

Review

CARNOSIC ACID IN CARCINOGENESIS: FROM THEORY TO PRACTICE

Magdalena Wojtczuk¹ and Agnieszka Dominiak^{*2,3}

¹ Student Scientific Association, Department of Biochemistry and Pharmacogenomics, Faculty of Pharmacy, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland.

² Department of Biochemistry and Pharmacogenomics, Faculty of Pharmacy, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland.

³ Centre for Preclinical Research, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland.

* Correspondence, e-mail: agnieszka.dominiak@wum.edu.pl

Received: 05.12.2024 / Accepted: 10.01.2025 / Published: 27.02.2025

ABSTRACT

In light of the steadily increasing number of cancer diagnoses, there is a growing urgency to identify effective methods for prevention and anti-cancer therapy. Notably, approximately 50% of all clinical drugs are derived from natural sources, thus phytochemicals emerge as a promising option. One such candidate is carnosic acid, a phenolic diterpenoid compound richly found in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Over the past decade, there has been a significant increase in the number of *in vitro* and *in vivo* studies on the biological activities of carnosic acid and its derivatives. Carnosic acid has been shown to enhance antioxidant defense, inhibit the activity of proteolytic enzymes, block epithelial-mesenchymal transition and reduce cell adhesion and migration, as well as prevent tumor invasion and metastasis. Finally, it promotes tumor cell death through apoptosis and autophagy. Its effectiveness as a chemopreventive, antiproliferative, and anti-invasive agent in human cell lines and syngeneic cancer models, coupled with its synergistic effects when used in combination with chemotherapeutic drugs, low cost, and relatively simple acquisition, underscores the potential of carnosic acid in cancer treatment. However, despite promising preclinical findings, clinical validation is still lacking. Several areas remain to be explored, such as the pharmacokinetics of carnosic acid in the human body, the need for dosage adjustments, and safe exposure durations. Before carnosic acid can be used in patients, a comprehensive safety assessment is essential and the individual metabolic profiles should be taken into account. While carnosic acid-containing functional foods seem to be a promising strategy to reduce the global cancer burden, clinical trials using carnosic acid in oncology are still fully justified.

KEYWORDS: anticancer activity, cancer, carnosic acid, phytotherapy.

Article is published under the CC BY license.

1. Wstęp

Nowotwory są jednym z głównych problemów zdrowotnych współczesnego społeczeństwa. Wpływają nie tylko na zdrowie fizyczne, ale także na psychiczne i emocjonalne dobro pacjentów i ich bliskich. W obliczu stale rosnącej liczby przypadków rozpoznania nowotworów na świecie oraz coraz pilniejszej potrzeby wprowadzenia skutecznych metod zapobiegania jak i terapii przeciwnowotworowej, badacze wciąż intensywnie poszukują związków o takim działaniu. W ciągu ostatnich lat przeprowadzono wiele badań nad wprowadzeniem nowych substancji, które byłyby bezpieczną i skuteczną alternatywą

dla istniejących już terapii. Poszukuje się związków o zadowalającej skuteczności, których efekty uboczne nie będą tak silne jak te towarzyszące klasycznej chemioterapii, które ponadto nie będą indukować mechanizmów wielolekooporności i charakteryzować będzie je synergizm działania z innymi lekami.

Dane statystyczne wskazują, że wśród wszystkich nowotworów aż około 20-25% stanowią nowotwory dietozależne [1, 2]. Odkrycie powiązań między składnikami diety a zachorowalnością na nowotwory skłoniło do przypuszczeń, że substancje chemiczne pochodzenia roślinnego, mimo często znikomych wartości odżywczych, wywierają istotne efekty chemoprewencyjne.

Randomizowane badania populacyjne potwierdzają, że fitochemikalia zawarte w warzywach, ziołach i zbożach mogą zmniejszać zagrożenie zachorowania na tzw. choroby cywilizacyjne, w tym chronić przed rozwojem raka, a dodatkowo na względzie należy mieć, że chemoprewencja z wykorzystaniem składników diety jest niewątpliwie stosunkowo łatwym do wdrożenia działaniem [3-6].

Związki pochodzenia roślinnego o właściwościach antyproliferacyjnych dają nadzieję na opracowanie nowych lub modyfikacji istniejących schematów terapii nowotworów. Wydaje się, że kwas karnozowy (z ang. *carnosic acid*, CA) ze względu na jego szerokie właściwości biologiczne, w tym antyoksydacyjne, antiadipogenne, przeciwzapalne i przeciwbakteryjne, należy zaklasyfikować również do tej grupy [7, 8].

Liczne badania wskazują, że CA może wpływać na kluczowe mechanizmy w procesie nowotworzenia, takie jak proliferacja, apoptoza, autofagia i angiogeneza [8]. Badania *in vitro* dostarczają wydatne dowody na przeciwnowotworowe właściwości CA, jednak pojawiają się problemy podczas jego aplikacji, wynikające z niskiej rozpuszczalności i ograniczonej biodostępności.

Niniejszy przegląd jest zbiorem dotychczasowej wiedzy, którego celem jest wskazanie aktualnych potrzeb i określenie kierunku kontynuacji badań nad wykorzystaniem CA w onkologii.

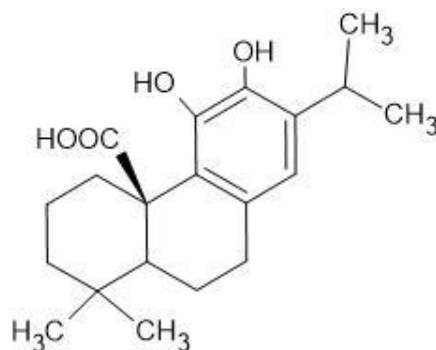
2. Właściwości fizyko-chemiczne i farmakokinetyczne kwasu karnozowego

CA jest naturalnie występującym związkiem szeroko rozpowszechnionym w roślinach z rodziny *Lamiaceae*, w szczególności w rozmarynie lekarskim (*Rosmarinus officinalis* L.) [9]. Po raz pierwszy związek ten został odkryty w *Salvia officinalis* L. w drugiej połowie XX wieku, następnie znacznie wyższą zawartość, około 3%, stwierdzono w suszonych liściach *Rosmarinus officinalis*. Zawartość CA w tych roślinach jest warunkowana wieloma czynnikami, w tym istotne wydają się warunki środowiskowe i faza wzrostu. CA i jego pochodne są obecne również w powszechnie używanych przyprawach jak oregano, melisa i majeranek. Stwierdza się ich obecność w zielonych częściach nadziemnych roślin, w szczególności w chloroplastach liści i w płatkach [3, 10].

Aktualnie ekstrakty z rozmarynu, bogate w CA, jako efektywne przeciwutleniające podlegają masowej produkcji. Bezpieczeństwo ich stosowania zostało potwierdzone przez Unię Europejską z zaznaczeniem dopuszczalnego ich dziennego spożycia sięgającego maksymalnie do 0,3 mg/kg masy ciała. Ekstrakty z rozmarynu otrzymały również status GRAS (Generally Recognized as Safe) od Amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (FDA) [11, 12]. Wobec powyższego coraz częściej standaryzowane ekstrakty znajdują zastosowanie w przemyśle przetwórstwa spożywczego, w celu konserwacji żywności, gdzie ich obecność sygnowana jest jako E392, oraz w przemyśle kosmetycznym.

CA (Ryc. 1) to związek diterpenowy o wzorze $C_{20}H_{28}O_4$, zawierający dwie grupy hydroksylowe w pozycji C11 i C12 [9, 13]. Charakterystyka CA wskazuje, że jest to krystaliczny proszek w kolorze od bezbarwnego do jasnożółtego, nierozpuszczalny w wodzie, za to łatwo rozpuszczalny (30 mg/ml) w rozpuszczalnikach organicznych [9]. Jest dość

nietrwały zwłaszcza w roztworach i pod działaniem wysokiej temperatury (powyżej 60°C) ulega utlenieniu.



Ryc. 1. Wzór kwasu karnozowego

Wykazano, że CA po podaniu doustnym szczerom wchłania się w jelicie cienkim i jego stężenie krążące utrzymuje się na poziomie 0,39 µg/ml przez okres 4 godzin [14]. Metabolizm CA obejmuje glukuronidację, utlenianie oraz metylację. Jego pochodne glukuronidowe wykryto w osoczu szczura już po 25 minutach po podaniu doustnym. Wykazuje on również zdolność przenikania przez barierę krew-mózg [15, 16]. Po podaniu doustnym za pomocą sondy udowodniono, że CA wchłania się głównie w kątnicy i okrężnicy myszy. Biodostępność CA wynosi 40,1% po 6 godzinach od podania doustnego w dawce 64,3 mg/kg. Obecność kwasu wykazano w treści jelitowej, wątrobie, tkance mięśniowej brzucha oraz w kończynach szczura po doustnym podaniu, a główną drogą eliminacji jest kał [17]. Z drugiej strony, Yan i wsp. oszacowali biodostępność CA na poziomie 65% po podaniu dożylnym i dożołądkowym w dawce 90 mg/kg [18]. Analiza powyższych danych jednoznacznie wskazuje na brak ich spójności. Dodatkowo, szczegółowe informacje na temat charakterystyki wchłaniania, metabolizmu oraz jego dystrybucji tkankowej w organizmie ludzkim pozostają nieznanymi. Istotną wydaje się ocena roli mikrobioty jelitowej w procesach metabolizmu CA.

Na drodze utlenienia, CA ulega przekształceniu w pochodne jak karnozol, związek z 2 grupami hydroksylowymi w pozycjach C-11 i C-12 oraz resztą laktonową. Proces ten ma miejsce np. podczas gotowania, ale może również prowadzić do powstania szeregu innych pochodnych fenoli i chinonów. Utlenianie CA może alternatywnie prowadzić do powstania rozmanolu. Karnozol może być przekształcony w epirosmanol na drodze hydroksylacji przy C-7 pierścienia laktonowego, podczas gdy metylacja grupy karboksylowej CA prowadzi do powstania metylokarnostanu [19, 20].

Nieliczne doniesienia wskazują na niezadowalające właściwości farmakokinetyczne CA [21, 22]. W związku z tym opracowywane są efektywne systemy dostarczania CA, w tym nanoemulsje, liposomy czy nanocząsteczki, dzięki którym możliwe będzie pokonanie bariery słabej rozpuszczalności [23, 24].

3. Właściwości biologiczne kwasu karnozowego

Kwas karnozowy jest znany z szerokiego zakresu właściwości biologicznych, ale wciąż kluczową kwestią jest poznanie w pełni jego możliwości i wykorzystanie ich w praktyce medycznej.

3.1. Działanie przeciwutleniające i przeciwzapalne

Kwas karnozowy jest przykładem naturalnego związku posiadającego ugrupowanie fenolowe w swojej strukturze. Wykazuje właściwości przeciwutleniające i przeciwzapalne; wychwytuje on reaktywne formy tlenu (ROS) oraz wzmacnia obronę antyoksydacyjną. Udowodniono, że zmiata rodniki hydroksylowe, DPPH [25] oraz sól amonową kwasu 2,2-azynobis(3etylobenzotiazolino-6-sulfonianowego) [10]. Kwas karnozowy wpływa na wzrost poziomu glutationu w komórkach oraz wzmacnia aktywność enzymów antyoksydacyjnych takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) oraz peroksydaza glutationowa (GPx). Mechanizm działania przeciwzapalnego CA opiera się na modulacji wielu szlaków sygnałowych stanu zapalnego, m.in. NF- κ B, MAPK, Nrf2 czy szlaku SIRT i inflamasomu NLRP3. Poprzez tak różne ścieżki sygnałowe CA obniża ekspresję cytokin prozapalnych, cząsteczek adhezyjnych, prostaglandyn oraz chemokin, prowadząc do łagodzenia odpowiedzi immunologicznej [26]. Wykazano, że CA hamował ekspresję syntazy prostaglandyny E-1 (mPGES-1), indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS) i cyklooksygenazy-2 (COX-2) u szczurów z zapaleniem stawów [27].

Doniesienia literaturowe potwierdzają, że ekstrakty z rozmarynu posiadają przeciwzapalne właściwości odgrywające istotną rolę w chorobach płuc, jelit, skóry, nerek, serca, neuronów oraz śródbłonna, a także wykazano, że łagodzą proces zapalny towarzyszący cukrzycy i otyłości [26].

3.2. Działanie neuroprotektoryjne

Kwas karnozowy wpływa na ochronę neuronów poprzez szereg różnorodnych i złożonych mechanizmów, które nie są jeszcze w pełni wyjaśnione. Po pierwsze, udowodniono, że zapobiega neurodegeneracji wywołanej odkładaniem złogów β amyloidu (A β) w strukturach mózgu. Istotnie redukuje toksyczność A β , dzięki temu może zapobiegać uszkodzeniom neuronów [28, 29].

Kolejnym istotnym mechanizmem jest indukcja autofagii, procesu homeostatycznego, który pozwala na usuwanie uszkodzonych białek i organelli w komórkach nerwowych. Dysregulacja tego procesu lub całkowita jego utrata towarzyszy chorobom neurodegeneracyjnym. Przeprowadzone badania wykazały, że autofagia indukowana przez CA za pośrednictwem kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK) jest istotnym regulatorem metabolizmu komórkowego. AMPK aktywuje proces autofagii w celu ochrony przed stresem oksydacyjnym i dysfunkcją mitochondriów, co podkreśla wpływ terapeutyczny CA wobec toksyczności β -amyloidu [30].

Dodatkowo, CA łagodzi stres oksydacyjny w neuronach poprzez modulację ekspresji enzymów przeciwutleniających, a nadmiar ROS może prowadzić do uszkodzeń komórkowych i przyspieszać procesy obumierania [31]. Chi-Rei i wsp. udowodnili, że CA chroni przed toksycznością 6-hydroksydopaminy (6-OHDA) w modelu indukowanej *in vivo* choroby Parkinsona [32].

3.3. Działanie hipoglikemiczne

Zainteresowanie hipoglikemiczną rolą CA pozostaje na równi z zainteresowaniem jego właściwościami przeciwnowotworowymi. Mechanizm korzystnego wpływu na homeostazę glukozy nie jest oczywisty, mimo to pojawia się coraz więcej doniesień, które udowadniają jego korzystny

efekt. Wykazano, że suplementacja tym związkiem zmniejsza przyrost masy ciała oraz glikemię na czczo, a także poprawia wrażliwość komórek na insulinę. Wyniki badań potwierdzają korzystny wpływ CA w przewlekłych schorzeniach, takich jak cukrzyca typu 2 oraz otyłość [33]. Zrozumienie mechanizmu blokowania adipogenezy przez CA wydaje się być kluczowe w nowym jego zastosowaniu: zapobieganiu i/lub leczeniu otyłości [34]. CA stymuluje transport glukozy z tkanek obwodowych, między innymi z mięśni szkieletowych [33]. Wykazano, że suplementacja CA obniża poziom powstawania dialdehydu malonowego i końcowych produktów procesów glikacji [35]. Dziewięćdziesięciodniowa kuracja herbatą rozmarynową obniżyła poziom hemoglobiny glikowanej o 15% [36].

Ponadto, w oparciu o dokowanie molekularne wykazano, że CA może wiązać się z resztami aminokwasowymi glukozydazy poprzez wiązanie wodorowe i siły van der Waalsa, co w konsekwencji może zmieniać konformację tego enzymu i tym samym obniżyć jego aktywność. Hamowanie aktywności α -glukozydazy jest jedną z metod działania dostępnych na rynku leków przeciwcukrzycowych [37]. Dotychczasowe wyniki badań *in vitro* i *in vivo* wskazują jednoznacznie na przeciwcukrzycowy potencjał CA i konieczna wydaje się weryfikacja tych właściwości w warunkach klinicznych.

3.4. Działanie przeciwbakteryjne

Kwas karnozowy, jako naturalny związek, poddawany jest szerokiemu spektrum badań, aby móc w pełni wykorzystać jego prozdrowotne właściwości. Kolejnym przykładem takiego działania jest udowodniona aktywność przeciwdrobnoustrojowa. Sugeruje się, że jego chemiczna struktura, podobnie jak innych diterpenów fenolowych, pozwala na przedostawanie się do błony bakteryjnej i tworzenie wiązań wodorowych oraz/lub modulowanie potencjału błonowego, zmieniając w ten sposób przepuszczalność błon [38, 39]. Zatem najprawdopodobniej działanie CA polega na uszkodzaniu błony komórkowej patogenów. Inne doniesienia sugerują jego wpływ na unieczynnianie enzymów komórkowych. Badania wykazały również, że CA aż 16-krotnie zwiększa efektywność wybranych antybiotyków: erytromycyny i tetracykliny. Wskazuje to zatem, że CA, poza bezpośrednim działaniem antybakteryjnym, może działać synergistycznie z innymi substancjami przeciwdrobnoustrojowymi i tym samym zwiększać skuteczność terapii [10]. Udowodniono, że ekstrakt metanolowy z rozmarynu (30% kwasu karnozowego, 16% karnozolu i 5% kwasu rozmarynowego) był najskuteczniejszym środkiem przeciwdrobnoustrojowym przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, podczas gdy ekstrakty wodne charakteryzowały się wybiórczymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi; wykazano ich aktywność tylko wobec *S. aureus*. Analogiczne wyniki uzyskano z zastosowaniem czystego kwasu rozmarynowego [7].

3.5. Działanie przeciwnowotworowe

Kwas karnozowy i jego pochodne posiadają szereg udowodnionych korzystnych właściwości w walce z nowotworami. Działanie przeciwutleniające i przeciwzapalne CA pozwala istotnie ograniczać rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych. Udowodniono, że redukuje on poziom wolnych rodników, wzmacnia obronę antyoksydacyjną i zmniejsza stan zapalny w organizmie. Związek ten posiada zdolności antyproliferacyjne, dzięki

czemu może powstrzymywać niekontrolowane namnażanie się komórek nowotworowych, a także wykazuje działanie hamujące migrację komórek poprzez modulowanie aktywność enzymów degradujących macierz zewnątrzkomórkową [11, 13]. W literaturze znaleźć można szereg przykładów aktywności przeciwnowotworowej ekstraktów z rozmarynu, wskazujące na ich właściwości chemoprewencyjne, antyproliferacyjne i antyinwazyjne. Doniesienia te potwierdzają, że CA i jego pochodne wywierają działanie na każdym etapie zaawansowania raka. Przeprowadzono szereg eksperymentów w warunkach *in vitro* badających wpływ CA na różne typy nowotworów, w tym raka piersi, płuc, wątroby, żołądka, mózgu, prostaty, jelita grubego i w białaczkach [11, 40-45]. Należy jednak zauważyć, że w powyższych badaniach grupę kontrolną stanowiły wyłącznie komórki nowotworowe nie poddane traktowaniu badanymi związkami; brakuje odniesienia do komórek nieobjętych kancerogenezą i tym samym istnieje konieczność oceny wpływu CA na przeżywalność komórek prawidłowych.

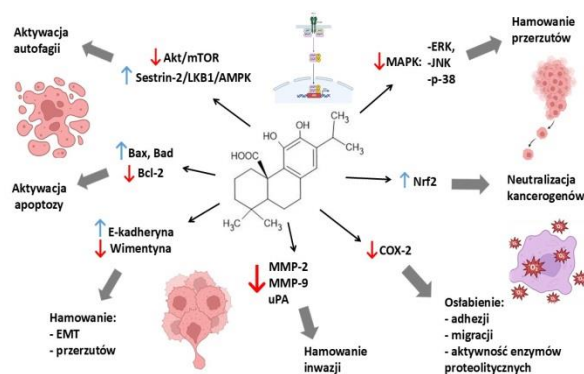
4. Przeciwnowotworowe mechanizmy kwasu karnozowego

Szlak Nrf2 jest coraz częściej wskazywany jako istotny punkt uchwytu w terapii jak i profilaktyce nowotworów [46, 47]. Nrf2 (ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2) jest jądrowym czynnikiem transkrypcyjnym pochodzenia erytroidalnego typu 2, kontrolującym ekspresję genów związanych z ochroną antyoksydacyjną komórek. W warunkach fizjologicznych Nrf2 jest związany w kompleksie z białkiem Keap1 i zawieszony w cytoplazmie. W takim stanie czynnik ten jest nieaktywny. W momencie ekspozycji na stres oksydacyjny dochodzi do modyfikacji tego kompleksu i czynnik transkrypcyjny zostaje uwolniony, po czym przedostaje się do jądra komórkowego inicjując transkrypcję genów, które kontrolują ekspresję wielu białek cytoprotekcyjnych, m.in. oksygenazy hemowej 1 (HO-1), sestryny-2, S-transferazy glutationowej (GST), reduktazy glutationu (GR), reduktazy tioredoksyny (TR) i peroksyredoksyny (Prx). Badania wykazały, że CA w stężeniu 20 μM lub ekstrakt z rozmarynu w stężeniu 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pobudzają ekspresję Nrf2 w komórkach raka jelita grubego, sprzyjają jego dojądrowej migracji i interakcji z elementem odpowiedzi antyoksydacyjnej (ARE) prowadząc ostatecznie do neutralizacji kancerogenów, w tym wolnych rodników. Strategia ta może być wykorzystana w celu zahamowania, a także odwrócenia procesów nowotworzenia w jego początkowych stadiach [48, 49].

Sugeruje się, że działanie przeciwnowotworowe CA (Ryc. 2) związane jest z hamowaniem ścieżki MAPK. Szlak ten stanowi duża rodzina aktywowanych przez mitogeny kinaz serynowych/treoninowych, które wyzwalają kaskadę fosorylacji prowadzącą do specyficznych odpowiedzi komórkowych, w tym indukcji enzymów proteolitycznych [50, 51]. Doniesienia ostatnich lat po raz kolejny potwierdzają wspomniany mechanizm działania CA (10-40 μM). Hamuje on przerzuty i inwazję komórek ludzkiego raka płaskonabłonkowego przetyku prawdopodobnie przez supresję szlaków sygnałowych trzech rodzin kinaz MAP: pERK, pJNK i p-38 [52].

Mechanizm działania CA (Ryc. 2) związany jest również z modulacją ekspresji genów kodujących białka przeciwwzpalne i przeciwtleniające [11, 53]. Cyklooksygenaza-2 (COX-2) jest jednym z enzymów przeciwwzpalnych stymulujących produkcję prostaglandyn, cząsteczek sygnałowych

biorących udział w reakcjach zapalnych. Enzym ten aktywowany jest w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek,



Ryc. 2. Przeciwnowotworowe mechanizmy działania kwasu karnozowego. Udowodniono, że CA istotnie ogranicza aktywność enzymów proteolitycznych, blokuje przejście nabłonkowo-mezenchymalne, adhezję i migrację komórek oraz zapobiega inwazji i przerzutowaniu nowotworów, stymulując w tym samym czasie neutralizację kancerogenów. Ostatecznie CA aktywuje śmierć komórek nowotworowych na drodze apoptozy i autofagii.

infekcje czy inne procesy wywołujące stan zapalny [54]. W badaniach na różnych modelach nowotworowych linii komórkowych wykazano nadekspresję tego enzymu. COX-2 wykazuje działanie promujące wzrost zmutowanych komórek, tworzenie nowych naczyń krwionośnych i powstanie przerzutów. Natomiast prostaglandyny, produkowane w wyniku jego aktywacji, mogą promować podziały komórkowe i wspierać przetrwanie komórek nowotworowych [55, 56]. Badania udowodniły, że CA obniża COX-2 na poziomie mRNA i białka oraz promuje apoptozę komórek nowotworowych jelita grubego. Około 50% obniżenie ekspresji COX-2 obserwowano po 24 godzinnym traktowaniu komórek CA w stężeniu 24-48 μM , znacznie silniejszy efekt uzyskano przy stężeniu 96 μM . Wykazano również jego hamujący wpływ na adhezję i migrację badanych linii [57].

Inwazja nowotworowa jest skomplikowanym procesem, który wymaga udziału wielu różnych czynników pozwalających komórkom nowotworowym oderwać się od miejsca pierwotnego guza i migrować do innych tkanek. Jednym z takich czynników jest wydzielanie enzymów proteolitycznych, które odpowiadają za degradację macierzy zewnątrzkomórkowej. Wśród nich znajdują się metaloproteiny macierzy pozakomórkowej (MMP) oraz proteazy serynowe [58]. Zależne od CA (o stężeniu 12-96 μM) hamowanie migracji komórek miało związek z obniżeniem aktywności enzymów proteolitycznych takich jak MMP-9, MMP-2 oraz urokinazowego aktywatora plazminogenu uPA [57].

Uważa się, że zjawiskiem sprzyjającym powstawaniu przerzutów jest przejście nabłonkowo-mezenchymalne (EMT) [59]. Jest to proces nabywania przez spolaryzowane komórki nabłonkowe fenotypu komórki mezenchymalnej. Przejście to warunkuje zwiększoną zdolność migracyjną i inwazyjność komórek nowotworowych, ale także pozwala na uzyskanie oporności na apoptozę [60, 61]. Komórki po EMT charakteryzują się zmniejszoną ekspresją genów nabłonkowych, kodujących takie białka jak E-kadheryny i okcludyny, na korzyść nabywania markerów

mezenchymalnych, w tym wimentyny i fibronektyny [62]. So i wsp. wykazali, że traktowanie komórek czerniaka B16F10 CA (w stężeniu 10 $\mu\text{mol/L}$) powoduje zwiększoną ekspresję E-kadheryny oraz zmniejszenie ekspresji wimentyny. Obserwacje te sugerują zależną od CA inhibicję EMT w komórkach czerniaka [63]. Zrozumienie dynamiki procesu rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych jest kluczowe w poszukiwaniu nowych celów terapii, które zahamują przerzuty raka i ostatecznie doprowadzą do śmierci tych komórek [60].

Wiele badań donosi, że indukcja apoptozy jest istotnym mechanizmem działania związków potencjalnie przeciwnowotworowych. Programowana śmierć prowadzi do usuwania uszkodzonych, niepotrzebnych komórek bez wywoływania stanu zapalnego i towarzyszy procesom fizjologicznym oraz ma miejsce w patologii. W przypadku chorób nowotworowych mamy do czynienia z osłabieniem procesów apoptozy, co skutkuje kumulacją uszkodzonych komórek z defektami molekularnymi [64]. W badaniach na ludzkich liniach komórkowych raka szyjki macicy CaSki i SiHa udowodniono, że CA hamuje wzrost komórek w sposób zależny od dawki (10-100 μM) i czasu ekspozycji (24-72 godziny). Przebieg apoptozy jest zależny od szlaku sygnałowego, w którym pośredniczą kaspazy, które ostatecznie degradują białka komórkowe. W badaniach na liniach komórkowych raka szyjki macicy traktowanych CA (10 μM) przez okres 24 godzin odnotowano wyższe stężenia białek proapoptycznych, takich jak Bax, Bad, oraz obserwowano obniżenie poziomu białka antyapoptycznego Bcl-2 w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto, wykazano również wzrost ekspresji i poziomu białka kaspazy 3 i 9. Udowodniono zatem, że CA (10 μM) indukuje śmierć komórek nowotworowych na drodze aktywacji szlaku sygnałowego apoptozy (Ryc. 2) [65]. Podobnie, indukcję apoptozy zaobserwowano podczas eksperymentów prowadzonych na linii komórkowej raka żołądka AGS i MKN-45; CA stosowano w stężeniu 20 i 25 $\mu\text{g/mL}$ [45]. Należy zauważyć, że ograniczeniem chemioterapii u pacjentów jest często uodpornienie się komórek nowotworowych na indukowany proces apoptozy. Wydaje się zatem, że terapie ukierunkowane na różne rodzaje śmierci komórki są znacznie bardziej atrakcyjne z onkologicznego punktu widzenia [66].

W ostatnim czasie, poza aktywacją apoptozy, autofagia także została przedstawiona jako kolejny mechanizm śmierci komórki, aktywowany przez CA [66]. Efektem autofagii jest degradacja elementów cytoplazmy oraz białek w niej występujących, które uległy uszkodzeniu lub są zbędne. Proces autofagii regulowany jest przez wiele szlaków, między innymi poprzez Akt/mTOR, który z reguły podlega konstytutywnej aktywacji w komórkach wielu rodzajów nowotworów [67]. Badania na linii komórkowej raka wątroby HepG2 wykazały, iż CA (80 μM) indukował w nich śmierć komórek na drodze autofagii. Efekt ten wywierał poprzez hamowanie szlaku Akt/mTOR [66]. U podstaw przeciwnowotworowego działania CA (50 μM) wobec raka płuc leży indukcja autofagii poprzez kaskadę sygnalizacyjną Sestrin-2/LKB1/AMPK. Aktywacja kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK) jest kojarzona ze zwiększonym przeżyciem u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca [68].

Poza bezpośrednim działaniem przeciwnowotworowym (Ryc. 2) samego CA, istotne jest także jego współdziałanie z innymi związkami/lekami stosowanymi w terapii i

chemoprewencji. Istnieją przypuszczenia, że CA będzie wykazywał synergizm działania w schematach terapii skojarzonej i zapobiegał oporności wielolekowej, z uwagi na hamujący jego wpływ na glikoproteinę P, która odpowiada za wypompowanie leków z cytozolu komórki [69]. Można doszukać się coraz więcej prac na to wskazujących [70], wśród nich jest skojarzenie CA z temozolomidem (TMZ), lekiem pierwszego rzutu w leczeniu glejaka. Częstym problemem monoterapii TMZ jest rozwinięcie chemiooporności, co jest równoznaczne z niepowodzeniem leczenia. W badaniu na dwóch liniach komórkowych glejaka U251 oraz LN229 zaobserwowano, że podawanie CA (10 μM) i TMZ wywiera znacznie silniejsze efekty hamujące wzrost komórek guza. CA wzmocnił indukowaną przez TMZ apoptozę. Dodatkowo, wykazano, że połączenie tych związków indukowało autofagię w komórkach nowotworowych [71]. Inna grupa badawcza udowodniła, że ekstrakt z rozmarynu (20 $\mu\text{g/mL}$) wykazuje zależne od dawki działanie przeciwnowotworowe i wywiera efekt synergistyczny w połączeniu z 5-fluorouracylem (5-FU) wobec komórek raka jelita grubego. Dowiedziono również, że ekstrakt uwrażliwia odporne komórki na 5-FU [72].

Aktywna forma witaminy D3, 1,25(OH)2D3, ma silne działanie stymulujące różnicowanie i może być skuteczna w leczeniu ostrych białaczek szpikowych. Niestety, stosowanie aktywnej formy witaminy D w skutecznych dawkach jest obarczone ryzykiem groźnej hiperkalcemii [73]. Badania na liniach komórek ludzkiej białaczki szpikowej (HL60, U937) oraz na syngenicznym modelu guza białaczki wykazały wzmocnione działanie antyproliferycyjne i różnicujące 1,25(OH)2D3 w połączeniu z 10 μM CA lub 1% ekstraktem z rozmarynu. W badaniu tym stosowano niskie dawki 1,25(OH)2D3 i dzięki temu wyeliminowano możliwość rozwinięcia hiperkalcemii [74].

5. Kwas karnozowy w badaniach klinicznych

W bazie ClinicalTrials.gov nie ma doniesień na temat prowadzonych badań klinicznych z bezpośrednim zastosowaniem CA u pacjentów onkologicznych. Doszukać się można badań, w których stosowano rozmaryn w różnych formacjach.

Z uwagi na to, że neuropatia obwodowa jest jednym z najczęstszych ciężkich działań niepożądanych wywołanych chemioterapią, prowadzona jest ocena skuteczności miejscowego stosowania 10% olejku z rozmarynu w tej grupie chorych (NCT05855044). Pacjenci aplikowali go na dłonie i stopy raz dziennie przez okres 24 tygodni. Efekt stosowania olejku zostanie oceniony przy pomocy kwestionariusza EORTC QLQ-CIPN20 służącego do pomiaru nasilenia bólu i objawów czynnościowych. W podobnym badaniu zostanie przetestowana hipoteza zakładająca, że mieszanka olejowa, w której składzie jest m. in. *Rosmarinus officinalis*, *Curcuma longa*, *Piper nigrum*, *Pelargonium asperum*, *Zingiber officinale*, *Mentha x piperita* i *Simmondsia chinensis* zmniejsza objawy neuropatii obwodowej wywołanej chemioterapią i poprawia jakość życia pacjentów z rakiem piersi (NCT03449303).

Badaniu podlega również wpływ sześciotygodniowego podawania suplementu na bazie diterpenów z *Rosmarinus officinalis* i alkiloglicerolami na parametry immunologiczne, regulację ekspresji genów związanych z immunomodulacją

i stanem zapalnym oraz reakcją na stres oksydacyjny w grupie 60 zdrowych ochotników (NCT03492086). W ubiegłym roku rozpoczęto również próbę kliniczną nad oceną profilu farmakokinetycznego ekstraktu z rozmarynu podawanego jako suplementu zdrowym dorosłym ochotnikom (NCT05931341).

Na polskim rynku farmaceutycznym dostępnych jest zaledwie kilka nutraceutyków, w których składzie obecny jest ekstrakt z rozmarynu (*Rosmarinus officinalis* L.) zawierający, jak wskazuje producent, 10% CA. Zalecane jest jego stosowanie w celu wspierania funkcjonowania dróg moczowych, układu trawiennego i wydalniczego.

Połączenie N-palmitoiloetanoloamidu ze standaryzowanymi ekstraktami z *Rosmarinus officinalis*, *Commiphora mirrha* i *Piper nigrum* w formułacji IdrOilMatrix™ jest dostępne od 2019 roku we Włoszech jako suplement diety (Noxiall®) pod postacią tabletek (kod włoskiego rejestru suplementów 88326). Wykazano, że podanie Noxiall®, pregabaliny lub gabapentyny znacząco osłabiło wywołaną alłodynią mechaniczną. Skuteczność działania Noxiall® była porównywalna do leków pierwszego wyboru w leczeniu bólu neuropatycznego. Dodatkowo, udowodniono skuteczność addytywną Noxiall®; jednoczesne jego podawanie z nieskutecznymi dawkami pregabaliny skutkowało znaczącym zmniejszeniem bólu [75]. Noxiall® okazał się również efektywny u pacjentów geriatrycznych; notowano u tych chorych zmniejszenie intensywności bólu mieszanego/nocyceptywnego, jak i neuropatycznego oraz poprawę zdolności funkcjonalnych i jakości ich życia. Dane te należy jednak traktować jako wstępne i wymagające potwierdzenia w badaniach randomizowanych na licznej grupie [76].

6. Podsumowanie

Prognozy przewidują aż 70-procentowy wzrost zachorowań na nowotwory w najbliższych dwóch dekadach. Wobec powyższego, potrzeba wprowadzenia na rynek farmaceutyczny skutecznych związków o działaniu przeciwnowotworowym jest niezaprzeczalna. Jak donoszą statystyki, ponad 80% zatwierdzonych przeciwnowotworowych leków w latach 1981-2010 jest produktami naturalnymi lub ich syntetycznymi odpowiednikami, a aż 50% wszystkich leków klinicznych ma pochodzenie naturalne [77, 78]. Dużą nadzieją wobec tego są naturalne związki występujące w roślinach, które mogą zapobiegać, hamować, a nawet odwracać progresję powstałych zmian. Światowe zainteresowanie CA nieustannie rośnie, a jego korzystne efekty są odkrywane na nowo. W ostatnich 10 latach nastąpił znaczny wzrost liczby badań dotyczących aktywności biologicznych CA i jego pochodnych, publikowane było średnio około 50 prac rocznie z tendencją wzrostową każdego roku, jak wskazują dane z bazy PubMed. W rzeczywistości przeprowadzono liczne eksperymenty *in vitro* dotyczących cytotoksyczności karnozolu i kwasu karnozowego na ludzkich liniach nowotworowych, w tym na HepG2, COLO 205, AGS, MKN-45, CaSki, SiHa, HL-60 i innych. W cytowanych pracach brakuje jednak odniesień do prawidłowych ludzkich linii komórkowych. Efektywność, synergizm działania z lekami chemioterapeutycznymi oraz niskie koszty i stosunkowo łatwe pozyskanie dodatkowo potęgują potencjalne zastosowanie CA w leczeniu raka. Należy jednak mieć na uwadze potrzebę standaryzacji jego źródeł i technik ekstrakcji.

Bogate zaplecze badań przedklinicznych nie znalazło jednak jeszcze potwierdzenia w klinice. Droga od identyfikacji związku do wprowadzenia go w leczeniu jest długa i wyboista. Dotychczasowe przedkliniczne doniesienia dotyczące CA są obiecujące, ale nie pozbawione ograniczeń, które w naszej opinii mogą znaleźć rozwiązania. Wiele pytań na dzień dzisiejszy pozostaje bez odpowiedzi, wśród nich te podstawowe: jaka jest farmakokinetyka CA w organizmie ludzkim, czy zastosowanie formułacji obejmujących nanocząsteczki lipidowe, nanoemulsje, cyklodekstryny i innych modyfikacji podania jest konieczne, jakie należy stosować dawki i jaki jest bezpieczny czas ekspozycji, aż w końcu czy opisane dotychczas aktywności biologiczne CA na modelach *in vitro* zostaną potwierdzone u chorych. Należy podkreślić, że nowoczesne strategie podania związków mogą istotnie zwiększyć biodostępność CA i tym samym spotęgować korzystne efekty działania przeciwnowotworowego przy niższych dawkach.

W naszej ocenie dotychczasowe doniesienia w pełni uzasadniają konieczność rozszerzenia badań przedklinicznych, w szczególności prowadzonych na modelach zwierzęcych i rozpoczęcia badań klinicznych nad CA. Przed planowanym zastosowaniem CA u chorych należy jednak w pełni ocenić jego profil bezpieczeństwa i uwzględnić ograniczenia wynikające ze zmienności profilu metabolicznego. Należy również zwrócić uwagę na potrzebę uzupełnienia danych dotyczących bezpieczeństwa długoterminowego stosowania CA. Aby maksymalizować korzyści terapeutyczne płynące z zastosowania CA, warto rozwinąć także badania pozwalające na określenie jego interakcji z mikrobiotą jelitową.

Wkład autorski: opracowanie koncepcji A.D.; źródła A.D., M.W.; opracowanie wersji roboczej M.W.; nadzór nad projektem A.D.; wizualizacja M.W.; recenzja i redakcja A.D. Wszyscy autorzy przeczytali i zaakceptowali ostateczną wersję manuskryptu.

Finansowanie: Nie dotyczy

Konflikt interesów: Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Bibliografia

1. Giovannucci, E. Nutritional epidemiology and cancer: A Tale of Two Cities. *Cancer Causes Control* **2018**, *29* (11), 1007-1014. DOI: 10.1007/s10552-018-1088-y
2. Blot, W. J.; Tarone, R. E. Doll and Peto's quantitative estimates of cancer risks: holding generally true for 35 years. *J. Natl. Cancer Inst.* **2015**, *107*(4), Art. No: djv044. DOI: 10.1093/jnci/djv044
3. Zhang, Y. J.; Gan, R. Y.; Li, S.; Zhou, Y.; Li, A. N.; Xu, D. P.; Li, H. B. Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. *Molecules* **2015**, *20*(12), 21138-21156. DOI: 10.3390/molecules201219753
4. Galasko, D. R.; Peskind, E.; Clark, C. M.; Quinn, J. F.; Ringman, J. M.; Jicha, G. A.; Cotman, C.; Cottrell, B.; Montine, T. J.; Thomas, R. G.; Aisen, P. Antioxidants for Alzheimer disease: a randomized clinical trial with cerebrospinal fluid biomarker measures. *Arch. Neurol.* **2012**, *69* (7), 836-841. DOI: 10.1001/archneurol.2012.85

5. Tanaka, S.; Haruma, K.; Yoshihara, M.; Kajiyama, G.; Kira, K.; Amagase, H.; Chayama, K. Aged garlic extract has potential suppressive effect on colorectal adenomas in humans. *J. Nutr.* **2006**, *136*(3 Suppl), 821-826. DOI: 10.1093/jn/136.3.821S
6. El Oirdi, M. Harnessing the Power of Polyphenols: A New Frontier in Disease Prevention and Therapy. *Pharmaceuticals (Basel)* **2024**, *17*(6). DOI: 10.3390/ph17060692
7. Moreno, S.; Scheyer, T.; Romano, C. S.; Vojnov, A. A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic. Res.* **2006**, *40*(2), 223-231. DOI: 10.1080/10715760500473834
8. Moore, J.; Yousef, M.; Tsiani, E. Anticancer Effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract and Rosemary Extract Polyphenols. *Nutrients* **2016**, *8*(11), Art. No: 731. DOI: 10.3390/nu8110731
9. Chen, X.; Wei, C.; Zhao, J.; Zhou, D.; Wang, Y.; Zhang, S.; Zuo, H.; Dong, J.; Zhao, Z.; Hao, M.; et al. Carnosic acid: an effective phenolic diterpenoid for prevention and management of cancers via targeting multiple signaling pathways. *Pharmacol. Res.* **2024**, *206*, Art. No: 107288. DOI: 10.1016/j.phrs.2024.107288
10. Birtić, S.; Dussort, P.; Pierre, F. X.; Bily, A. C.; Roller, M. Carnosic acid. *Phytochemistry* **2015**, *115*, 9-19. DOI: 10.1016/j.phytochem.2014.12.026
11. Petiwala, S. M.; Johnson, J. J. Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity. *Cancer Lett.* **2015**, *367* (2), 93-102. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.07.005
12. Younes, M.; Aggett, P.; Aguilar, F.; Crebelli, R.; Dusemund, B.; Filipič, M.; Frutos, M. J.; Galtier, P.; Gott, D.; Gundert-Remy, U.; et al. Refined exposure assessment of extracts of rosemary (E 392) from its use as food additive. *EFSA J.* **2018**, *16*. Art. No: 5373. DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5373
13. Sirajudeen, F.; Bou Malhab, L.J.; Bustanji, Y.; Shahwan, M.; Alzoubi, K. H.; Semreen, M. H.; Taneera, J.; El-Huneidi, W.; Abu-Gharbieh, E. Exploring the Potential of Rosemary Derived Compounds (Rosmarinic and Carnosic Acids) as Cancer Therapeutics: Current Knowledge and Future Perspectives. *Biomol. Ther. (Seoul)* **2024**, *32* (1), 38-55. DOI: 10.4062/biomolther.2023.054
14. Zuo H.X. Studies on the Pharmacokinetics and Metabolism of Carnosic Acid in Rats, dissertation, Shenyang Pharmaceutical University, 2008.
15. de Oliveira, M. R. The Dietary Components Carnosic Acid and Carnosol as Neuroprotective Agents: a Mechanistic View. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53* (9), 6155-6168. DOI: 10.1007/s12035-015-9519-1
16. Rasoolijazi, H.; Azad, N.; Joghataei, M. T.; Kerdari, M.; Nikbakht, F.; Soleimani, M. The protective role of carnosic acid against beta-amyloid toxicity in rats. *Sci. World J.* **2013**, Art. No: 917082. DOI: 10.1155/2013/917082
17. Doolaee, E. H.; Raes, K.; De Vos, F.; Verhé, R.; De Smet, S. Absorption, distribution and elimination of carnosic acid, a natural antioxidant from *Rosmarinus officinalis*, in rats. *Plant Food Hum. Nutr.* **2011**, *66* (2), 196-202. DOI: 10.1007/s11130-011-0233-5
18. Yan, H.; Wang, L.; Li, X.; Yu, C.; Zhang, K.; Jiang, Y.; Wu, L.; Lu, W.; Tu, P. High-performance liquid chromatography method for determination of carnosic acid in rat plasma and its application to pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* **2009**, *23*(7), 776-781. DOI: 10.1002/bmc.1184
19. Schwarz, K.; Ternes, W. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *195* (2), 99-103. DOI: 10.1007/bf01201766
20. Buchin, Y.; Sakemi, Y.; Hamashima, R.; Morioka, Y.; Yamanaka, D.; Hakuno, F.; Takahashi, S.-i.; Shindo, K. Structures and biological activities of new carnosic acid- and carnosol-related compounds generated by heat treatment of rosemary. *Phytochem. Lett.* **2019**, *30*, 43-48. DOI: 10.1016/j.phytol.2019.01.005
21. da Silva, S. B.; Amorim, M.; Fonte, P.; Madureira, R.; Ferreira, D.; Pintado, M.; Sarmiento, B. Natural extracts into chitosan nanocarriers for rosmarinic acid drug delivery. *Pharm. Biol.* **2015**, *53* (5), 642-652. DOI: 10.3109/13880209.2014.935949
22. Wang, J.; Li, G.; Rui, T.; Kang, A.; Li, G.-C.; Fu, T.; Li, J.; Di, L.; Cai, B. Pharmacokinetics of rosmarinic acid in rats by LC-MS/MS: absolute bioavailability and dose proportionality. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 9057-9063. DOI: 10.1039/C6RA28237G.
23. Garti, N.; McClements, D. J. *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals*, Woodhead Publishing: Oxford, **2012**. 612, 2012; 450-470.
24. Zheng, H.; Wijaya, W.; Zhang, H.; Feng, K.; Liu, Q.; Zheng, T.; Yin, Z.; Cao, Y.; Huang, Q. Improving the bioaccessibility and bioavailability of carnosic acid using a lecithin-based nanoemulsion: complementary in vitro and in vivo studies. *FOOD FUNCT.* **2020**, *11* (9), 8141-8149. DOI: 10.1039/d0fo01098g
25. Luis, J. C.; Johnson, C. B. Seasonal variations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary extracts. Analysis of their in vitro antiradical activity. *Span. J. Agric. Res.* **2005**, *3*, Art. No: 106. DOI: 10.5424/sjar/2005031-130.
26. Habtemariam, S. Anti-Inflammatory Therapeutic Mechanisms of Natural Products: Insight from Rosemary Diterpenes, Carnosic Acid and Carnosol. *Biomedicines* **2023**, *11* (2). Art. No: 545. DOI: 10.3390/biomedicines11020545
27. Shrivastava, S.; Bahuguna, T.; Mondal, S.; Kumar, S.; Mathew, B.; Jeengar, M. K.; Naidu, V. G. M. Attenuation of adjuvant-induced arthritis with carnosic acid by inhibiting mPGES-1, COX-2, and bone loss in male SD rats. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2024**, *46* (4), 538-549. DOI: 10.1080/08923973.2024.2377984
28. Chen, Y.; Wang, Y.; Qin, Q.; Zhang, Y.; Xie, L.; Xiao, J.; Cao, Y.; Su, Z.; Chen, Y. Carnosic Acid Ameliorated Aβ-mediated (Amyloid-B Peptide) Toxicity, Cholinergic Dysfunction and Mitochondrial Defect in *C. elegans* of Alzheimer's Model. *FOOD FUNCT.* **2022**, *13*. Art. No: 4640. DOI: 10.1039/D1FO02965G.
29. Yoshida, H.; Meng, P.; Matsumiya, T.; Tanji, K.; Hayakari, R.; Xing, F.; Wang, L.; Tsuruga, K.; Tanaka, H.; Mimura, J.; et al. Carnosic acid suppresses the production of amyloid-B 1-42 and 1-43 by inducing an α-secretase TACE/ADAM17 in U373MG human astrocytoma

- cells. *Neurosci. Res.* **2014**, *79*, 83-93. DOI: 10.1016/j.neures.2013.11.004
30. Liu, J.; Su, H.; Qu, Q. M. Carnosic Acid Prevents Beta-Amyloid-Induced Injury in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells via the Induction of Autophagy. *Neurochem. Res.* **2016**, *41* (9), 2311-2323. DOI: 10.1007/s11064-016-1945-6
31. Mirza, F. J.; Zahid, S.; Holsinger, R. M. D. Neuroprotective Effects of Carnosic Acid: Insight into Its Mechanisms of Action. *Molecules* **2023**, *28* (5). Art. No: 2306. DOI: 10.3390/molecules28052306
32. Wu, C. R.; Tsai, C. W.; Chang, S. W.; Lin, C. Y.; Huang, L. C.; Tsai, C. W. Carnosic acid protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in in vivo and in vitro model of Parkinson's disease: involvement of antioxidative enzymes induction. *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *225*, 40-46. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.11.011
33. Lipina, C.; Hundal, H. S. Carnosic acid stimulates glucose uptake in skeletal muscle cells via a PME-1/PP2A/PKB signalling axis. *Cell. Signal.* **2014**, *26* (11), 2343-2349. DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.07.022
34. Gaya, M.; Repetto, V.; Toneatto, J.; Anesini, C.; Piwien-Pilipuk, G.; Moreno, S. Antiadipogenic effect of carnosic acid, a natural compound present in *Rosmarinus officinalis*, is exerted through the C/EBPs and PPAR γ pathways at the onset of the differentiation program. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, *1830* (6), 3796-3806. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.03.021
35. Ou, J.; Huang, J.; Zhao, D.; Du, B.; Wang, M. Protective effect of rosmarinic acid and carnosic acid against streptozotocin-induced oxidation, glycation, inflammation and microbiota imbalance in diabetic rats. *FOOD FUNCT.* **2018**, *9* (2), 851-860. DOI: 10.1039/c7fo01508a
36. Quirarte-Báez, S. M.; Zamora-Perez, A. L.; Reyes-Estrada, C. A.; Gutiérrez-Hernández, R.; Sosa-Macías, M.; Galaviz-Hernández, C.; Manríquez, G. G. G.; Lazalde-Ramos, B. P. A shortened treatment with rosemary tea (*Rosmarinus officinalis*) instead of glucose in patients with diabetes mellitus type 2 (TSD). *J. Popul. Ther. Clin. Pharmacol.* **2019**, *26* (4), 18-28. DOI: 10.15586/jptcp.v26i4.634
37. Wang, H.; Wang, J.; Liu, Y.; Ji, Y.; Guo, Y.; Zhao, J. Interaction mechanism of carnosic acid against glycosidase (α -amylase and α -glucosidase). *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *138*, 846-853. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.179
38. Ojeda-Sana, A. M.; Repetto, V.; Moreno, S. Carnosic acid is an efflux pumps modulator by dissipation of the membrane potential in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *29* (1), 137-144. DOI: 10.1007/s11274-012-1166-3
39. Souza, A. B.; de Souza, M. G.; Moreira, M. A.; Moreira, M. R.; Furtado, N. A.; Martins, C. H.; Bastos, J. K.; dos Santos, R. A.; Heleno, V. C.; Ambrosio, S. R.; Veneziani, R. C. Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorffii* oleoresin against periodontal anaerobic bacteria. *Molecules* **2011**, *16* (11), 9611-9619. DOI: 10.3390/molecules16119611
40. Islam, M. T. Diterpenes and Their Derivatives as Potential Anticancer Agents. *Phytother. Res.* **2017**, *31* (5), 691-712. DOI: 10.1002/ptr.5800
41. Allegra, A.; Tonacci, A.; Pioggia, G.; Musolino, C.; Gangemi, S. Anticancer Activity of *Rosmarinus officinalis* L.: Mechanisms of Action and Therapeutic Potentials. *Nutrients* **2020**, *12* (6). Art. No: 1739. DOI: 10.3390/nu12061739
42. Chan, E.; Wong, S.; Chan, H. An overview of the chemistry and anticancer properties of rosemary extract and its diterpenes. *J. HerbMed Pharmacol.* **2021**, *11*, 10-19. DOI: 10.34172/jhp.2022.02.
43. Kakouri, E.; Nikola, O.; Kanakis, C.; Hatziagiapiou, K.; Lambrou, G. I.; Trigas, P.; Kanaka-Gantenbein, C.; Tarantilis, P. A. Cytotoxic Effect of *Rosmarinus officinalis* Extract on Glioblastoma and Rhabdomyosarcoma Cell Lines. *Molecules* **2022**, *27* (19). Art. No: 6348. DOI: 10.3390/molecules27196348
44. Yesil-Celiktas, O.; Sevimli, C.; Bedir, E.; Vardar-Sukan, F. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2010**, *65* (2), 158-163. DOI: 10.1007/s11130-010-0166-4
45. El-Huneidi, W.; Bajbouj, K.; Muhammad, J. S.; Vinod, A.; Shafarin, J.; Khoder, G.; Saleh, M. A.; Taneera, J.; Abu-Gharbieh, E. Carnosic Acid Induces Apoptosis and Inhibits Akt/mTOR Signaling in Human Gastric Cancer Cell Lines. *Pharmaceuticals (Basel)* **2021**, *14* (3). Art. No: 230. DOI: 10.3390/ph14030230
46. Lin, L.; Wu, Q.; Lu, F.; Lei, J.; Zhou, Y.; Liu, Y.; Zhu, N.; Yu, Y.; Ning, Z.; She, T.; Hu, M. Nrf2 signaling pathway: current status and potential therapeutic targetable role in human cancers. *Front. Oncol.* **2023**, *13*, Art. No: 1184079. DOI: 10.3389/fonc.2023.1184079
47. Telkoparan-Akillilar, P.; Panieri, E.; Cevik, D.; Suzen, S.; Saso, L. Therapeutic Targeting of the NRF2 Signaling Pathway in Cancer. *Molecules* **2021**, *26* (5). Art. No: 1417. DOI: 10.3390/molecules26051417
48. Yan, M.; Li, G.; Petiwala, S.; Householter, E. Standardized rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract induces Nrf2/sestrin-2 pathway in colon cancer cells. *J. Funct. Food.* **2015**, *13*, 137-147. DOI: 10.1016/j.jff.2014.12.038
49. Cykowiak, M.; Krajka-Kuźniak, V. Nrf2 jako terapeutyczny punkt uchwytu w profilaktyce i terapii chorób cywilizacyjnych. *Farmacja Współczesna.* **2019**, *12*, 42-49.
50. Magnelli, L.; Schiavone, N.; Staderini, F.; Biagioni, A.; Papucci, L. MAP Kinases Pathways in Gastric Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (8), Art. No: 2893. DOI: 10.3390/ijms21082893 From NLM.
51. Boueroy, P.; Saensa-Ard, S.; Siripong, P.; Kanthawong, S.; Hahnvajanawong, C. Rhinacanthin-C Extracted from *Rhinacanthus nasutus* (L.) Inhibits Cholangiocarcinoma Cell Migration and Invasion by Decreasing MMP-2, uPA, FAK and MAPK Pathways. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2018**, *19* (12), 3605-3613. DOI: 10.31557/apjcp.2018.19.12.3605
52. Jiang, S.; Qiu, Y.; Wang, Z.; Ji, Y.; Zhang, X.; Yan, X.; Zhan, Z. Carnosic Acid Induces Antiproliferation and Anti-Metastatic Property of Esophageal Cancer Cells via MAPK Signaling Pathways. *J. Oncol.* **2021**, *2021*, Art. No: 4451533. DOI: 10.1155/2021/4451533

53. Einbond, L. S.; Wu, H. A.; Kashiwazaki, R.; He, K.; Roller, M.; Su, T.; Wang, X.; Goldsberry, S. Carnosic acid inhibits the growth of ER-negative human breast cancer cells and synergizes with curcumin. *Fitoterapia* **2012**, *83* (7), 1160-1168. DOI: 10.1016/j.fitote.2012.07.006
54. Dang, C. T.; Shapiro, C. L.; Hudis, C. A. Potential role of selective COX-2 inhibitors in cancer management. *Oncology (Williston Park)* **2002**, *16* (5 Suppl 4), 30-36.
55. Cao, Y.; Prescott, S. M. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J. Cell. Physiol.* **2002**, *190* (3), 279-286. DOI: 10.1002/jcp.10068
56. Tsujii, M.; Kawano, S.; DuBois, R. N. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94* (7), 3336-3340. DOI: 10.1073/pnas.94.7.3336
57. Barni, M. V.; Carlini, M. J.; Cafferata, E. G.; Puricelli, L.; Moreno, S. Carnosic acid inhibits the proliferation and migration capacity of human colorectal cancer cells. *Oncol. Rep.* **2012**, *27* (4), 1041-1048. DOI: 10.3892/or.2012.1630
58. Leeman, M. F.; Curran, S.; Murray, G. I. New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression. *J. Pathol.* **2003**, *201* (4), 528-534. DOI: 10.1002/path.1466
59. Cheung, K. J.; Ewald, A. J. A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters. *Science* **2016**, *352* (6282), 167-169. DOI: 10.1126/science.aaf6546
60. Fares, J.; Fares, M.; Khachfe, H.; Salhab, H.; Fares, Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*(1), Art. No: 28. DOI: 10.1038/s41392-020-0134-x
61. Kalluri, R.; Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119* (6), 1420-1428. DOI: 10.1172/jci39104
62. Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2014**, *15* (3), 178-196. DOI: 10.1038/nrm3758
63. Park, S. Y.; Song, H.; Sung, M. K.; Kang, Y. H.; Lee, K. W.; Park, J. H. Carnosic acid inhibits the epithelial-mesenchymal transition in B16F10 melanoma cells: a possible mechanism for the inhibition of cell migration. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (7), 12698-12713. DOI: 10.3390/ijms150712698
64. Wong, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2011**, *30* (1), Art. No: 87. DOI: 10.1186/1756-9966-30-87
65. Su, K.; Wang, C. F.; Zhang, Y.; Cai, Y. J.; Zhang, Y. Y.; Zhao, Q. The inhibitory effects of carnosic acid on cervical cancer cells growth by promoting apoptosis via ROS-regulated signaling pathway. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *82*, 180-191. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.04.056
66. Gao, Q.; Liu, H.; Yao, Y.; Geng, L.; Zhang, X.; Jiang, L.; Shi, B.; Yang, F. Carnosic acid induces autophagic cell death through inhibition of the Akt/mTOR pathway in human hepatoma cells. *J. Appl. Toxicol.* **2015**, *35* (5), 485-492. DOI: 10.1002/jat.3049
67. Dereń-Wagemann, I.; Kietbiński, M.; Kuliczowski, K. Autofagia - proces o dwóch obliczach. *Acta Haematol. Pol.* **2013**, *44* (4), 383-391. DOI: 10.1016/j.achaem.2013.05.003
68. O'Neill, E. J.; Sze, N. S. K.; MacPherson, R. E. K.; Tsiani, E. Carnosic Acid against Lung Cancer: Induction of Autophagy and Activation of Sestrin-2/LKB1/AMPK Signalling. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25* (4). Art. No: 1950. DOI: 10.3390/ijms25041950
69. Nabekura, T.; Yamaki, T.; Hiroi, T.; Ueno, K.; Kitagawa, S. Inhibition of anticancer drug efflux transporter P-glycoprotein by rosemary phytochemicals. *Pharmacol. Res.* **2010**, *61* (3), 259-263. DOI: 10.1016/j.phrs.2009.11.010
70. Özenver, N.; Efferth, T. Cancer combination therapy with carnosic acid. *Biocell* **2022**, *46* (10), 2151-2157. DOI: 10.32604/biocell.2022.019937
71. Shao, N.; Mao, J.; Xue, L.; Wang, R.; Zhi, F.; Lan, Q. Carnosic acid potentiates the anticancer effect of temozolomide by inducing apoptosis and autophagy in glioma. *J. Neurooncol.* **2019**, *141* (2), 277-288. DOI: 10.1007/s11060-018-03043-5
72. González-Vallinas, M.; Molina, S.; Vicente, G.; de la Cueva, A.; Vargas, T.; Santoyo, S.; García-Risco, M. R.; Fornari, T.; Reglero, G.; Ramírez de Molina, A. Antitumor effect of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells. *Pharmacol. Res.* **2013**, *72*, 61-68. DOI: 10.1016/j.phrs.2013.03.010
73. Gocek, E.; Studzinski, G. P. Vitamin D and differentiation in cancer. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2009**, *46* (4), 190-209. DOI: 10.1080/10408360902982128
74. Sharabani, H.; Izumchenko, E.; Wang, Q.; Kreinin, R.; Steiner, M.; Barvish, Z.; Kafka, M.; Sharoni, Y.; Levy, J.; Uskokovic, M.; et al. Cooperative antitumor effects of vitamin D3 derivatives and rosemary preparations in a mouse model of myeloid leukemia. *Int. J. Cancer* **2006**, *118* (12), 3012-3021. DOI: 10.1002/ijc.21736
75. Fotio, Y.; Aboufares El Alaoui, A.; Borruto, A. M.; Acciarini, S.; Giordano, A.; Ciccocioppo, R. Efficacy of a Combination of N-Palmitoylethanolamide, Beta-Caryophyllene, Carnosic Acid, and Myrrh Extract on Chronic Neuropathic Pain: A Preclinical Study. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, Art. No: 711. DOI: 10.3389/fphar.2019.00711
76. Gianni, W.; Carlo, M.; Colangelo, L.; Grotta, G.; Sonato, C.; Cilli, M.; Toto, A.; Minisola, S. Short-term efficacy of a fixed association of Palmitoylethanolamide and other phytochemicals as add-on therapy in the management of chronic pain in elderly patients: a real-world retrospective study. *Geriatric Care* **2018**, *4*. Art. No: 7177. DOI: 10.4081/gc.2018.7177
77. Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (3), 311-335. DOI: 10.1021/np200906s
78. Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*(3), 629-661. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055