPF = 4,3 ± 0,20 (26).

Badania aktywności fotoochronnej kwasu usninowego w warunkach *in vivo* przeprowadzono na 5 zdrowych ochotnikach. Kwas usninowy w stężeniu 2,5 x 10⁻² mol rozpuszczono w mieszaninie glikolu propylenowego i chloroformu (1:1), a następnie nanoszono na niewielki (12 cm²) fragment skóry pleców ochotników. Po odparowaniu chloroformu naniesiony roztwór tworzył cienką warstwę na skórze, którą nawiświatlano promieniami UV 295-340 nm. Kwas usninowy wykazał aktywność porównywalną z działaniem Nivea Sun Spray LSF 5; wyliczone średnie wartości czynnika UVP (ochrona przed promieniowaniem UV) wynosiły odpowiednio 4,1 i 4,2 (27).

Aktywność przeciwzapalna, przeciwbólowa i przeciwgorączkowa

Aktywność przeciwzapalna kwasu usninowego została przebadana zarówno w warunkach *in vitro* (29), jak i na modelu zwierzęcym (29). Prace o podobnym charakterze opisują wpływ przeciwbólowy i przeciwgorączkowy (30) kwasu usninowego w badaniach na zwierzętach. Kwas usninowy wykazywał aktywność porównywalną ze stosowanymi w eksperymentach substancjami referencyjnymi.

W badaniach nad aktywnością przeciwzapalną kwasu usninowego *in vitro* makrofagi RAW264.7, stymulowane lipopolisacharydem (LPS) w celu wytwarzania

czynnika martwicy nowotworów (TNF-α) oraz tlenku azotu (NO), inkubowano z badanym związkiem (1-20 μmol) przez 24 h. Kwas usninowy obniżał poziom TNF-α w sposób zależny od dawki; wartość IC₅₀ wynosiła 12,8 μmol. Badany związek hamował także wytwarzanie tlenku azotu; wartość IC₅₀ wynosiła 4,7 μmol. Ponadto kwas usninowy hamował wyraźnie syntezę enzymu odpowiedzialnego za wytwarzanie tlenku azotu (iNOS) oraz obniżał poziom czynnika transkrypcji NF-κB (28).

W badaniach *in vivo* kwas usninowy podawano szczurom w dawkach 25, 50 i 100 mg/kg m.c., z wcześniej wywołanym ostrym (obrzęk łapy wywołany karageniną) i przewlekłym (test zwitka waty) stanem zapalnym. Badany związek wywoływał zmniejszenie obrzęku łapy szczura we wszystkich dawkach, jednak w najwyższej podanej dawce efekt był porównywalny z substancją referencyjną (ibuprofen, 100 mg/kg m.c.). W przypadku stanu przewlekłego, kwas usninowy zmniejszał masę powstającej ziarniny w sposób zależny od dawki. Aktywność ta, w najwyższej podanej dawce, była również porównywalna z substancją referencyjną (29).

Okuyama i wsp. (30) badali aktywność przeciwbólową i przeciwgorączkową kwasu usninowego u myszy. Aktywność przeciwbólową badano za pomocą testu wicia oraz testu ściskania ogona. Kwas usninowy podawano doustnie w dawkach 30 i 100 mg/kg m.c. (aktywność przeciwbólowa) oraz 100 i 300 mg/kg m.c. (aktywność przeciwgorączkowa). Badany związek wykazał aktywność przeciwbólową w obu podanych dawkach, powodując zmniejszenie w teście wicia zwierząt odpowiednio o 50 i 40%, a także długotrwały efekt przeciwbólowy w teście ściskania ogona. Kwas usninowy w obydwu badanych dawkach miał także efekt przeciwgorączkowy, powodując spadek temperatury odpowiednio o 1 i 2,5°C w przeciągu 4 godzin od podania (30).

Aktywność cytotoksyczna

Kwas usninowy był intensywnie badany także pod kątem aktywności cytotoksycznej. Pierwsze doniesienia o jego wpływie na komórki nowotworowe pochodzą z końca lat 70. ubiegłego wieku, kiedy to Kupchan i Kopperman (31), a następnie Takai (32) badali jego aktywność *in vivo* w doświadczalnie wywołanym nowotworze płuc oraz białaczce u myszy. Co istotne, badanym związkiem był w obydwu przypadkach kwas (-)-usninowy. Późniejsze badania, przede wszystkim *in vitro*, dotyczyły w większości przypadków kwasu (+)-usninowego, jedynie w kilku pracach opisano aktywność cytotoksyczną kwasu (-)-usninowego (33-36). Zestawienie aktywności cytotoksycznej kwasu usninowego przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Aktywność cytotoksyczna kwasu usninowego.

Linia hodowlana komórek	Metoda	Aktywność kwasu (+)-usninowego	Aktywność kwasu (-)-usninowego	Pozycja piśmiennictwa
3LL	MTT	IC ₅₀ 23 ± 6,6 μmol	IC ₅₀ 35,1 ± 10,7 μmol IC ₅₀ 12,1 μg/ml	36 34
A2780	MTT	IC ₅₀ 75,9 ± 2,0 μmol	–	43
A431	CV, NRU	EC ₅₀ 39 μM, 72 μmol	–	40
A549	MTT	żywołność 85% w stężeniu 25 μg/ml (24 h)	żywołność 100% w stężeniu 25 μg/ml (24 h)	35
Capan-2	test ze znakowaną tymidyną	IC ₅₀ 5,3 μg/ml	IC ₅₀ 5,0 μg/ml	37
Du145	MTT	IC ₅₀ 57,4 ± 2,1 μmol	IC ₅₀ 45,9 ± 7,0 μmol IC ₅₀ 15,8 μg/ml	36 34
H1299	MTT	IC ₅₀ 22,3 μmol	–	41
HaCaT	liczenie pod mikroskopem kontrastowo-fazowym CV, NRU	IC ₅₀ 2,1 ± 0,7 μmol	–	39
		EC ₅₀ 35 μM, 76 μmol	–	40
HCT-116 p53 ^{-/-}	MTT	IC ₅₀ 143,1 ± 11,3 μmol	–	43
HCT-116 p53 ^{+/+}	MTT	IC ₅₀ 157,2 ± 4,0 μmol	–	43
HeLa	MTT	IC ₅₀ 14,9 μmol	–	14
		IC ₅₀ 178,3 ± 9,7 μmol	–	43
HEp-2	MTT	IC ₅₀ 12,6 μg/ml	–	47
hepatocyty szczurze	LDH	IC ₅₀ 25 μg/ml (8 h) 21 μg/ml (24 h)	–	15
HT-29	MTT	IC ₅₀ 99,7 ± 8,4 μmol	–	43
Jurkat	MTT	IC ₅₀ 76,3 ± 8,2 μmol	–	43
K-562	MTT	IC ₅₀ 52,8 ± 8,7 μmol	IC ₅₀ 21,8 ± 3,8 μmol	36
			IC ₅₀ 8,2 μg/ml	34
KB	?	ED ₅₀ 13 μg/ml	–	12
L1210	MTT Coulter Counter	IC ₅₀ 26,4 ± 8,5 μmol	IC ₅₀ 17,4 ± 1,4 μmol	36
			IC ₅₀ 6 μg/ml	34
			95% zahamowania w stężeniu 1,4 x 10 ⁻⁷ mol/ml (23 h)	33
limfocyty	test ze znakowaną tymidyną	wysoka aktywność	–	15
MCF7	MTT	IC ₅₀ 18,9 μmol IC ₅₀ 105,4 ± 16 μmol IC ₅₀ 94,6 ± 7,9 μmol	–	41
			IC ₅₀ 51,7 ± 7,3 μmol	36
			IC ₅₀ 17,8 μg/ml	34
			–	43
MDA-MB-231	MTT	IC ₅₀ 22,3 μmol	–	41
MM98	CV, NRU	EC ₅₀ 23 μM, 64 μmol	–	40
P388	MTT	IC ₅₀ 16 μg/ml	–	11
Panc-1	test ze znakowaną tymidyną	EC ₅₀ 4,3 μg/ml	–	7
PC-3	test ze znakowaną tymidyną	EC ₅₀ 8,2 μg/ml	–	7
SK-BR-3	MTT	IC ₅₀ 199,2 ± 18,8 μmol	–	43
T-47D	test ze znakowaną tymidyną	EC ₅₀ 2,9 μg/ml	–	7
		IC ₅₀ 4,2 μg/ml	IC ₅₀ 4,0 μg/ml	37
U251	MTT	IC ₅₀ 19,5 ± 1,6 μmol –	IC ₅₀ 19,7 ± 4,6 μmol	36
			IC ₅₀ 6,8 μg/ml	34
V79	MTT	żywołność 60% w stężeniu 25 μg/mL (24 h)	żywołność 90% w stężeniu 25 μg/ml (24 h)	35

Linie zwierzęce: białaczka (L1210, P388); nowotwór płuc Lewisa 3LL; komórki nabłonkowe płuc V79
 Linie ludzkie: nowotwór sutka (T-47D, MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3); nowotwór jajnika A2780; nowotwór trzustki (Panc-1, Capan-2); nowotwór jelita grubego (HT-29, HCT-116 p53^{+/+} i ^{-/-}); nowotwór prostaty (PC-3, Du145); białaczka (HL-60, Jurkat); nowotwór nosogardzieli KB; nowotwór krtani HEp-2; nowotwór płuc (A549, H1299); nowotwór macicy HeLa; glejak U251; gwiaździak U373 MG; międzybłoniak MM98; nowotwór sromu A431; keratynocyty HaCaT

Metody: CV – test krystalicznego fioletu; NRU – test pobierania czerwieni obojętnej; MTT – test redukcji soli tetrazoliowych

Kwas usninowy był aktywny również wobec komórek prawidłowych, jednak w większości przypadków była to aktywność bardzo niska lub umiarkowana (34, 37). Natomiast w badaniu Kumara i Müllera (38) zaobserwowano wysoką aktywność antyproliferacyjną kwasu usninowego wobec prawidłowych keratynocytów linii HaCaT ($IC_{50} 2,1 \pm 0,7 \mu\text{mol}$), połączoną z brakiem wpływu na integralność ich błon komórkowych. Wynik ten może mieć jednak znaczenie w kontekście schorzeń przebiegających z nadmiernym podziałem komórek naskórka, np. łuszczycy, stąd hamujący wpływ kwasu usninowego na proliferację komórek prawidłowych w tym przypadku można uznać za korzystny. W innych badaniach nad keratynocytami (39) kwas usninowy wykazał wysoką aktywność stymulującą gojenie się rany powstałej poprzez mechaniczne zadrapanie warstwy keratynocytów, rosnących w hodowli zlewnej.

Określenie mechanizmu działania cytotoksycznego

Nieliczne prace podejmują próbę opisanie mechanizmu działania cytotoksycznego kwasu usninowego, przy czym w większości dotyczą one enancjomeru (+) (33-37, 40-42), jedno doniesienie porównuje działanie obydwu enancjomerów (34). Prace te wskazują głównie na stymulację procesu apoptozy jako drogi działania kwasu usninowego (33-37, 40, 42), rzadziej nekrozy (36); pojedyncze doniesienia mówią o wywoływaniu zmian w mikrotubulach (41).

Doniesienia na temat stymulacji procesu apoptozy przez kwas usninowy są sprzeczne, dwie spośród cytowanych prac wykazują brak tego wpływu (36, 37), natomiast pozostałe cztery stwierdzają wyraźne znamiona zmian apoptotycznych w badanych liniach komórkowych (33-35, 42). Prace niewskazujące na proapoptotyczną aktywność kwasu usninowego dotyczą badań zarówno na komórkach prawidłowych (szczurze hepatocyty), jak i nowotworowych (ludzkie nowotwory sutka i trzustki). Co istotne, w pracach wykluczających i wskazujących na proces apoptozy pod wpływem badanego związku, zastosowano podobną metodykę (cytometr przepływowy, aktywność kaspazy-3, fragmentacja jąder komórkowych). Wskazywać to może na selektywne działanie kwasu usninowego jako stymulatora procesu apoptozy, w zależności od rodzaju użytych komórek i innych czynników. Pojawianie się fragmentacji jąder komórkowych, wzrost aktywności kaspazy-3 czy spadek potencjału błon mitochondrialnych pod wpływem badanego związku, mogą wskazywać na ścieżkę wewnętrzną procesu apoptozy, czego jednak nie potwierdzają badania Mayera i wsp. (40), niewykazujące wpływu kwasu usninowego na wzrost poziomu białek p53.

Correche i wsp. (37) określali wpływ kwasu usninowego na stymulację aktywności kaspazy-3, enzymu pojawiającego się we wczesnych stadiach apoptozy, w szczurzych hepatocytach, metodą DTT. Badano także potencjalną fragmentację DNA w tych komórkach pod wpływem kwasu usninowego, z wykorzystaniem cytometru przepływowego. Badany związek nie wpływał na aktywność kaspazy-3, nie wywoływał również fragmentacji DNA, co wskazuje na brak efektu apoptotycznego.

Einarsdottir i wsp. (36) wykazali aktywność antyproliferacyjną kwasu (+)-usninowego wobec komórek nowotworu sutka T-47D oraz nowotworu trzustki Capan-2 w badaniu z użyciem cytometru przepływowego. Komórki poddane działaniu kwasu usninowego w mniejszym stopniu wchodziły w fazę S cyklu komórkowego, a w jeszcze mniejszym stopniu w fazę G2/M. Po 24 h inkubacji komórek z $20 \mu\text{g/ml}$ kwasu usninowego nie wykazano procesu apoptozy (z wykorzystaniem metody TUNEL). W kolejnym etapie doświadczeń zbadano wpływ kwasu usninowego w stężeniach 5 i $10 \mu\text{g/ml}$ na wywoływanie nekrozy w badanych komórkach metodą LDH, po inkubacji przez 24 i 48 h. Nekroza została zaobserwowana jedynie w komórkach Capan-2, w sposób zależny od dawki i czasu inkubacji. W ostatnim etapie określono wpływ badanego związku w stężeniach 5 i $10 \mu\text{g/ml}$ na potencjał błonowy mitochondriów obu linii komórkowych. Zaobserwowano wyraźny spadek potencjału błonowego pod wpływem kwasu usninowego, zwłaszcza w stężeniu $10 \mu\text{g/ml}$, a efekt był porównywalny z substancją referencyjną CCCP.

Bačkorová i wsp. (42) opisali zróżnicowaną odpowiedź ludzkich komórek nowotworowych na działanie kwasu usninowego. Badania przeprowadzono na 4 liniach nowotworowych: jajnika (A2780), jelita grubego (HCT-116 p53^{+/+} i ^{-/-}) oraz białaczce (HL-60), określając wpływ kwasu usninowego na stymulację procesu apoptozy z wykorzystaniem cytometru przepływowego. Kwas usninowy w dawce 50 i $100 \mu\text{mol}$ powodował zatrzymanie komórek w fazie S, w sposób zależny od czasu inkubacji (48, 72 h), przy czym wyraźniejszą odpowiedź zaobserwowano w przypadku komórek nowotworu jajnika oraz białaczki. Linia komórek nowotworu jajnika była najbardziej podatna na proapoptotyczne działanie kwasu usninowego. Efekt ten został potwierdzony ponadto w analizie morfologii jąder komórkowych barwionych metodą DAPI.

W badaniach Koparala i wsp. (34) obydwa enancjomery powodowały stymulację procesu apoptozy w limfocytach (zwierzęcych komórkach nabłonkowych płuc) oraz ludzkich komórkach nowotworu płuc. Kwas (-)-usninowy był bardziej aktywny (zakres

stężen 25-30 $\mu\text{g/ml}$) niż (+)-usninowy (zakres stężen > 50 $\mu\text{g/ml}$).

Wpływ kwasu usninowego na stymulację procesu apoptozy w komórkach zwierzęcych białaczki L1210 określano wstępnie, barwiąc jądra komórkowe barwnikiem Hoechst, a następnie określając fazy cyklu komórkowego za pomocą cytometru przepływowego. Komórki inkubowane przez 24 i 48 h z badanym związkiem o stężeniu 6, 9 i 12 $\mu\text{g/ml}$, obserwowane pod mikroskopem fluorescencyjnym, wykazywały zmiany morfologii, typowe dla procesu apoptozy: kondensację chromatyny jądrowej, fragmentację jąder komórkowych i tworzenie ciałek apoptotycznych. Liczba komórek apoptotycznych w różnych stężeniach kwasu usninowego wynosiła odpowiednio 9,6; 14,1 i 44,4% po 24 h i 11,9; 29,1 i 63,2% po 48 h inkubacji, podczas gdy etopozyd w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ powodował pojawienie się odpowiednio 47,4 i 52,7% komórek apoptotycznych. Efekt ten został potwierdzony w badaniu z użyciem cytometru przepływowego: zaobserwowano dodatkowy pik sub-G1, przed pikiem G0-G1.

Kwas (+)-usninowy i jego pochodna dioctanowa zostały przebadane pod kątem wywołania procesu apoptozy w komórkach linii L1210 przez Bazina i wsp. (35). Zdolność ta była mierzona poprzez barwienie jąder komórkowych barwnikiem Hoechst i obserwacje mikroskopowe wybarwionych komórek, jak również poprzez pomiar aktywności kaspazy-3 w badanych komórkach. Obydwa badane związki wykazały zdolność do indukowania apoptozy, w sposób zależny od dawki (kwas usninowy: 17, 26, 35 μmol , pochodna: 3, 4,5, 6 μmol , etopozyd 1,7 μmol) i czasu inkubacji (24, 48 h), powodując pojawienie się 30-35% (kwas usninowy) i 35-38% (pochodna) komórek apoptotycznych, podczas gdy pod wpływem etopozydu powstawało 47% komórek apoptotycznych. Po 48 h zmierzono także aktywność kaspazy-3, markera apoptozy, i zaobserwowano wzrost aktywności tego enzymu pod wpływem obydwu badanych związków.

Mayer i wsp. (40) w komórkach nowotworowej linii MCF7 określali poziom białek p53 i p21 po 24 h inkubacji z 29 μmol stężeniem kwasu usninowego. Nie zaobserwowano wzrostu poziomu badanych białek pod wpływem kwasu usninowego, poziom ich był porównywalny do warunków kontrolnych. Co więcej, nie zaobserwowano również fosforylacji białka p53 na fragmencie Ser15, co świadczy o braku uszkodzenia DNA w komórkach poddanych działaniu kwasu usninowego. Dodatkowo autorzy zbadali wpływ kwasu usninowego w stężeniach 3,6; 7,25; 14,5 i 29 μmol na aktywność transkrypcyjną p53 w mysich fibroblastach T22. Nie zaobserwowano istotnego wzrostu transkrypcji białka pod wpływem badanego związku;

w najwyższym stężeniu wzrost ten wynosił 0,49%, podczas gdy substancja referencyjna (aktynowycyna D) w stężeniu 60 ng/ml, będąca aktywatorem transkrypcji p53, powodowała wzrost transkrypcji białka o 9,25%. Sugeruje to brak wpływu kwasu usninowego na proces apoptozy (40).

Jedną zaledwie pracą dotyczy wpływu kwasu usninowego na elementy cytoszkieletu komórkowego – mikrotubule. Rola mikrotubul w komórkach dotyczy przede wszystkim podziałów mitotycznych, lecz także ruchów komórek i sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, stąd praca ta jest niezwykle istotna, tym bardziej, iż ma charakter pionierski w badaniach nad aktywnością kwasu usninowego. O'Neill i wsp. (41) badali wpływ kwasu usninowego w stężeniu 29 μmol na mikrotubule w ludzkich komórkach nowotworu sutka MCF7 oraz nowotworu płuc H1299. Jako kontrole stosowano taksoł (stabilizujący mikrotubule) i winkrystynę (hamującą polimeryzację mikrotubul). Komórki inkubowano z badanym związkiem przez 4 i 24 h, a ze związkami kontrolnymi w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ przez 4 h, a następnie wybarwiano komórki barwnikiem FITC. Nie zaobserwowano żadnych zmian w mikrotubulach w komórkach traktowanych kwasem usninowym, co świadczy o braku wpływu tego związku na mikrotubule.

Określenie potencjalnego mechanizmu wpływu kwasu usninowego na komórki nowotworowe wymaga zatem dalszych badań na poszerzonym zakresie linii komórkowych.

Aktywność antymitotyczna

Aktywność antymitotyczna kwasu usninowego była określana przez różnych autorów z zastosowaniem testu *Allium* (43-45). We wszystkich przeprowadzonych badaniach kwas (+)-usninowy wykazał bardzo silną aktywność hamującą podział i wzrost korzeni, w bardzo niskich stężeniach (0,0004%, 100 ppm). Aktywność kwasu (-)-usninowego, opisana w jednym tylko badaniu (45), była nieco słabsza (0,25; 2,5 $\mu\text{g/ml}$). Podobnie wysoką aktywnością, co związek macierzysty, charakteryzowała się sól sodowa kwasu usninowego.

Aktywność przeciwnowotworowa

Nieliczne badania opisują aktywność kwasu usninowego wobec eksperymentalnie wywołanych nowotworów w modelach zwierzęcych (31, 32, 46). Najwcześniejsze badania dotyczą aktywności kwasu (-)-usninowego (31, 32), natomiast późniejsze dotyczą enanajomeru kwasu (+)-usninowego (46). Kwas (-)-usninowy nie wywoływał znaczącego wydłużenia przeżywalności zwierząt z wszczepionym nowotworem (31, 32), natomiast kwas (+)-usninowy powodował wyraźne zmniejszenie guza, nie powodując jednocześnie

zmian w pozostałych, zdrowych organach. Co istotne, kwas usninowy podany w postaci mikrokapsułek był znacznie bardziej aktywny od związku podanego w postaci wolnej (46).

Kupchan i Kopperman (31) określali aktywność przeciwnowotworową kwasu (-)-usninowego wobec doświadczalnie wywołanego nowotworu płuc Lewisa u myszy. Kwas usninowy, podawany w dawkach 20-200 mg/kg m.c., wywoływał zwiększenie przeżywalności zwierząt o 13-15%. Podobnie, kwas (-)-usninowy (32) podawany dootrzewnowo myszom z eksperymentalnie wszczepioną białaczką P388 w dawce 100 mg/kg m.c. przez 9 kolejnych dni wywoływał wydłużenie przeżywalności zwierząt o 14%. Żadna z 18 półsyntetycznych pochodnych kwasu usninowego, przebadanych w tym eksperymencie, nie była bardziej aktywna.

Ribeiro-Costa i wsp. (46) określali aktywność przeciwnowotworową kwasu usninowego u myszy z wszczepionym mięsakiem Sarcoma 180. Myszom po 24 h od wszczepienia nowotworu podawano dootrzewnowo badany związek, w postaci wolnej lub w mikrokapsułkach, w dawce 15 mg/kg masy ciała przez 7 dni. Następnie określano masę guza oraz analizowano histopatologicznie organy wewnętrzne (wątroba, nerki, śledziona). Aktywność przeciwnowotworowa kwasu usninowego podanego w postaci mikrokapsułek była wyższa niż wolnego związku i wynosiła odpowiednio 63 i 42% zahamowania wzrostu guza. Analiza histopatologiczna nie wykazała zmian w badanych organach wewnętrznych pod wpływem żadnej z badanych postaci kwasu usninowego. Podobne badania przeprowadzone przez Santos i wsp. (47) również wykazały zmniejszenie wzrostu guza u myszy pod wpływem kwasu usninowego podanego w formie nanokapsułek, w porównaniu do wolnego związku.

Farmakokinetyka i metabolizm

Bardzo niewiele danych opisuje losy kwasu usninowego w organizmie (48-50). Badania te ograniczone są do eksperymentów *in vitro* (48) oraz na zwierzętach (49, 50). Badania *in vitro* wskazują na wpływ kwasu usninowego na niektóre podjednostki cytochromu P450, co może się wiązać z potencjalnymi interakcjami lekowymi (48). Wyniki badań wskazują na stosunkowo dobrą biodostępność kwasu usninowego oraz jego wolne wchłanianie z przewodu pokarmowego zwierząt po podaniu doustnym (49). Interesujące badania przeprowadzone przez autorów norweskich (50) dotyczyły degradacji kwasu usninowego przez florę bakteryjną w przewodzie pokarmowym reniferów.

Foti i wsp. (48) badali metabolizm kwasu usninowego *in vitro* w ludzkich hepatocytach oraz wątrobowej frakcji subkomórkowej. Kwas usninowy był metabolizowany do trzech monohydroksylowych pochodnych oraz dwóch koniugatów glukuronidowych, za pomocą odpowiednio cytochromu P450 (CYP) 1A2 oraz glukuronozylotransferazy urydynodifosforanu UGT1A1 i UGT1A3. Czas półtrwania kwasu usninowego w mikrosomach wątroby wynosił 19,3 min. W komórkach hepatocytów kwas usninowy w stężeniu 20 μmol nie indukował cytochromu CYP1A2, CYP2B6 i CYP3A4, w przeciwieństwie do substancji referencyjnych; odpowiednio omeprazolu, fenobarbitalu i rifampicyny. Badany związek był natomiast słabym inhibitorem CYP2D6 oraz umiarkowanym inhibitorem CYP2C19 ($\text{IC}_{50} = 9 \text{ nmol}$) i CYP2C9 ($\text{IC}_{50} = 94 \text{ nmol}$), a także CYP2C8 ($\text{IC}_{50} = 1,9 \mu\text{mol}$) i CYP2C18 (6,3 μmol). Wskazywać to może na potencjalne powodowanie interakcji kwasu usninowego z innymi lekami.

Krishna i Venkataramana (49) określali farmakokinetykę kwasu usninowego w badaniach na królikach. Zwierzętom podawano kwas usninowy w stężeniach 5 mg/kg m.c. (dożylnie) lub 20 mg/kg m.c. (doustnie) i pobierano krew natychmiast po podaniu oraz po 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36 i 48 h po podaniu dożylnym. W przypadku podania doustnego pobierano krew z pominięciem czasu 0,25 h od podania, natomiast krew pobierano dodatkowo po 8, 60 i 72 h po podaniu. Osocze oddzielano od krwi i analizowano ilościowo pod kątem obecności kwasu usninowego metodą HPLC. Poziom kwasu usninowego w osoczu po podaniu dożylnym miał charakter trójwykładniczy, ze średnim czasem półtrwania 10,7 h. Objętość dystrybucji w kompartmentcie centralnym oraz klirens systemowy wynosiły odpowiednio 43,9 ml/kg i 12,2 ml/h/kg. Po podaniu doustnym kwas usninowy osiągał najwyższe stężenie w osoczu, równe 32,5 $\mu\text{g/ml}$, w ciągu 12,2 h. Średnia absolutna biodostępność badanego związku po podaniu doustnym wynosiła 77,8%. Uzyskane wyniki sugerują dobrą biodostępność oraz powolne wchłanianie kwasu usninowego po podaniu doustnym.

Sundset i wsp. (50) określali metabolizm kwasu usninowego u reniferów karmionych przez 4 tygodnie plechami *Cladonia stellaris*, zawierającymi 9,1 mg/g kwasu usninowego. Dzienna ilość kwasu usninowego w diecie zwierząt wynosiła 91-117 mg/kg m.c. Po zakończeniu eksperymentu określano ilość kwasu usninowego w zawartości przewodu pokarmowego oraz tkankach wątroby i nerek, a także wcześniej pobranych próbkach odchodów, moczu i paszy. Kwas usninowy nie został znaleziony w próbkach treści przewodu pokarmowego, tkankach wątroby ani nerek, nie wykryto

go również w odchodach i moczu zwierząt. Autorzy sugerują, że kwas usninowy został poddany degradacji przez mikroorganizmy w przewodzie pokarmowym zwierząt, co może wskazywać na ich zdolność do unieczynniania potencjalnych związków toksycznych.

Toksyczność

Toksyczność kwasu usninowego określano wobec organizmów zwierzęcych (51, 52). U szczurów dawka toksyczna przekraczała poziom 1000 mg/kg, natomiast u myszy wartość LD_{50} wynosiła 180 mg/kg (51, 52). Ostrą toksyczność u szczurów zaobserwowano dopiero w dawce 2000 mg/kg masy ciała (51).

Działanie hepatotoksyczne

Szereg opublikowanych doniesień dotyczy działania hepatotoksycznego kwasu usninowego zarówno *in vitro*, na hodowanych hepatocytach i izolowanych z nich mitochondriach (53), jak i na modelach zwierzęcych (47, 53). Co ważne, hepatotoksyczność była niższa w przypadku podawania kwasu usninowego w postaci nanokapsulek (47). Opisano również kilkanaście przypadków ciężkich uszkodzeń wątroby, w tym kilka zakończonych koniecznością przeszczepu tego organu, u osób przyjmujących kwas usninowy jako suplement diety wspomagający odchudzanie. Ponad połowa opisanych przypadków dotyczyła złożonego preparatu LipoKinetix (54-57), w skład którego wchodzi między innymi sól sodowa kwasu usninowego, a ponadto chlorowoderek norefedryny, dijudotyronina, chlorowoderek johimbiny i kofeina (57), stąd określenie przyczyn uszkodzeń wątroby w tych przypadkach nie jest jednoznaczne z obecnością w nim pochodnej kwasu usninowego. Jednak pozostałe przypadki dotyczyły zażywania preparatów zawierających wyłącznie kwas usninowy (54) lub preparatów z dodatkiem substancji niepodejrzewanych o negatywny wpływ na wątrobę (nasiona soi, L-karnityna, pirogronian wapnia) (55, 56), co wskazywałoby na jego silny wpływ hepatotoksyczny. Zastosowanie kwasu usninowego we wspomaganiu odchudzania wynika najprawdopodobniej z jego aktywności rozprzegającej fosforylację oksydacyjną w mitochondriach (54), porównywalną lub nawet przewyższającą 2,4-dinitrofenol, stosowany od lat 30. ubiegłego wieku właśnie w tym celu (54). Ma to przyspieszać tzw. spalanie tłuszczu w organizmie i prowadzić do efektu utraty masy ciała.

Wywoływanie alergii kontaktowej

Kwas usninowy został przebadany pod kątem wywoływania alergii kontaktowej na podstawie doniesień o takim zjawisku u osób stosujących kosmetyki lub mających kontakt zawodowy lub hobbyistyczny z

ogrodnictwem lub leśnictwem. Rola kwasu usninowego jako alergenu została w kilku przypadkach potwierdzona (58, 59), natomiast w pozostałych przypadkach był on jedną z wielu substancji mogącą powodować uczulenie (58).

Podsumowanie

Kwas usninowy charakteryzuje się niezwykle interesującym, szerokim spektrum oddziaływań na organizmy żywe zarówno roślinne, jak i zwierzęce, a także na ludzi. Niektóre z przedstawionych własności muszą jeszcze zostać zbadane dokładniej w celu wyjaśnienia ich skomplikowanych mechanizmów działania. Intensywnych badań wymaga również problem działań niepożądanych kwasu usninowego. Nie zmienia to jednak faktu, że związek ten wciąż pozostaje w obszarze zainteresowań, jako potencjalny środek o działaniu przeciwdrobnoustrojowym czy cytotoksycznym.

Piśmiennictwo

1. Ingoldsdottir K. Molecules of interest: usnic acid. *Phytochem* 2002; 61:729-36.
2. Caviglia AM, Nicora P, Giordani P i wsp. Oxidative stress and usnic acid content in *Parmelia caperata* and *Parmelia soredians*. *Farmaco* 2001; 56:379-82.
3. Bjerke JW, Elvebakk A, Dominguez E i wsp. Seasonal trends in usnic acid concentrations of Arctic, alpine and Patagonian populations of the lichen *Flavocetraria nivalis*. *Phytochem* 2005; 66:337-44.
4. Culbertson CF. Chemical and botanical guide to lichen products. The University of North Carolina Press 1969; Reprint by Otto Koeltz Science Publishers, Koenigstein, 1979.
5. Cocchiello M, Skert N, Nimis PL i wsp. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissen* 2002; 89:137-46.
6. Podterob AP. Chemical composition of lichens and their medicinal applications. *Pharm Chem J* 2008; 42:582-8.
7. Kristmundsdottir T, Jonsdottir E, Ogmundsdottir HM i wsp. Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. *Eur J Pharm Sci* 2005; 24:539-43.
8. Barton DHR, Deflorin AM, Edwards OE. The synthesis of usnic acid. *J Chem Soc* 1956; 530-4.
9. Pereira EC, Pereyra T, Matos SC i wsp. Bioproduction of usnic acid from acetate by kaolinite immobilized cells of *Cladonia substellata* Vain. *Acta Soc Bot Pol* 1995; 64:171-4.
10. Honda NK, Pavan FR, Coelho RG i wsp. Antimycobacterial activity of lichen substances. *Phyomed* 2010; 17:328-32.
11. Perry NB, Benn MH, Brennan NJ i wsp. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens. *Lichenol* 1999; 31:627-36.
12. König GM, Wright AD. ¹H and ¹³C-NMR and biological activity investigations of four lichen-derived compounds. *Phytochem Anal* 1999; 10:279-84.
13. Ingoldsdottir K, Chung GAC, Skulason VG i wsp. Antimycobacterial activity of lichen substances *in vitro*. *Eur J Pharm Sci* 1998; 6:141-4.
14. Natić M, Tešić Z, Anđelković K i wsp. Synthesis and biological activity of Pd(II) and Cu(II) complexes with acylhydrazones of usnic acid. *Syn React Inorg Met* 2004; 34:101-13.
15. Correche ER, Carrasco M, Escudero ME i wsp. Study of the cytotoxic and antimicrobial activities of usnic acid and derivatives. *Fitoter* 1998; 69:493-501.
16. Tay T, Türk AÖ, Yilmaz M i wsp. Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-usnic acid, norstictic acid and protocetraric acid constituents. *Z Naturforsch* 2004; 59c:384-8.
17. Yilmaz M, Türk AÖ, Tay T i wsp. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-usnic acid, atranorin and fumarprotocetraric acid constituents. *Z Naturforsch*

- 2004; 59c:249-54. **18.** Lauterwein M, Oethinger M, Belsner K i wsp. *In vitro* activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)- and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrob Agents Chem* 1995; 2541-3. **19.** Francolini I, Norris P, Piozzi A i wsp. Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. *Antimicrob Agents Chem* 2004; 11: 4360-5. **20.** Neamati N, Hong H, Mazumder A i wsp. Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 integrase: discovery of novel inhibitors through 3D database searching. *J Med Chem* 1997; 40:942-51. **21.** Scirpa P, Scambia G, Masciullo V i wsp. A zinc sulfate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by human papillomavirus. *Minerva Ginecol* 1999; 51:255-60. **22.** Hanuš LO, Temina M, Dembitsky VM. Antibacterial and antifungal activities of some phenolic metabolites isolated from lichenized *Ascomycetes Ramalina lacera*. *Nat Prod Comm* 2008; 3:233-6. **23.** De Carvalho EAB, Andrade PP, Silva NH i wsp. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* *in vitro*: an ultrastructural study. *Micron* 2005; 36:155-61. **24.** Verotta L, Appendino G, Bombardelli E i wsp. *In vitro* antimalarial activity of hyperforin, a prenylated acylphloroglucinol. A structure-activity study. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17:1544-8. **25.** Fournet A, Ferreira ME, Rojas de Arias A i wsp. Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. *Comp Biochem Physiol* 1997; 116C:51-4. **26.** Fernandez E, Quilhot W, Gonzalez I i wsp. Lichen metabolites as UVB filters. *Cosmet Toiletries* 1996; 111:69-74. **27.** Rancan F, Rosana S, Boehmb K i wsp. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *J Photochem Photobiol B* 2002; 68:133-9. **28.** Jin J, Li C, He L. Down-regulatory effect of usnic acid on nuclear factor- κ B-dependent tumor necrosis factor- α and inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. *Phytother Res* 2008; 22:1605-9. **29.** Vijayakumar CS, Viswanathan S, Kannappa-Reddy M i wsp. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoter* 2000; 71:564-6. **30.** Okuyama E, Umeyama K, Yamazaki M. Usnic acid and diffractic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Med* 1995; 61:113-5. **31.** Kupchan SM, Kopperman HL. Usnic acid: tumour inhibition isolated from lichens. *Experientia* 1975; 31:625. **32.** Takai M, Uehara Y, Beisler JA. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. *J Med Chem* 1979; 22:1380-4. **33.** Bézivin C, Tomasi S, Rouaud I i wsp. Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convoluta*. *Planta Med* 2004; 70:874-7. **34.** Koparal AT, Ayaz-Tüylü B, Türk H. *In vitro* cytotoxic activities of (+)usnic and (-)usnic acid on V79, A549 and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes. *Nat Prod Res* 2006; 20:1300-7. **35.** Bazin MA, Le Lamer AC, Delcros JG i wsp. Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. *Bioorgan Med Chem* 2008; 16:6860-6. **36.** Einarsdóttir E, Groeneweg J, Björnsdóttir GG i wsp. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta Med* 2010; 76:1-6. **37.** Correche ER, Enriz RD, Piovano M i wsp. Cytotoxic and apoptotic effects on hepatocytes of secondary metabolites obtained from lichens. *ATLA* 2004; 32:605-15. **38.** Kumar SKC, Müller K. Lichen metabolites 2: Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic and diffractic acid on human keratinocytes growth. *J Nat Prod* 1999; 62:821-3. **39.** Burlando B, Ranzato E, Volante A i wsp. Antiproliferative effects on tumor cells and promotion of keratinocytes wound healing by different lichen compounds. *Planta Med* 2009; 75:607-13. **40.** Mayer M, O'Neill MA, Murray KE i wsp. Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties. *Anti-Cancer Drugs* 2005; 16: 805-9. **41.** O'Neill MA, Mayer M, Murray KE i wsp. Does usnic acid affects microtubules in human cancer cells? *Braz J Biol* 2010; 70; doi: 10.1590/S1519-69842010005000013. **42.** Bačkorová M, Bačkor M, Mikeš J i wsp. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicol In Vitro* 2011; 25:37-44. **43.** Oświecimska M, Sendra J, Janeczko Z. Antimitotic activity of some *Cladonia* species native in Poland. Part I. Preliminary screening investigations. *Herba Pol* 1979; 25:317-22. **44.** Oświecimska M, Janeczko Z, Sendra J. Antimitotic activity of some *Cladonia* species native in Poland. Part IV. The biological activity of usnic acid isolated from *Cladonia sylvatica* L. Hoffm. *Herba Pol* 1987; 33:212-6. **45.** Grzycka K. Badanie aktywności biologicznej niektórych składników plechy *Ramalina fraxinea*. *Acta Pol Pharm* 1979; 36:481-5. **46.** Ribeiro-Costa RM, Alves AJ, Santos NP. *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *J Microencapsul* 2004; 21:371-84. **47.** Santos LC, Honda NK, Carlos IZ i wsp. Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by Brazilian lichens. *Fitoter* 2004; 75:473-9. **48.** Foti RS, Dickmann LJ, Davis LJ i wsp. Metabolism and related human risk factors from hepatic damage by usnic acid containing nutritional supplements. *Xenobiot* 2008; 38:264-80. **49.** Krishna DR, Venkataramana D. Pharmacokinetics of D(+)-usnic acid in rabbits after intravenous and oral administration. *Drug Metab Dispos* 1992; 20:909-11. **50.** Sundset MA, Barboza PS, Green TK i wsp. Microbial degradation of usnic acid in the reindeer rumen. *Naturwissen* 2010; 97:273-8. **51.** Odabasoglu F, Cakir A, Suleymanc H i wsp. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 2006; 103:59-65. **52.** Abo-Khatwa AN, Al-Robai AA, Al-Jawhari DA. The uncoupling of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria *in vivo* by usnic acid. *JKAU* 2005; 17:35-45. **53.** Pramyothin P, Janthasoot W, Pongnimitprasert N i wsp. Hepatotoxic effect of (+)-usnic acid from *Usnea siamensis* in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. *J Ethnopharmacol* 2004; 90:381-7. **54.** Durazo FA, Lassman C, Han SHB i wsp. Fulminant liver failure due to usnic acid for weight loss. *Am J Gastroenterol* 2004; doi:10.1111/j.1572-0241.2004.04165.x. **55.** Sanchez W, Maple JT, Burgart LJ i wsp. Severe hepatotoxicity associated with use of a dietary supplement containing usnic acid. *Mayo Clin Proc* 2006; 81:541-4. **56.** Hsu LM, Huang YS, Chang FY i wsp. Fat burner herb, usnic acid, induced acute hepatitis in a family. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20:1138-9. **57.** Favreau JT, Ryu ML, Braunstein G i wsp. Severe hepatotoxicity associated with the dietary supplement LipoKinetic. *Ann Intern Med* 2002; 136:590-5. **58.** Stinchi C, Guerrini V, Ghetti E i wsp. Contact dermatitis from lichens. *Contact Dermat* 1997;36:310. **59.** Mitchell JC, Armitage JS. Dermatitis venenata from lichens; biology of lichens related to criteria for diagnosis of occupational dermatitis and to industrial exposure risk. *Arch Evniron Health* 1965; 11:701-9.

otrzymano/received: 20.04.2012
zaakceptowano/accepted: 11.06.2012

Adres/address:
*dr n. farm. Agnieszka Galanty
Katedra Farmakognozji, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków
tel.: +48 (12) 620-55-62
e-mail: mfgalant@cyf-kr.edu.pl