



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Igor Ž. Stojanović

**Biološka aktivnost depsidona i atranorina
izolovanih iz lišaja *Hypogymnia physodes***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2016.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Igor Ž. Stojanović

**Biological activity of depsidones and atranorin
isolated from lichen *Hypogymnia physodes***

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2016.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор: др Андрија Шмелцеровић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу

Наслов: Биолошка активност депсидона и атранорина изолованих из лишаја *Hypogymnia physodes*

Резиме:

Циљеви докторске дисертације су остварени одређивањем хемијског састава екстракта *H. physodes*, изоловањем, структурном детерминацијом и испитивањем биолошке активности физодаличне киселине, физодичне киселине, 3-хидроксифизодичне киселине и атранорина. У овој дисертацији испитивана је антиоксидантна активност, цитотоксична активност на ћелије хуманог карцинома грлића материце и тимоцитима пацова, антихолинестеразна активност, антимикуробна активност и утицај на формирање микронуклеуса у хуманим лимфоцитима физодаличне киселине, физодичне киселине, 3-хидроксифизодичне киселине и атранорина.

Антиоксидантна активност и антихолинестеразна активност испитиване су спектрофотометријским методама. Цитотоксична активност на ћелије хуманог карцинома грлића материце и тимоцитима пацова је испитивана МТТ колориметријским тестом и ЦЦК-8 тестом, респективно. Утицај на формирање микронуклеуса у хуманим лимфоцитима испитиван је микронуклеусним тестом. Антимикуробна активност је испитивана микро-дилуционом методом.

Поређењем нама доступне литературе и наведених резултата установљено је да су по први пут урађена испитивања утицаја метанолног екстракта *Hypogymnia physodes* на ћелије хуманог карцинома грлића материце и на број микронуклеуса у хуманим лимфоцитима, утицаја атранорина на број микронуклеуса у хуманим лимфоцитима и активност серумске холинестеразе, антиоксидантне активности 3-хидроксифизодичне киселине и њеног утицаја на тимоците пацова, на број микронуклеуса у хуманим лимфоцитима, на ћелије хуманог карцинома грлића материце и на активност серумске холинестеразе као и утицаја физодичне киселине на тимоците пацова, на број микронуклеуса у хуманим лимфоцитима, на ћелије хуманог карцинома грлића материце и на активност серумске холинестеразе и антиоксидантне активности физодаличне киселине и њен утицај на тимоците пацова, на број микронуклеуса у хуманим лимфоцитима, на ћелије хуманог карцинома грлића материце и на активност серумске холинестеразе.

3-Хидроксифизодична киселина показује већу антиоксидантну активност од комерцијалног антиоксиданса 3,5-ди-*терц*-бутил-4-хидрокситолуена (БХТ) и смањује број микронуклеуса у хуманим лимфоцитима 2,2 пута више од комерцијалног протектанта амифостина што га сврстава у добре кандидате за *in vivo* експерименте.

Научна област:
Научна
дисциплина:

Фармација
Фармацеутска хемија

Кључне речи:

Hypogymnia physodes; физодалична киселина; физодична киселина; 3-хидроксифизодична киселина; атранорин; антиоксидантна активност; цитотоксична активност; антихолинестеразна активност; микронуклеусни тест; антимикробна активност

УДК:

577.12 : 582.282.13

CERIF
класификација:

B 740

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

Dr Andrija Šmelcerović, associate professor of the University of Niš
at Faculty of Medicine

Title:

Biological activity of depsidones and atranorin isolated from lichen
Hypogymnia physodes

Abstract:

The objectives of the doctoral dissertation were achieved by determining the chemical composition of the extracts of *H. physodes*, isolation, structural determination and testing of the biological activity of physodalic acid, physodic acid, 3-hydroxyphysodic acid and atranorin. In this dissertation antioxidant activity, cytotoxic activity on cells of human cervix carcinoma and on rat thymocytes, anticholinesterase activity, antimicrobial activity and influence on the formation of micronuclei in lymphocytes of human blood plasma of physodalic acid, physodic acid, 3-hydroxyphysodic acid and atranorin were investigated

The antioxidant activity and anticholinesterase activity were investigated by spectrophotometric methods. Cytotoxic activity on cells of human cervix carcinoma and rat thymocytes was assayed by a colorimetric MTT assay, and CCK-8 assay, respectively. The impact on the formation of micronuclei in lymphocytes of human blood plasma was investigated by micronucleus test. Antimicrobial activity was tested by using microdilution method.

Comparing the literature available to us, and these results, it was found that for the first time was investigating the effect of *Hypogymnia physodes* methanol extract on cells of human cervical cancer and the number of micronuclei in lymphocytes of human blood plasma, impact of atranorin on the number of micronuclei in lymphocytes of human blood plasma and serum activity cholinesterase, antioxidant activity of 3-hydroxyphysodic acid and its effects on rat thymocytes, the number of micronuclei in lymphocytes of human blood plasma, the cells of the human cervical cancer and the activity of serum cholinesterase and the impact physodic acid on rat thymocytes, the number of micronuclei in human lymphocytes blood plasma, the cells of the human cervical cancer and serum cholinesterase activity and antioxidant activity of physodalic acid and its effect on rat thymocytes, the number of micronuclei in lymphocytes of human blood plasma, the cells of the human cervical cancer and the activity of serum cholinesterase.

3-Hydroxyphysodic acid shows a greater anti-oxidant activity from a commercial antioxidant 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene (BHT), and reduce the number of micronucleus cells in human blood plasma

2.2 times more than the commercial protectant amifostine, recommending it as good candidate for *in vivo* experiments.

Scientific
Field:

Pharmacy

Scientific
Discipline:

Pharmaceutical chemistry

Key Words:

Hypogymnia physodes; physodalic acid; physodic acid; 3-hydroxyphysodic acid; atranorin; antioxidant activity; citotoxic activity; anticholinesterase activity; micronucleus test; antimicrobial activity

UDC:

577.12 : 582.282.13

CERIF
Classification:

B 740

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

Doktorska disertacija "Biološka aktivnost depsidona i atranorina izolovanih iz lišaja Hypogymnia physodes" rađena je u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom "Добијање, физичко-хемијска карактеризација, аналитика и биолошка активност фармаколошки активних супстанци", број 172044, под rukovodstvom vanrednog profesora dr Andrije Šmelcerovića.

*Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru vanrednom profesoru dr **Andriji Šmelceroviću** koji me je strpljivo vodio kroz izradu disertacije prenoseći mi nesebično svoja iskustva. Poštovani profesori, **članovi Komisije**, su doprineli svako u svojoj oblasti, sveobuhvatnosti ove doktorske disertacije na čemu sam im neizmerno zahvalan.*

Igor Stojanović

Mojoj baka Veri

SADRŽAJ

SADRŽAJ

SADRŽAJ	
1. UVOD	1
1.1. Taksonomija i morfologija lišaja <i>Hypogymnia physodes</i>	3
1.2. Sekundarni metaboliti lišaja <i>Hypogymnia physodes</i> i njihova biološka aktivnost.....	6
1.2.1. Hemijski sastav	6
1.2.2. Antimikrobna aktivnost	15
1.2.3. Antioksidantna aktivnost	16
1.2.4. Antikancerogena aktivnost.....	16
1.2.5. Inhibicija aktivnosti enzima.....	17
1.2.6. Ostale biološke aktivnosti	17
2. CILJEVI RADA.....	18
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1. Lišajski materijal	19
3.2. Ekstrakcija	19
3.3. HPLC analiza ekstrakata	19
3.4. Izolovanje fizodalične kiseline, fizodične kiseline, 3-hidroksifizodične kiseline i atranorina	20
3.5. Antioksidantna aktivnost	21
3.5.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola.....	21
3.5.2. Određivanje sposobnosti "hvatanja" (neutralizacije) ABTS ⁻ jon radikala.....	21
3.5.3. Određivanje sposobnosti "hvatanja" (neutralizacije) DPPH [•] radikala	22
3.5.4. Određivanje ukupnog redukcionog kapaciteta (TRP).....	23
3.6. Ispitivanje uticaja depsidona na vijabilnost i proliferaciju timocita pacova.....	24
3.6.1. Određivanje intracelularnih reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS).....	25
3.6.2. Određivanje mitohondrijalnog membranskog potencijala.....	25
3.7. Ispitivanje uticaja izolovanih supstanci na formiranje mikronukleusa u humanim limfocitima	26
3.8. Ispitivanje uticaja depsidona na vijabilnost i proliferaciju ćelija humanog karcinoma grlića materice	27
3.9. Ispitivanje uticaja na aktivnost serumske holinesteraze.....	28
3.10. Određivanje antimikrobne aktivnosti mikrodilucionom metodom.....	29
4. REZULTATI.....	31
4.1. Hemijski sastav.....	31
4.2. Strukturna determinacija depsidona i atranorina.....	34
4.3. Antioksidantna aktivnost	46
4.4. Uticaj ispitivanih supstanci na vijabilnost i proliferaciju timocita pacova	49
4.5. Uticaj ispitivanih supstanci na formiranje mikronukleusa u humanim limfocitima.....	54

SADRŽAJ

4.6. Uticaj ispitivnih supstanci na vijabilnost i proliferaciju ćelija humanog karcinoma grlića materice	58
4.7. Uticaj ispitivnih supstanci na aktivnost serumske holinesteraze.....	62
4.8. Antimikrobna aktivnost.....	64
5. DISKUSIJA	66
5.1. Hemijski sastav.....	66
5.2. Antioksidantna aktivnost	67
5.3. Uticaj ispitivnih supstanci na vijabilnost i proliferaciju timocita pacova ...	68
5.4. Uticaj ispitivanih supstanci na formiranje mikronukleusa u humanim limfocitima.....	69
5.5. Uticaj ispitivnih supstanci na vijabilnost i proliferaciju ćelija humanog karcinoma grlića materice	72
5.6. Uticaj ispitivnih supstanci na aktivnost serumske holinesteraze.....	73
5.7. Antimikrobna aktivnost.....	75
6. ZAKLJUČAK	77
7. LITERATURA.....	81

1. UVOD

Lišaji (lišajevi, lat. *lichenes*) su simbiotički organizmi koji se sastoje od mikobionta (gljive) i fotobionta (alge ili cijanobakterije) i imaju osobine koje nema ni jedna od udruženih vrsta ponaosob. Gljive mogu biti iz porodice askomiceta (*Ascomycetes*), bazidiomiceta (*Basidiomycetes*) i ređe, deuteriomiceta (*Deuteriomycetes*), dok alge pripadaju modrozelenim ili zelenim algama. Količinski preovlađuje gljiva, od nje zavisi izgled lišaja i ona apsorbuje vodu, mineralne soli i gasove potrebne fotobiontu za fotosintezu.

Neki botaničari (Nash, 1996) ovakav odnos smatraju pre nekom vrstom kontrolisanog parazitizma nego simbiozom. Simbioza je vrlo uspešna i lišaji su rasprostranjeni na čitavoj površini zemlje, od pustinjskih predela, preko tropskih šuma do polarnih regiona. Smatraju se najranijim kolonizatorima zemlje, njihovi fosilni ostaci su stari oko 400-600 miliona godina (Taylor i saradnici, 1995). Rastu vrlo sporo (oko 1 cm za godinu dana) zbog slabog intenziteta fotosinteze. Žive jako dugo, za neke arktičke lišaje se smatra da su stari oko hiljadu godina. Rastu na stenama, zemljištu, kori drveća, a u tropskim predelima i na lišću. Mogu se naći i na drugim površinama koje su bile u stanju mirovanja dug vremenski period.

Hemijska ispitivanja lišajeva su fokusirana pretežno na njihove sekundarne metabolite jer sintetišu aromatična jedinjenja koja su karakteristična samo za njih dok ih više biljke ne sintetišu. Ekstrakti lišajeva imaju primenu u medicini (Muller, 2001), poljoprivredi (Dayan i Romagni 2001), kozmetičkoj i parfimerijskoj industriji (Joulain i Tabacchi, 2009). Lišajevi se koriste vekovima u tradicionalnoj medicini i igraju važnu ulogu u alternativnoj medicini u raznim delovima sveta (Huneck, 1991). Poznato je da se lišaj *Hypogymnia physodes* koristi kao sredstvo za bojenje vune u Škotskoj, kao hrana u oblasti Velikih jezera i kao lek u Evropi (Huneck, 1991). Depsidoni su jedna od klasa sekundarnih metabolita koji uglavnom nastaju u lišajevima. Svi depsidoni sadrže 11H-dibenzo[b,e][1,4]dioksepin-11-on prsten, koji je supstituisan u različitim pozicijama. Depsidoni kao sekundarni metaboliti lišaja pokazuju širok "spektar" biološke aktivnosti kao što su: antimikrobna (Ingolfssdottir i saradnici, 1998), antivirusna (Neamati i saradnici, 1997), antineoplastična (Correche i Carrasco 2002) i UV-protektivna (Fernandez i saradnici, 1998). Depsidoni su inhibitori nekih medicinski značajnih enzima kao što su HIV-1 integraza (Neamati i saradnici, 1997), enzimi u metabolizmu arahidonske kiseline (Ingolfssdottir i saradnici, 1996) i protein tirozin fosfataze (Seo i saradnici, 2009). Atranorin spada u grupu depsida β -orcinolskog tipa i ima primenu u medicini, parfimerijskim i kozmetičkim preparatima

UVOD

(Ingólfssdóttir, 2002). Ispitivane su njegove biološke aktivnosti, antimikrobna (Rankovic i saradnici, 2008), antioksidantna (Toledo Marante i saradnici, 2003), inhibicija enzima elastaze (Proksa i saradnici, 1994), antiinflamatorna i analgetička (Bugni i saradnici, 2009).

Hypogymnia physodes (L.) Nyl., (slika 1.) (sinonimi: *Parmelia duplicata* var. *douglasicola* Gyelnik, *Parmelia physodes* (L.) Ach., *Parmelia oregana* Gyelnik; trivijalna imena: monahova kapuljča lišaj, cevasti lišaj, pufnasti lišaj) pretežno sintetiše sekundarne metabolite iz grupe depsidona, fizodičnu, 3-hidroksifizodičnu, fizodaličnu i protocetraričnu kiselinu. Sekundarni metaboliti su locirani u korteksu ili meduli i imaju nekoliko bioloških uloga.



Slika 1. *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. (fotografija sa lokaliteta Donje Vlase, severna padina Seličevice, fotografisao Bojan Zlatković)

UVOD

Depsidi korteksa igraju važnu ulogu u zaštiti fotobionta od intenzivnog zračenja dok medularni depsidoni štite lišaj od insekata i biljojeda. Poznato je da ekstrakti *H. physodes* pokazuju antimikrobno dejstvo (Ranković i saradnici, 2007; Mitrović i saradnici, 2011), kao i fizodična kiselina (Ranković i saradnici, 2008). Pored toga fizodična kiselina inhibira enzim HIV-1 integrazu (Neamati i saradnici, 1997), a fizodalična kiselina inhibira mutacije gena izazvane heterocikličnim aminima (Osawa i saradnici, 1991). Acetonski ekstrakt *H. physodes* pokazuje antifungicidni efekat na neke biljne, životinjske i ljudske patogene mikroorganizme (Halama i van Haluwin, 2004). *H. physodes* može imati ulogu indikatora zagađenosti okoline (Bialonska i Dayan, 2005). Izolovanje sekundarnih metabolita iz lišaja je često otežano zbog ograničenih količina lišaja i sličnih struktura jedinjenja, što uslovljava bliska retenciona vremena pri hromatografskim razdvajanjima i sličnu rastvorljivost pri prekrizalizaciji.

1.1. Taksonomija i morfologija lišaja *Hypogymnia physodes*

Taksonomija je naučna disciplina koja ima za cilj opisivanje, imenovanje i grupisanje jedinki, organizama ili grupa organizama u skladu sa unapred utvrđenim kriterijumima u posebne, manje ili više uniformne i smislene jedinice, entitete ili taksone. Takson (lat. *taxon*, mn. *taxa*) je sistematikom prepoznata grupa organizama koja pripada bilo kom rangu. Grupa organizama jedinstvena sa nekoliko aspekata naziva se vrsta. Vrste se, dalje, takođe prema nekoj svojstvenoj grupi osobina, sistematizuju u veće celine, rodove, više rodova u familije, familije u redove, redovi u razdele a ovi u carstva (Hegnauer, 1986; Singh, 2004). Morfološki karakteri pripadaju grupi najčešće korišćenih karaktera u taksonomiji jer su dostupni i laki za uočavanje (Radford, 1986). Taksonomska pripadnost lišaja *H. physodes* u okviru carstva Fungi prikazana je u tabeli 1.

UVOD

Tabela 1. Taksonomija lišaja *Hypogymnia physodes*

Taksonomske kategorije	Taksoni
Carstvo (Regnum)	Fungi
Razdeo (Divisio)	Ascomycota
Klasa (Classis)	Lecanoromycetes
Red (Ordo)	Lecanorales
Familija (Familia)	Parmeliaceae
Rod (Genus)	<i>Hypogymnia</i>
Vrsta (Species)	<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl. (sinonimi: <i>Parmelia duplicata</i> var. <i>douglasicola</i> Gyelnik, <i>Parmelia physodes</i> (L.) Ach., <i>Parmelia oregana</i> Gyelnik)

Ime roda *Hypogymnia* potiče od grčkih reči *hypo* (ispod) i *gymno* (goli) zbog odsustva rizina na donjem korteksu (slika 2.).



Slika 2. Pojednostavljena šema strukture lisnatih lišajeva. Korteks (1), fotobiont (2), mikobiont (3) i rizini (4)

(preuzeto sa adrese: https://en.wikipedia.org/wiki/Lichen#Identification_methods)

Rod *Hypogymnia* je zastupljen sa oko 100 vrsta širom sveta. Više od 30 vrsta raste u jugozapadnoj Kini (McCune i Wang, 2014), Severnoj Americi i Meksiku 24 (McFarlin, 1991), šest na Grenlandu (Hansen i McCune, 2010) kao i na teritoriji bivše SFRJ (Murati, 1992).

H. physodes pretežno raste na kori drveća (substrat) u šumama hladne i umerene klimatske zone severne hemisfere, mada se može naći i na mahovini i zemljištu. Pri suvom vremenu je

UVOD

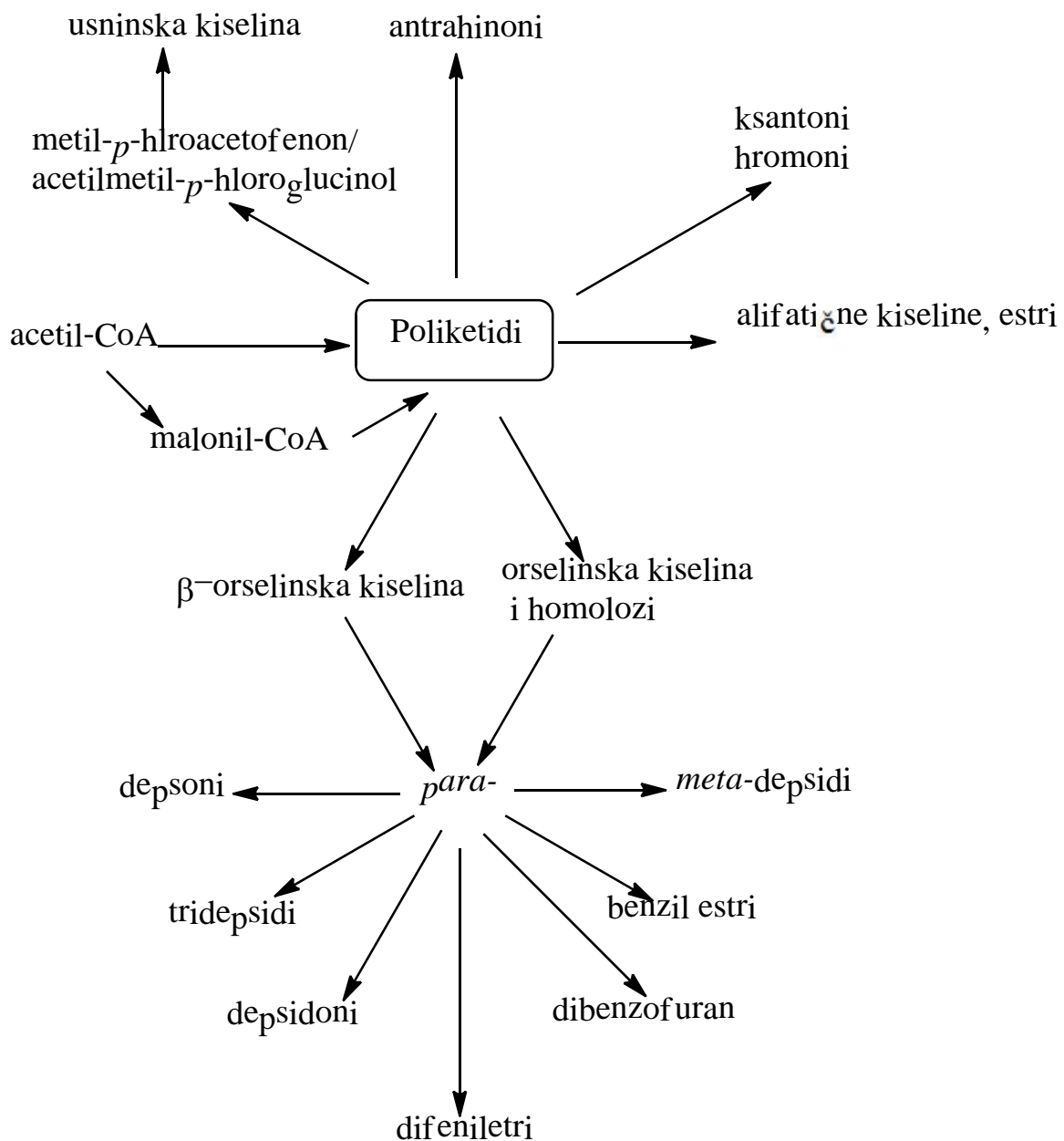
pepeljastosive, a posle kiše je zelenkastosive boje. Talus (vegetativni, nereproduktivni deo lišaja) je lisnat, rozetast, nepravilan, duboko urezan, sa korom (korteksom) i sa gornje i sa donje strane. Donja površina je crna, bez rizina, naborana, tanka, često ispucala, vezana za supstrat adhezionim diskovima ili ređe, celom površinom. Fotobiont je zelena alga *Trebouxia*. Askoma (*ascocarp*, ili *ascoma*, plural: *ascomata*, deo lišaja za proizvodnju spora) je u obliku činije (*apothecial*), bez stalka ili sa vrlo malim stalkom (*sessile* ili *subpedicellate*) po obodu iste boje kao i talus (*lecanorine*), konkavna do ravna, retko perforirana (*disc concave to flat, rarely perforate*), braon do crne boje. Apotecije su veoma retke, prečnika 2-8 mm. U askomi se nalazi veliki broj askusa od kojih svaki sadrži 8 jajastih askospora. Konidija (*conidia* ili *conidium*, aseksualna spora) je cilindrična i prava. Test medule sa alkoholnim rastvorom *para-fenilendiaminom* je pozitivan (P+, žuto-narandžastocrvena) (Murati, 1992).

1.2. Sekundarni metaboliti lišaja *Hypogymnia physodes* i njihova biološka aktivnost

1.2.1. Hemijski sastav

Oko 21 % gljiva ima sposobnost da se udružuje sa algama (fikobiont) i/ili cijanobakterijama (cijanobiont) u procesu lišenizacije (Honegger, 1991; Kirk i saradnici, 2008). Poznato je oko 189000 vrsta lišajeva (Feuerer i Hawksworth, 2007). Interesovanje naučnika za sekundarne metabolite lišajeva datira iz sredine devetnaestog veka i traje do današnjih dana nesmanjenim intenzitetom (Asahina i Shibata, 1954; Culberson, 1969; Huneck i Yoshimura, 1996; Legaz i sardanici, 2011; Stojanović i sardanici, 2012). Uslovljeno je unikatnošću strukture jedinjenja koju sintetišu samo lišajevi a ne i više biljke ili pojedinačno partneri u simbiozi, gljive i alge. Većinu proizvoda sintetišu gljive, koje količinski preovlađuju u lišaju, iz jedinjenja nastalih metabolizmom ugljenih hidrata koje proizvodi alga. U literaturi se koristi nekoliko izraza za ta jedinjenja: lišajski proizvodi, lišajske supstance, lišajske kiseline ili takozvane lišajske kiseline. U dve najznačajnije publikacije (Culberson, 1969; Huneck i Yoshimura, 1969) o lišajima koriste se izrazi lišajski proizvodi i lišajske supstance (respektivno) za sva jedinjenja izolovana iz lišaja. U ovoj disertaciji izraz lišajske supstance se koristi u užem smislu, da označi jedinjenja jedinstvena za lišaje. Postoji više od 800 lišajskih proizvoda sa poznatim hemijskim strukturama (Huneck, 1999) ako se uzmu u obzir samo jedinjenja sintetisana u talusu lišaja. Ako se dodaju i jedinjenja koja sintetiše gljiva u kulturi tkiva stvarni broj prelazi hiljadu (Stocker-Wörgötter, 2008). Postoje četiri grupe jedinjenja karakterističnih za lišajeve: depsidi i tridepsidi, depsidoni, dibenzofuranski derivati i depsoni. Sva navedena jedinjenja se formiraju povezivanjem dve ili, ređe, tri fenolne jedinice (esterifikacijom ili oksidativnim kuplovanjem) koje nastaju acetatno-polimalonatnim biosintetskim putem (Culberson, 1969).

UVOD



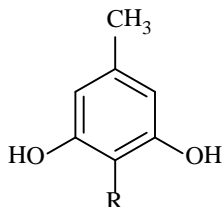
Slika 3. Acetatno-polimalonatni biosintetski put nastajanja lišajskih supstanci (adaptirano iz Elix, 1996).

H. physodes pretežno sintetiše sekundarne metabolite iz grupe orcinol depsidona, fizodičnu i 3-hidroksifizodičnu kiselinu i β -orcinol depsidon, fizodaličnu kiselinu. U znatno manjoj količini sintetiše β -orcinol depsidone, protocetraričnu i konfizodaličnu kiselinu, orcinol depsidone 2'-O-metilfizodičnu kiselinu, 4-O-metilfizodičnu i α -alektoroničnu kiselinu, i β -orcinol

UVOD

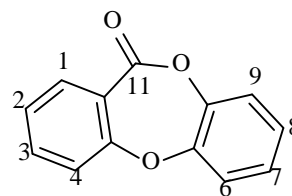
depside atranorin i hloratranorin (Bialonska i Dayan, 2005; Molnar i Farkas 2011; Latkowska i sardanici, 2015). Kao i kod ostalih vrsta lišaja, sekundarne metabolite *H. physodes* proizvodi gljiva partner i deponovani su ekstracelularno kao kristali na površini hifa; depsidoni u meduli a depsidi u korteksu (Elix i Stocker-Wörgötter, 2008).

Svi depsidoni sadrže 11H-dibenzo[*b,e*][1,4]dioksepinski-11-on-ski skelet (slika 4.) koji je supstituisan u različitim pozicijama raznim supstituentima. Najčešće, depsidoni se sastoje od orcinolnih ili β -orcinolnih jedinica (slika 4.) koje su povezane etarskom i estarskom vezom.



orcinol: R=H

β -orcinol: R=CH₃



11H-dibenzo[*b,e*][1,4]dioksepinski-11-on

Slika 4. Strukture orcinola, β -orcinola i 11H-dibenzo[*b,e*][1,4]dioksepinski-11-ona

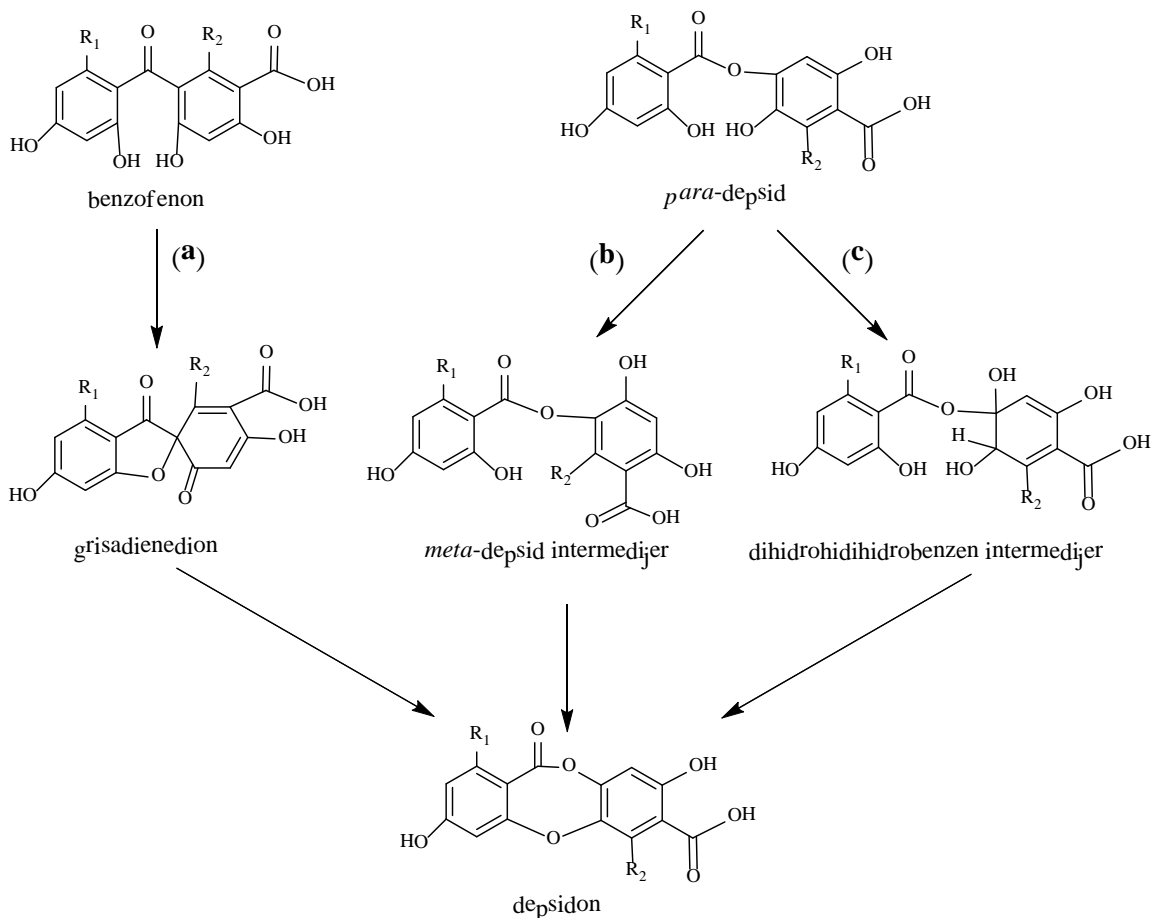
Neki bioaktivni depsidoni su pronađeni u gljivicama i višim biljkama. Folipastatin, inhibitor fosfolipaze A2 je izolovan iz *Aspergillus unguis* (Hamano i sardanici, 1992). Mutageni mollicellini B, C, D, E, F, G i H su pronađeni u *Chaetomium mollicellum* (Stark i saradnici, 1978), citotoksični botriorhodin A i B su izolovani iz *Botriosphaeria rhodina* (Abdou i saradnici, 2010), corinesidoni A i B, inhibitori aromataze, su identifikovani u *Corinespora cassicola* L36 (Chomcheon i saradnici, 2009).

Većina depsidona orcinol tipa ima keto grupu u α ili β položaju bočnog niza prvog prstena. Ova grupa ima jak efekat na estarsku vezu između dva prstena jer se vrlo lako formiraju enol laktoni. Slična interakcija može favorizovati nastajanje depsidona stabilizirajući konformaciju koja favorizuje ciklizaciju (Culberson, 1969).

Biosinteza depsidona je prvo bila objašnjavana preko hipoteze koja obuhvata oksidativno kuplovanje *para*-depsida. Sala i Sardžent su postulirali da depsidoni mogu nastati od benzofenona preko intermedijera grisadienediona (šema 1, put (a)). Ova teorija je potvrđena hemijskom sintezom u kojoj oksidativnim kuplovanjem odgovarajućih benzofenona nastaju grisadienedioni, koji se transformišu do depsidona u kiseloj sredini na povišenoj temperaturi (Sala i Sargent, 1981). Elix i njegovi saradnici su predložili teoriju biosinteze depsidona preko

UVOD

meta-depsidnih intermedijera (šema 1, put (b)), koja je podržana hemijskom sintezom depsidona, divaronične kiselina i stenosporonične kiseline (Elix i saradnici, 1987). Najskorija hipoteza pretpostavlja da se biosinteza depsidona odvija oksidacijom *para*-depsida dioksidgenazom, nakon koje sledi ciklizacija dihidroksidihidrobenskog inermedijera (šema 1, put (c)) (Stocker-Wörgötter, 2008).



Šema 1. Predloženi putevi biosinteze depsidona iz lišaja (put (a) je zasnovan na radu Sala i Sargent-a (1981), put (b) se zasniva na radu Elix-a i saradnika (1987), a put (c) na radu Stocker-Wörgötter-a (2008).

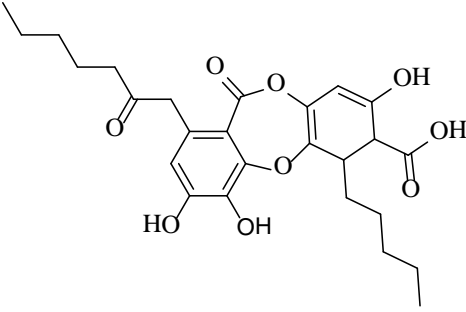
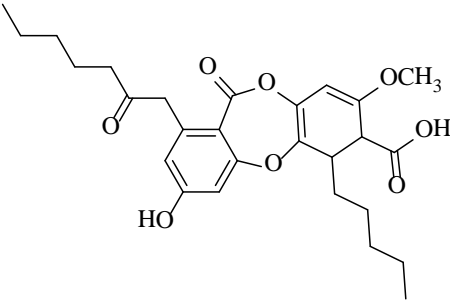
Objavljeni radovi o biološkoj aktivnosti sekundarnih metabolita *H. physodes* se pretežno odnose na fizodičnu kiselinu i atranorin (tabela 2.) zbog njihove dostupnosti. Naime, i fizodična kiselina i atranorin se nalaze u visokom procentu u ekstraktima više vrsta lišajeva zbog čega ih je relativno lako izolovati u dovoljnim količinama za ispitivanje biološke aktivnosti što nije slučaj sa manje zastupljenim komponentama.

UVOD

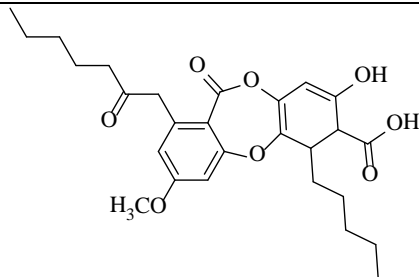
Tabela 2. Uobičajna imena, hemijska imena, strukture, grupa jedinjenja kojoj pripadaju i biološka aktivnost sekundarnih metabolita *Hypogymnia physodes*

Trivijalno ime, grupa jedinjenja	Hemijsko ime i struktura	Aktivnost (referenca)
Fizodična kiselina (fizodalin); orcinol depsidon	3,8-dihidroksi-11-okso-1-(2-oksoheptil)-6-pentil-11 <i>H</i> -dibenzo [<i>b,e</i>] [1,4] dioksepin-7- karboksilna kiselina	Antimikrobna (Turk i saradnici, 2006; Ranković i saradnici, 2008; Kosanić i Ranković, 2011; Ranković i saradnici, 2013; Kosanić i saradnici, 2013)
		<p>Antioksidantna (Ranković i saradnici, 2013; Kosanić i saradnici, 2013; Emsen i saradnici, 2016)</p> <p>Citotoksična (Ranković i saradnici, 2013; Kosanić i saradnici, 2013; Studzińska-Sroka i saradnici 2016; Emsen i saradnici, 2016)</p> <p>Inhibicija HIV-1 integraze (Neamati i saradnici, 1997)</p> <p>Inhibicija M-faznog fosfoproteina 1 (Talapatra i saradnici, 2016)</p>

UVOD

<p>3- hidroksifizodična kiselina (fizodol); orcinol depsidon</p>	<p>3,4,8-trihidroksi-11-okso-1-(2- oksoheptil)--6-pentil-11<i>H</i>- dibenzo[b,e][1,4]dioksepin-7- karboksilna kiselina</p>	<p>Antimikrobna (Yilmaz i saradnici, 2005)</p>
		
<p>2'-O- metilfizodična kiselina; orcinol depsidon</p>	<p>3-hidroksi-8-metoksi-11-okso-1-(2- oksoheptil)-6-pentil-11<i>H</i>-dibenzo [b,e] [1,4] dioksepin-7- karboksilna kiselina</p>	<p>-</p>
		
<p>4-O- metilfizodična kiselina; orcinol depsidon</p>	<p>3-hidroksi-9-metoksi-6-okso-7-(2- oksoheptil)-1- pentilbenzo[b][1,4]benzodioksepin- 2-karboksilna kiselina</p>	<p>-</p>

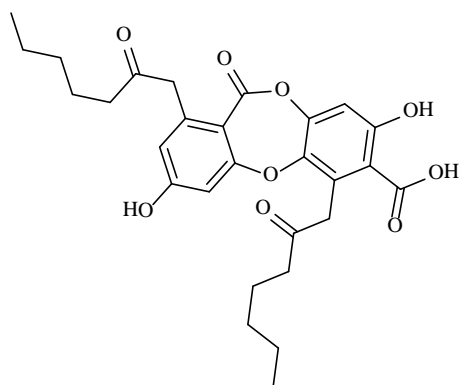
UVOD



α -alektoronična kiselina;
orcinol depsidon

3,8-dihidroksi-11-okso-1,6-bis(2-oksoheptil)-11*H*-dibenzo[*b,e*][1,4]dioxepin-7-karboksilna kiselina

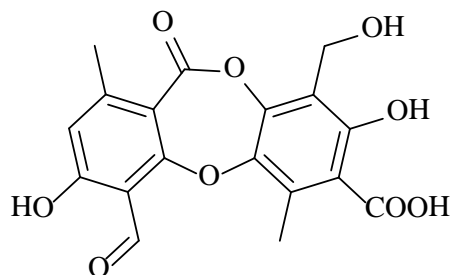
Citotoksična
(Millot i saradnici, 2007)



Protocetrarična kiselina;
 β -orcinol depsidon

4-formil-3,8-dihidroksi-9-(hidroksimetil)-1,6-dimetil-11-okso-11*H*-dibenzo[*b,e*][1,4]dioxepin-7-karboksilna kiselina

Antimikrobna
(Tay i saradnici, 2004, Ranković i saradnici, 2008, Ranković i Mišić, 2008)

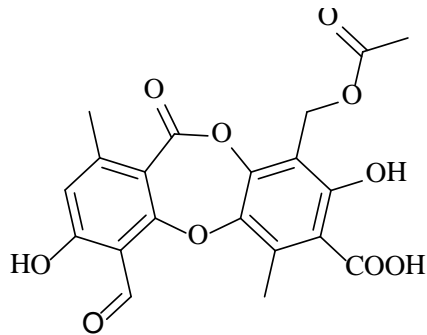


Antioksidantna
(Manojlović i saradnici 2012)

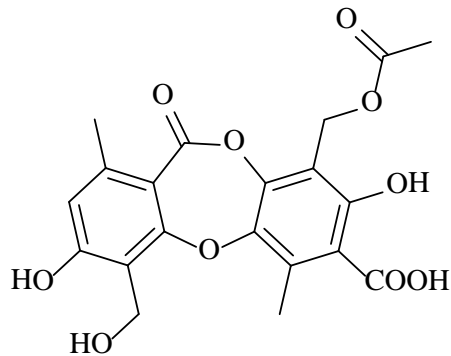
Citotoksična
(Ranković i saradnici, 2008)

UVOD

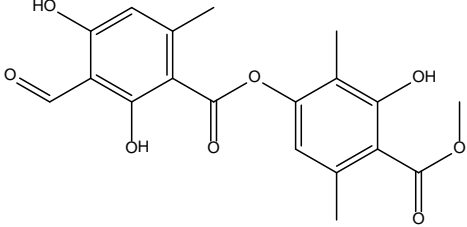
Fizodalična kiselina; β -orcinol depsidon	9-(acetoksimetil)-4-formil-3,8- dihidroksi-1,6-dimetil- 11-okso-11 <i>H</i> - dibenzo[<i>b,e</i>][1,4]dioksepin-7- karboksilna kiselina	Inhibira mutacije gena izazvane heterocikličnim aminima (Osawa i saradnici, 1991)
----------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------



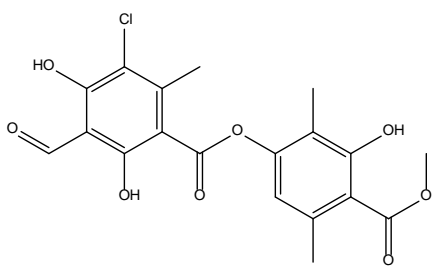
Konfizodalična kiselina; β -orcinol depsidon	9-(acetoksimetil)-4-(hidroksimetil)- 3,8-dihidroksi-1,6-dimetil- 11-okso-11 <i>H</i> - dibenzo[<i>b,e</i>][1,4]dioksepin-7- karboksilna kiselina	-
-------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---



UVOD

Atranorin (Parmelin; Usnarin; Atranorična kiselina); β -orcinol depsid	(3-hidroksi-4-metoksikarbonil-2,5- dimetilfenil) 3-formil-2,4-dihidroksi- 6-metilbenzoat	Antimikrobna (Toledo Marante i saradnici 2003; Halam i van Haluwin, 2004; Turk i saradnici, 2006; Ranković i saradnici, 2008; Ranković i saradnici, 2013)
		Antioksidantna (Toledo Marante i saradnici 2003; Ranković i saradnici, 2013)
		Citotoksična (Toledo Marante i saradnici 2003; Bačkorova i saradnici, 2011; Ranković i saradnici, 2013)
		Inhibicija elastaze (Proksa i saradnici, 1994)
		Uticaj na zarastanje rana (Barreto i saradnici, 2013)
		Antinflamatorna (Bugni i saradnici, 2008, Kumar i Müller, 1999)
		Analgetska (Bugni i saradnici, 2009)
		UV protektivna (Fernandez i saradnici, 1998; Varol i saradnici, 2015)

UVOD

Hloratranorin; β -orcinol depsid	3-hidroksi-4-metoksikarbonil-2,5- dimetilfenil) 5-hloro-3-formil-2,4- dihidroksi-6-metilbenzoat	Antimikrobna (Turk i saradnici, 2006)
		Antinfamatorna (Bugni i saradnici, 2008, Kumar i Müller, 1999)
		Analgetska (Bugni i saradnici, 2009)

1.2.2. Antimikrobna aktivnost

Rezultati ispitivanja Turk-a i saradnika (2006) pokazuju da fizodična kiselina i hloratranorin ne deluju na pet (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. syringae*, *S. typhimurium*) od 15 testiranih bakterija i kvasaca. Pored navedenih, fizodična kiselina ne deluje i na *A. hydrophila* a hloratranorin na *S. faecalis*. Fizodična kiselina i atranorin nisu aktivni prema 11 ispitivanih vrsta gljivica, dok hloratranorin pokazuje aktivnost prema *A. alternata*, *A. citri*, *A. rabiei*, *A. tenuissima*, *F. culmorum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. solani*, i *P. notatum* a neaktivan je prema *A. niger* i *G. graminis*. Za razliku od Turk-a i saradnika (2006) objavljeni su radovi u kojima je utvrđeno da fizodična kiselina i/ili atranorin pokazuju antimikrobnu aktivnost na bakterije, gljivice i kvasce (Ranković i saradnici, 2008; Kosanić i Ranković, 2011; Ranković i saradnici, 2013; Kosanić i saradnici, 2013). Toledo Marante i saradnici (2003) su utvrdili da atranorin deluje na *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* i *P. aeruginosa*. Halama i van Haluwin (2004) su pokazali da acetonski ekstrakt *H. physodes* i atranorin ispoljavaju inhibitornu aktivnost na 8 vrsta fitopatogenih gljivica: *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani*, *Stagonospora nodorum* i *Ustilago maydis*. Dok su Tay i saradnici (2004) konstatovali da protocetrarična kiselina ne pokazuje aktivnost prema 13 ispitivanih mikroorganizama, a aktivna je samo prema *C. albicans* i prema *C. glabrata*, Ranković i Mišić (2008) su objavili da protocetrarična kiselina ima antimikrobni efekat na 16 mikroorganizama. Yilmaz i saradnici (2005) su ustanovili da 3-hidroksifizodična kiselina ne pokazuje antimikrobnu aktivnost prema *P. aeruginosa*, *P. syringae*,

UVOD

Y. enterocolitica, *A. hydrophila*, *K. pneumoniae* i *C. glabrata* ali ima izrazito niske vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije za *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. faecalis* i *C. albicans*. Ranković i saradnici (2007) su ispitivali aktivnost metanolnog, acetonskog i vodenog ekstrakta na šest bakterija i 10 gljiva. Utvrđeno je da metanolni ekstrakt ispoljava najjači antimikrobni efekat dok vodeni ekstrakti ne pokazuju antimikrobnu aktivnost. Mitrović i saradnici (2011) su takođe utvrdili antimikrobnu aktivnost metanolnog ekstrakta prema 29 mikroorganizama.

1.2.3. Antioksidantna aktivnost

Za razliku od antimikrobne aktivnosti, gde postoji izvesno neslaganje rezultata, svi objavljeni radovi ukazuju na značajnu antioksidativnu aktivnost fizodične kiseline (Ranković i saradnici, 2014; Kosanić i saradnici, 2013; Emsen i saradnici, 2016), protocetrarične kiseline (Manojlović i saradnici, 2012) i atranorina (Ranković i saradnici, 2013; Toledo Marante i saradnici, 2003). Značajna antoksidativna aktivnost je konstatovana i za metanolne (Kosanić i saradnici, 2011; Mitrović i saradnici, 2011), acetonske i vodene ekstrakte *H. physodes* (Kosanić i saradnici, 2011).

1.2.4. Antikancerogena aktivnost

Ispitivanja su pokazala da sekundarni metaboliti *H. physodes* kao i njeni ekstrakti ispoljavaju citotoksičnu aktivnost prema ćelijama velikog broja kancerskih ćelijskih linija. Dokazano je da su fizodična kiselina, protocetrarična kiselina i atranorin citotoksični za ćelije ćelijske linije melanoma FemX i kancera debelog creva LS174 (Kosanić i sardanici, 2013; Manojlović i saradnici, 2012, Ranković i sardanici, 2014, respektivno). Fizodična kiselina pokazuje citotoksičnost prema ćelijama U87MG-GBM, amnionskim fibroblastima (HAFs), ćelijama ćelijskih linija kancera dojke MDA-MB-231, MCF-7 i T-47D (Emsen i sardanici, 2015; Studzińska-Sroka i saradnici, 2016, respektivno). Millot i saradnici (2007) su utvrdili citotoksičnu aktivnosti α -alektoronične kiseline na B16 ćelije melanoma. Toledo Marante i saradnici (2003) su utvrdili da atranorin ima umerenu aktivnost na ćelije leukemijskih linija U937 i HL-60. Bačkorova i saradnici (2011) su ustanovili citotoksičnost atranorina na ćelije različitih humanih kancerskih linija (A2780, HeLa, MCF-7, SK-BR-3, HT-29, HCT-116 p53^{+/+}, HCT-116 p53^{-/-}, HL-60 i Jurkat). Mitrović i saradnici (2011) su utvrdili da metanolni ekstrakt ima citotoksični efekat na ćelije HCT-116 linije raka debelog creva.

1.2.5. Inhibicija aktivnosti enzima

Neamati i saradnici (1997) su ispitivali uticaj 17 depsida i depsidona izolovanih iz lišajeva i njihovih sintetičkih derivata na aktivnost pojedinih enzima. Utvrđeno je da su depsidoni, među njima i fizodična kiselina, bili inhibitori HIV-1 integraze, dok depsidi nisu bili inhibitori ovog enzima, što pokazuje važnost rigidnog policikličnog sistema za HIV-1 enzim-inhibitornu aktivnost. Talapatra i saradnici (2016) su utvrdili da fizodična kiselina inhibira M-fazni fosfoprotein 1 (MPP1) čiji je sadržaj povećan kod različitih tipova karcinoma bešike. Atranorin inhibira aktivnost elastaze (Proksa i saradnici, 1994). Bugni i saradnici (2009) su utvrdili da glavne komponente lišaja *Parmotrema saccatilobum*, atranorin i hloratranorin, inhibiraju COX-1 i COX-2 enzime uključene u inflamatorne i analgetičke procese.

1.2.6. Ostale biološke aktivnosti

Istraživanja su pokazala da atranorin imaju značajnu fotosenzitivnu aktivnost koja štiti lišaj od ultraljubičastog zračenja, ali da ispoljena citotoksičnost može biti prepreka za njegovu upotrebu u zaštiti kože od UV zračenja kod ljudi (Varol i saradnici, 2015). Takođe je utvrđeno da atranorin utiče i na brzinu zarastanja rana (Barreto i saradnici, 2013).

2. CILJEVI RADA

Imajući u vidu potrebu za ispitivanjem biološke aktivnosti ekstrakata i "čistih" sekundarnih metabolita lišaja *H. physodes* cilj ove doktorske disertacije bio je:

- određivanje hemijskog sastava ekstrakata lišaja *H. physodes* (L.) Nil.,
- izolovanje depsidona i atranorina i strukturna determinacija izolovanih supstanci,
- određivanje antioksidantne aktivnosti izolovanih supstanci,
- ispitivanje uticaja izolovanih supstanci na vijabilnost i proliferaciju ćelija humanog karcinoma grlića materice i timocita pacova,
- ispitivanje uticaja izolovanih supstanci na formiranje mikronukleusa u humanim limfocitima,
- ispitivanje uticaja izolovanih supstanci na aktivnost serumske holinesteraze i
- određivanje antimikrobne aktivnosti izolovanih supstanci.

Za ostvarivanje ciljeva doktorske disertacije korišćene su sledeće metode:

- ekstrakcija osušenog i usitnjenog lišaja,
- tankoslojna hromatografija za izbor eluenta i spajanje frakcija,
- hromatografija na koloni za razdvajanje konstituenata,
- hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) za razdvajanje konstituenata i određivanje čistoće izolovanih jedinjenja,
- UV, ^1H , ^{13}C -NMR spektroskopija i masena spektrometrija za strukturnu determinaciju,
- spektrofotometrijske metode za određivanje antioksidantne aktivnosti i uticaja na aktivnost serumske holinesteraze,
- MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) kolorimetrijski test i CCK-8 (Cell Counting Kit) test za ispitivanje vijabilnosti i proliferacije ćelija humanog karcinoma grlića materice i timocita pacova, respektivno,
- mikronukleusni test za ispitivanje uticaja na formiranje mikronukleusa humanim limfocitima
- mikrodiluciona metoda za određivanje antimikrobne aktivnosti.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Lišajski materijal

Lišaj *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., (syn: *Parmelia duplicata* var. *douglasicola* Gyelnik, *Parmelia physodes* (L.) Ach., *Parmelia oregana* Gyelnik; narodna imena: monahova kapuljča lišaj, cevasti lišaj, pufnasti lišaj) je sakupljen sa stabla domaće šlive (*Prunus domestica*) na lokalitetu Donje Vlase (Grcke Pojate), severne padine planine Seličevica, Srbija (43° 16' 18,6" geografska širina, 21° 55' 07,6" geografska dužina, 354 m nadmorska visina) septembra 2011. godine. Sakupljeni materijal je pažljivo odvojen od ostatka kore, sušen 10 dana na sobnoj temperaturi (25 °C), bez direktne izloženosti suncu. Vaučer je deponovan u Herbarijumu Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu (br. vaučera 6576). Identifikaciju je izvršio dr Bojan Zlatković, vanredni profesor Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-Matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu.

3.2. Ekstrakcija

Sprašeni lišaj (10,0 g) je kvantitativno prenet u tamnu bocu i preleven sa 100 mL rastvarača (metanola, acetona i etra). Smeša je 30 minuta ekstrahovana u ultrazvučnom kupatilu (Maget, Bela Palanka, Srbija), a zatim ostavljena da stoji 24 sata na tamnom mestu. Nakon toga smeša je filtrirana kroz filter papir bela traka, na običnom levku. Ostatak je ispran tri puta sa po desetak mililitara rastvarača. Rastvarač je uparen na rotacionom vakuum-uparivaču na temperaturi od 40 °C. Prinosi metanolnog, acetonskog i etraskog ekstrakta su bili 10,8 % , 7,3 % i 5,2 % , respektivno.

3.3. HPLC analiza ekstrakata

Snimanje HPLC hromatograma (slike 8-10) je urađeno na HPLC hromatografu sa DAD detektorom (HPLC system 1200 series, Agilent Technologies, USA). Razdvajanje je ostvareno pomoću Zorbax XDB C18 kolone (5 µm, 150 mm x 4,6 mm) na 25 °C. Mobilna fazu je činio 80 %-tni vodeni rastvor MeOH, koji sadrži 0,2 % mravlje kiseline (HPLC čistoće, MERCK). Protok je bio 0,5 mL/min a injektirano je 5µL rastvora koncentracije 1 mg/mL suvog ekstrakta. Hromatogram su snimani na 254 nm. Konstituenti ekstrakta su identifikovani poredjenjem

MATERIJALI I METODE

njihovih retencionih vremena sa retencionim vremenima standarda izolovanih i identifikovanih u prethodnim eksperimentima.

3.4. Izolovanje fizodalične kiseline, fizodične kiseline, 3-hidroksifizodične kiseline i atranorina

Preparativna HPLC je rađena na istom hromatografu kao i analitička HPLC (HPLC system 1200 series, Agilent Technologies, USA) sa semipreparativnim DAD detektorom (diode array detector), i Zorbax Eclipse XDB-C18 Semi-Prep, 5 μ m, 9,4 \times 250 mm kolonom. Mobilna faza, metanol:voda:mravlja kiselina (80:20:0,2, v:v:v), je upumpavana pri protoku od 4,0 mL, dok je injekciona zapremina bila 50 μ L rastvora koncentracije 50 mg/mL suvog metanolnog ekstrakta pri temperaturi od 25 $^{\circ}$ C. Nakon dvadeset injektovanja izolovano je 12 mg fizodalične kiseline (**1**), 14 mg fizodične kiseline (**2**) i 7,5 mg 3-hidroksifizodične kiseline (**3**). Mase molekulskih jona izolovanih jedinjenja su određene na TOF (time of flight) masenom sperkrometru u negativnom modu. NMR spektri izolovanih komponenti se snimani na Varian Gemini 200 (1 H na 200 MHz, 13 C na 50 MHz) spektrometru. Tačke topljenja (TT) su određivane na aparatu za održavanje tačke topljenja sa mikroskopom (EUD5, EUinstruments, Saragosa, Španija).

Za izolovanje većih količina konstituenta ekstrakata korišćena je hromatografija na stubu silika-gela. Metanolni ekstrakt nakon ispiranja toluenom je hromatografisan na stubu od 60 g SG (60-230 mesh-a, 0,063-0,200 mm) eluentom benzen:aceton:sirćetna kiselina (90:20:4). Suvi ekstrakt je nanet na kolonu, bez rastvaranja, tako što je ostavljen eluent iznad površine adsorbensa u visini od par centimetara i pažljivo dodat suvi ekstrakt. Eluent je ispuštan sporo da bi se smeša dobro adsorbovala na silika gelu brzinom od par kapi u sekundi. Izolovano je 201,2 mg jedinjenja **1** (HPLC čistoće 93,8 %), 185 mg jedinjenja **2** (HPLC čistoće 95,6 %) i 68,9 mg jedinjenja **3** (HPLC čistoće 94,5 %).

Atranorin (**4**) je izolovan po postupku opisanom u radu Lukač-a i Onderk-e (2006). Suvi ekstrakt (1,6 g) je tri puta ispran toluenom, dobijeni rastvor je ostavljen da stoji preko noći, iskristalisano jedinjenje je profiltrirano i ostavljeno da se suši. Dobijeno jedinjenje **4** je prekrystalisano iz acetona. Izolovano je 19 mg, HPLC čistoće 99,4 %.

3.5. Antioksidantna aktivnost

3.5.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Određivanje sadržaja ukupnih fenola se zasniva na reakciji redukcije šestovalentnog molibdena (žuto obojen) u petovalentni molibden (plavo obojen):

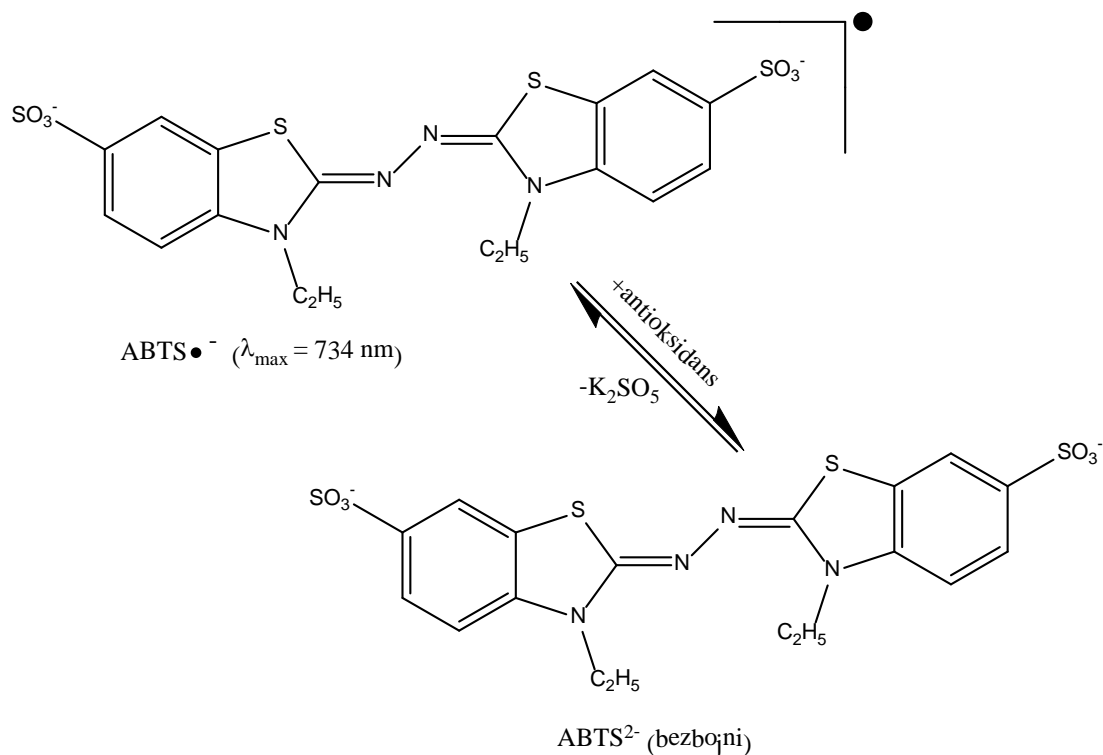


Ukupan sadržaj fenola je određivan spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu reagensa korišćenjem poznate metode (Stratil i saradnici, 2006). Reakciona smeša pripremljena je mešanjem 50 μ L uzoraka različitih koncentracija (0,5, 1,0 i 5,0 mg/mL), 0,625 mL Folin-Ciocalteu reagensa (Sigma Chemicals Co (St. Louis, MO, USA), 2,5 mL 20% Na₂CO₃ (Merck, Germany) i dopunjena do 10 mL destilovanom vodom. Napravljeni rastvori su ostavljeni 30 minuta u mraku. Nakon perioda inkubacije, apsorbancija je merena na 750 nm na Perkin-Elmer Lambda 15 spektrofotometru.

3.5.2. Određivanje sposobnosti "hvatanja" (neutralizacije) ABTS[•] jon radikala

Određivanje sposobnosti "hvatanja" (neutralizacije) ABTS[•] jon radikala se zasniva na reakciji (Huang i saradnici, 2005) prevođenja jon radikala (plavo obojen) antioksidantom u ABTS²⁻ jon koji je bezbojan (slika 5). Antioksidantna aktivnost u odnosu na ABTS[•] radikal je određivana po modifikovanoj metodi Re i saradnika, (1999). S obzirom da se meri slabljenje intenziteta plave boje, manja apsorbancija ukazuje na veći antioksidativni kapacitet.

MATERIJALI I METODE



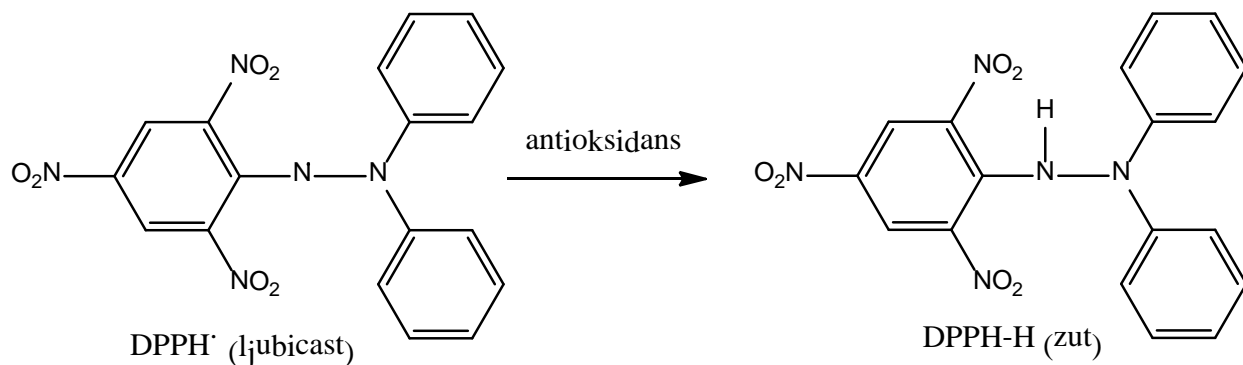
Slika 5. Reakcije na kojima se zasniva određivanje sposobnosti "hvatanja" (neutralizacije) ABTS^{•-} jon radikala

ABTS^{•-} je dobijen u reakciji ABTS²⁻ sa kalijum-persulfatom stajanjem reakcione smeše 12-16 sati pre upotrebe. Reakciona smeša (7 mL) je razblažena sa 120 mL metanola da bi se dobio rastvor koji apsorbuje $0,7 \pm 0,02$ jedinica na 734 nm. Pedeset μL uzoraka različitih koncentracija (0, 5, 1,0 i 5,0 mg/mL) je mešano sa 1,9 mL razblaženog rastvora ABTS^{•-} (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) (Sigma Aldrich, Germany). Nastala smeša je ostavljena 6 min na sobnoj temperaturi a zatim je apsorbanca merena pri 734 nm na Perkin-Elmer Lambda 15 spektrofotometru.

3.5.3. Određivanje sposobnosti "hvatanja" (neutralizacije) DPPH[•] radikala

2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH[•]) je stabilan sintetski radikal koji u reakciji sa nekim jedinjenjima prelazi u neutralni oblik (DPPH-H) (slika 6). Ova transformacija se prati prelaskom ljubičaste boje rastvora DPPH[•] u žutu boju rastvora DPPH-H na 515 nm.

MATERIJALI I METODE



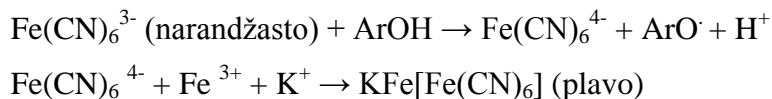
Slika 6. Reakcija na kojoj se zasniva određivanje sposobnosti "hvatanja" (neutralizacije) DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala

Antioksidantna aktivnost u odnosu na DPPH[•] radikal je određivana po metodi Wojdylo i saradnika (2007). Reakciona smeša je pripremljena mešanjem 10 μL uzoraka različitih koncentracija, 1 mL 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (La Chema, Nemačka) koncentracije 90 $\mu\text{mol/L}$ i dopunjavanjem metanolom (VWR International S.A.S, Francuska), do ukupne zapremine od 4 mL. Nastala reakcina smeša je ostavljena da stoji 60 min u mraku a zatim je merena apsorbanacija na 515 nm na Perkin-Elmer Lambda 15 spektrofotometru. Metanol je korišćen kao slepa proba. 3,5-Di-*tert*-butil-4-hidroksitoluen (BHT, Zorka, Serbia) je upotrebljen kao pozitivna kontrola. Procenat neutralizacije radikala je izračunat po formuli:

$$\% \text{ Radical Scavenging Capacity (DPPH}^{\bullet}) = 100 \times (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorak}} / A_{\text{kontrola}})$$

3.5.4. Određivanje ukupnog redukcionog kapaciteta (TRP)

Određivanje ukupnog redukcionog kapaciteta (Total Reducing Power, TRP) se zasniva na reakciji redukcije $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (narandžasto) u $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ koji gradi plavo obojen kompleks sa jonima Fe^{3+} i K^+ .



Redukcioni kapacitet je određivan po metodi Oyaiyu (1986). Smeša 10 μL uzoraka različitih koncentracija, 1 mL 1% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Merck, Nemačka) i 1 mL fosfatnog pufera (0,2 mol/L, pH

MATERIJALI I METODE

6,6) (Zorka, Srbija) je inkubirana na 50 °C tokom 30 minuta. Nakon toga je dodat 1 mL 10 % rastvora trihlorsirćetne kiseline (Merck, Nemačka) i nastala smeša je centrifugirana na 3000 rpm tokom 10 minuta. Nakon centrifugiranja, u supernatant je dodato 0,6 mL 0,1 % rastvora gvožđe(III)-hlorida (Merck, Nemačka) i dopunjeno destilovanom vodom do 5 mL. Apsorbancija nastale smeše je merena na 700 nm na Perkin-Elmer Lambda 15 spektrofotometru. Fosfatni pufer je služio kao slepa proba. Askorbinska kiselina (Sehrlau, Nemačka) i 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroksitoluen (BHT) su korišćeni kao pozitivna kontrola.

3.6. Ispitivanje uticaja depsidona na vijabilnost i proliferaciju timocita pacova

U eksperimentima su korišćeni mužjaci Wistar pacova (150–180 g), stari 8 do 10 nedelja. Pacovi su odgajani prema nacionalnim propisima vezanim za zaštitu dobrobiti životinja u Vivarijumu Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu Medicinskog fakulteta u Nišu.

Timociti pacova su izolovani kao što je opisano u radovima Pavlovića i saradnika (2007) i Cekića i saradnika (2011). Ukratko, timus je aseptično uklonjen i stavljen u hranljiv medijum. Timociti su oslobođeni pritiskanjem timusa kroz čelično sito. Stroma je uklonjena filtriranjem ćelijske suspenzije kroz sterilni najlon filter. Nakon toga, ćelije su ispirane dva puta hranljivim medijumom. Vijabilnost izolovanih ćelija je bila preko 95% određena pomoću testa isključivanja tripan-plavog. Izolovani timociti su brojani i podešeni na gustinu od 5×10^6 ćelija po mL hranljivog medijuma. Hranljivi medijum je pripremljen korišćenjem RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, Mo., USA), prateći uputstva proizvođača. Sastav hranljivog medijum je bio: 25 mM HEPES-a, 2 mM glutamina, penicilin (100 U/mL), streptomycin (100 lg/ml) i 10% fetalnog goveđeg seruma (FCS).

Izolovani timociti su kultivisani na pločama sa 96 bazenčića sa okruglim dnom (Falcon, BD, SAD). U svakom bazenčiću je bilo 100 μ L ćelijske suspenzije (5×10^5 ćelija). Ćelije su tretirane sa rastućim koncentracijama (0,1, 1, 10 μ g/bazenčiću) ispitivanih depsidona (**1-3**), koji su razblaživani sa odgovarajućim količinama čistog metanola. Kontrolni uzorci su kultivisani u hranljivom medijumu ili sa odgovarajućim količinama čistog metanola. Za dalju evaluaciju proliferativne aktivnosti, timociti su tretirani optimalnom (5 μ g/mL) koncentracijom (Pavlović i saradnici, 2006) ConA (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Švedska). Sve ćelijske kulture rađene su u triplikatu i kultivisane u inkubatoru tokom 24 h (Galaki, Volf laboratorije, USA) sa 5% CO₂ na 37°C.

MATERIJALI I METODE

Proliferacija timocita pacova je ispitivana Cell Counting Kit-om (CCK-8, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), prateći uputstva proizvođača. Ovaj test je zasnovan na razlaganju tetrazolijum soli VST-8 putem mitohondrijalne dehidrogenaze u vijabilnim ćelijama. Apsorpcija pri 450 nm u svakom bazenčiću, merena je Perkin-Elmer čitačem mikroploča (Vallac Victor2V, Turku, Finska). Za svaki uzorak, vrednosti apsorbancije kontrolnog uzorka su oduzimane od onih dobijenih posle različitih tretmana i dobijeni rezultati su prikazani u odnosu na kontrolni uzorak (Pavlović i saradnici, 2012).

Vijabilnost timocita pacova, nakon perioda kultivacije, određivana je pomoću CCK-8 testa kao što je prethodno opisano (Hori i saradnici, 2002). Ukratko, deset mikrolitara reakcione smeše je dodato u svaki bazenčić. Posle 2 sata perioda inkubacije, rastvoreni formazanski produkt je kvantifikovan spektrofotometrijski, korišćenjem Perkin- Elmer čitač mikroploča (Vallac Victor2V, Turku, Finska). Apsorpcija je merena na 450 nm. Za svaki uzorak, vrednosti absorbancije kontrolnog uzorka su oduzimane od onih dobijenih posle različitih tretmana i dobijeni rezultati su prikazani u odnosu na kontrolni uzorak.

3.6.1. Određivanje intracelularnih reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS)

Redoks senzitivni test sa 2',7'-dihlorofluorescin diacetatom (H2DCF-DA, Sigma– Aldrich, St. Louis, Mo., USA) je upotrebljen za merenje promena sadržaja ukupnih ROS čestica u ćeliji, kao što je ranije opisano (Das i saradnici, 2005; Boldogh i saradnici, 2003). Ukratko, timociti su inkubirani zajedno sa ispitivanim supstancama i 2',7'-dihlorofluorescin diacetatom (H2DCF-DA). Nakon uklanjanja hranjivog medijuma i ispitivanih supstanci, ćelije su ponovo rastvorene u fosfatnom puferu. Promene u fluorescenciji (ekscitacija 485 nm, emisija 530 nm) su merene koristeći Perkin-Elmer fluorimetar (Wallac Victor2V, Turku, Finland). Za svaki uzorak, vrednosti absorbancije kontrolnog uzorka su oduzimane od onih dobijenih posle različitih tretmana i dobijeni rezultati su prikazani u odnosu na kontrolni uzorak.

3.6.2. Određivanje mitohondrijalnog membranskog potencijala

Promene u mitohondrijalnom membranskom potencijalu (MMP) timocita, koji su tretirani izolovanim jedinjenjima, su određivane na osnovu preuzimanja lipofilnog katjona Rhodamine 123 (Sigma–Aldrich, St. Louis, Mo., USA) u mitohondrije, kao što je ranije opisano (Wang i saradnici, 2007; Pathak and Khandelwal, 2006). Ukratko, timociti su inkubirani zajedno sa ispitivanim supstancama i Rhodamine 123 tokom 60 min u mraku na 37 °C. Nakon uklanjanja

MATERIJALI I METODE

hranjivog medijuma i ispitivanih supstanci, ćelije su ponovo rastvorene u fosfatnom puferu. Fluorescencija intracelularnog Rhodamine 123 (ekscitacija 485 nm, emisija 530 nm) je merena koristeći Perkin-Elmer fluorimetar. Za svaki uzorak, vrednosti absorbancije kontrolnog uzorka su oduzimate od onih dobijenih posle različitih tretmana i dobijeni rezultati su prikazani u odnosu na kontrolni uzorak.

Za prethodna tri eksperimenata rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Statistički značajne razlike između grupa su ispitivane Studentovim t-testom.

3.7. Ispitivanje uticaja izolovanih supstanci na formiranje mikronukleusa u humanim limfocitima

Uzeto je po 10 mL venske krvi (dva alikvota po 5 mL) od 5 zdravih odraslih muškaraca-dobrovoljaca, odabranih po principu slučajnosti, prosečne starosti 42,3 godina, koji profesionalno nisu bili izloženi fizičkim ili hemijskim mutagenima. U 5mL hranjivog medijuma RPMI-1640 (L-glutamin, 20%-tni inaktivirani teleći serum i 0,1%-tni fitohemaglutinin, Sigma, ST Louis, Missouri) dodato je 0,5 mL venske krvi i toliko ispitivanih supstanci da je njihova koncentracija u rastvoru bila 1 i 2 $\mu\text{g/mL}$. Jedna kultura je služila kao kontrolna i tu nisu dodavani uzorci, dok je kao pozitivna kontrola služila kultura u koju je dodat komercijalni zaštitni agens amifostin WR-2721 (98%, S-2[3-aminopropilamino-1-etilfos-fotioična kiselina; Marligen-Biosciences) u koncentraciji od 1 $\mu\text{g/mL}$.

Sve kulture su inkubirane u termostatu na 37 °C tokom 19 sati. Inkubiranje je trajalo 19 sati zato što je poznato da je toliko vremena potrebno da supstanca uneta u organizam *per os* bude izmetabolisana i izlučena iz organizma (Fenech i sardanici, 1990). Posle toga su sve kulture isprane u čistom medijumu, prenešene u svež RPMI 1640 hranjivi medijum i nastavljeno je inkubiranje još 48 sati. Nakon toga, dodat je citohalazin B (Invitrogen-Gibco-BRL) u finalnoj koncentraciji 4 $\mu\text{g/mL}$ inkubacija je nastavljena tokom 24 sata. Preparacija je obavljena centrifugiranjem (na 1200 rpm) i ispiranjem ćelija u fiziološkom rastvoru, zatim u blago hipotoničnom rastvoru (0,56% KCl + 0,9% NaCl, u odnosu 1:1). Ćelijska suspenzija je fiksirana u rastvoru sirćetne kiseline i metanola u odnosu 1: 3. Na vazduhu osušeni preparati su bojeni 2%-tnim rastvorom Gimza boje (Sigma Aldrich, Nemačka). Brojano je 1000

MATERIJALI I METODE

binuklearnih ćelija po uzorku na Axiophot-2-fluorescentnom mikroskopu po kriterijumima Countryman-a i Heddle-a (1976) i Fenech-a i Morely-a (1993).

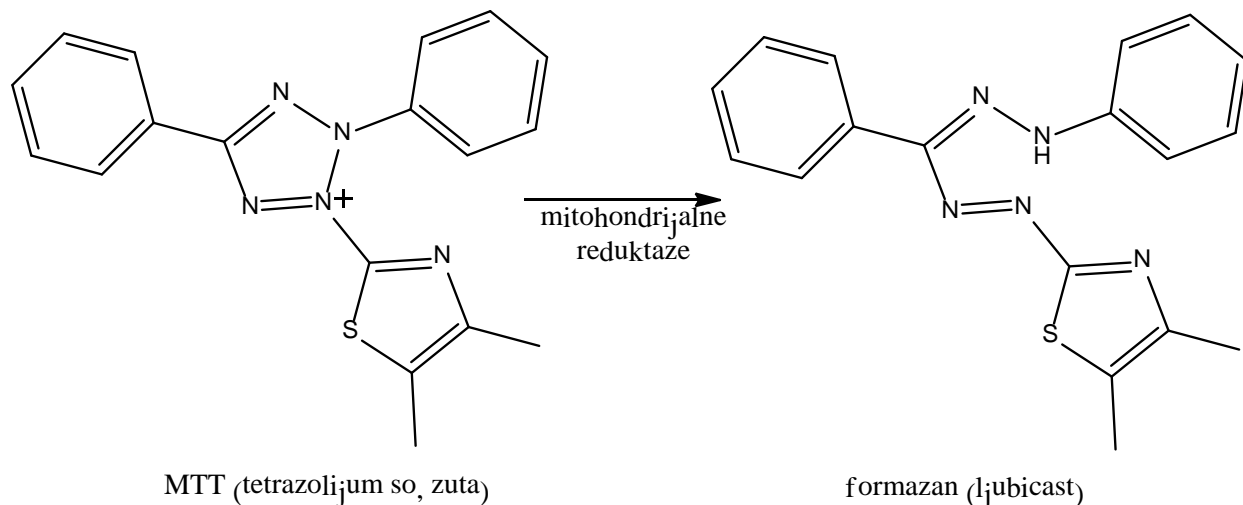
Ekperiment je rađen u triplikatu. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Statistička analiza je rađena korišćenjem Origin software package version 7.0. Statistička značajnost je računata pomoću analize varjanse (One-way ANOVA) korišćenjem Tukey test-a. Smatrane su statistički značajnim razlike za koje je $p < 0,05$ i $p < 0,01$.

3.8. Ispitivanje uticaja depsidona na vijabilnost i proliferaciju ćelija humanog karcinoma grlića materice

Ćelije humanog karcinoma grlića materice (HeLa ćelije) su kultivisane u DMEM (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Nemačka), koji je sadržavao 10 % FCS (Gibco, Paisley, Velika Britanija), penicilin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL) i 4 mM/L glutamina. HeLa ćelije su zasejane na sterilnim pločama sa 96 bazenčića. Ćelije su inkubirane tokom 24 h u atmosferi zasićenom vodenom parom, na 37 °C sa 5% CO₂ u 100 μ L hranljivig medijuma. Nakon toga, u svaki bazenčić dodato je po 100 μ L odgovarajućih koncentracija ispitivanih depsidona. Da bi se ispitao uticaj na vijabilnost Hela ćelija, ćelije su inkubirane sa depsidonima tokom 24 h. Da bi se ispitao uticaj na proliferaciju Hela ćelija, ćelije su inkubirane sa depsidonima tokom 72 h. Hranljivi medijum bez depsidona je bio negativna kontrola. 5-Fluorouracil (5-FU) korišćen je kao pozitivna kontrola u oba inkubaciona perioda, a za inkubacioni period od 24 h korišćen je i saponin.

Vijabilnost i proliferacija HeLa ćelija je određivana putem kolorimetrijskog MTT testa. Žuta tetrazolijumska so MTT se redukuje u ljubičasti formazan pod dejstvom mitohondrijalne sukcinat-dehidrogenaze metabolički aktivnih ćelija (slika 7).

MATERIJALI I METODE



Slika 7. Reakcija na kojoj se zasniva određivanje pomoću MTT testa

Posle 24 i 72 h inkubacije, iz bazenčića su uklonjeni hranljivi medijum i depsidoni. Nakon toga, ćelije su isprane fosfatnim puferom, i na kraju u svaki bazenčić je dodato po 100 μL fosfatnog pufera. Nakon toga u svaki bazenčić je dodato po 20 μL MTT i zatim su ploče inkubirane na 37 °C tokom 3 h. Nakon inkubacionog perioda, supernatant je uklonjen i nastali formazan je rastvoren sa 100 μL izopropanola. Merena je apsorpcija na 540 nm na višekanalnom spektrofotometru (Multiskan Uspon N ° 354, Thermo Labsystems, Vantaa, Finska). Ćelijska vijabilnost i proliferacija je izračunavana na sledeći način:

Procenat aktivnosti depsidona u odnosu na negativnu kontrolu = (Apsorbancija kulture sa depsidonom/apsorbancija negativne kontrole) X 100

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Statistički značajne razlike između grupa su ispitivane u SPSS 20 korišćenjem Studentovog t-testa. Statistički značajne razlike su smatrane za vrednosti $p < 0,05$ i $p < 0,01$. Koncentracija depsidona potrebna da inhibiše rast ćelija za 50% (IC_{50}) je određivana regresionom analizom.

3.9. Ispitivanje uticaja na aktivnost serumske holinesteraze

Određivanje uticaja na aktivnost serumske holinesteraze obavljeno je prema ranije objavljenom postupku (Stankov Jovanović i sardanici, 2007). Ukratko, deset zdravih dobrovoljaca (18-65 godina oba pola) u Opštoj bolnici Pirot, dalo je krv, uz pismenu saglasnost.

MATERIJALI I METODE

Prema upitniku, niko nije imao ozbiljne zdravstvene poremećaje, niti je koristio droge, cigarete, ili alkohol. Najmanje mesec dana pre davanja krvi, niko od njih nije konzumirao lekove. Svakom od ispitanika, uzeto je 5 mL krvi u Vacutainer epruvete, a zatim su uzorci krvi centrifugirani na 3000 rpm tokom 10 minuta i supernatant seruma je korišćen kao izvor enzima za dalju analizu.

Serumska holinesteraza katalizuje hidrolizu butiriltioholina (BuTC) do tioholina, koji reaguje sa ditio-nitrobenzoevom kiselinom (DTNB). Brzina reakcije se određuje brzinom formiranja 5-tio-2-nitrobenzoeve kiseline, merenjem apsorbancije na 405 nm, u šest ciklusa od 28 s. Analizirani rastvori (10 µL) su pomešani sa 10 µL seruma (razblažen sa fosfatnim puferom u odnosu 1: 9, V/V), i rastvorom fosfatnog pufera (160 µL). Ovako spremljeni uzorci su stajali 10 minuta na 37 °C, nakon čega je dodat DTNB (Sigma Co. St. Luis, Misuri, USA) rastvor (10 µL, 4,76 mmol/L). Posle 60 sekundi, dodat je rastvor supstrata (BuTC, 10 µL, 33,34 mmol/L) (Sigma Co. St. Luis, Misuri, USA). Koncentracija neostigmin-bromida (Sigma Co. St. Luis, Misuri, USA), koji je korišćen kao referentna supstanca bila je 200 µg/mL. Koncentracije rastvora ispitivanih supstanci u dimetil-sulfoksidu (DMSO, Merck, Darmstadt, Germany) bile su 1 i 10 mg/mL.

Merenja apsorbancije su vršena na talasnoj dužini od 405 nm, u kivetama dužine 7 mm, termostatiranih na 37 °C na spektrofotometru Konelab 20 (Thermofisher Scientific, Helsinki, Finland).

Rezultati su izraženi u procentima inhibicije (negativna vrednost) ili aktivacije (pozitivna vrednost) po formuli:

$$\% \text{ inhibicije/aktivacije} = ((I_x - I_0)/I_0) \times 100$$

Gde je I_0 apsorbancija reakcione smeše bez dodatih uzoraka a I_x je apsorbancija u prisustvu ispitivane supstance.

3.10. Određivanje antimikrobne aktivnosti mikrodilucionom metodom

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i minimalna baktericidna/fungicidna koncentracija (MBC/MFC) su određene korišćenjem mikrodilucione metode (NCLSS, 2003) za sojeve mikroorganizama Gram-pozitivne bakterije: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; Gram-negativne bakterije *Escherichia coli* ATCC 8739,

MATERIJALI I METODE

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, plesan *Aspergillus niger* ATCC 16404 i kvasac *Candida albicans* ATCC 10231. Inokulumi testiranih sojeva pripremljeni su od prekonoćne (*overnight*) kulture mikroorganizama podešene na 0,5 McFarland-a standardne zamućenosti (10^6 ćelija/mL). Desetopostotni vodeni rastvor dimetilsulfoksida je korišćen za rastvaranje i razblaživanje uzoraka od najveće ispitivane koncentracije (10 mg/mL). Serijsko dvostruko razblaživanje uzoraka je izvedeno na mikrotitarskim pločama sa 96 bazenčića po metodi Sarker-a i saradnika (2007).

U prvi red dodato je po 100 μ l ispitivanih supstanci određenih koncentracija. Nakon toga je u sve bazenčiće dodato 10 μ l rastvora rasazurina, pripremljenog rastvaranjem 270 mg rasazurina u 40 mL sterilne destilovane vode. Na kraju, u sve bazenčiće je dodato po 10 μ L odgovarajućeg inokuluma. Ploče su inkubirane 24 h na 37°C (bakterije) i 48 h na 27°C (za plesan i kvasac). MIC i MBC/MFC su određivane vizuelno na osnovu promene boje rasazurina. Rasazurin je plave nefluorescentne boje koja prelazi u fluorescentnu ružiččastu nakon redukcije rasazurina u resofurin oksidoreduktazama. Najniža koncentracija pri kojoj ne dolazi do promene boje definisana je kao MIC.

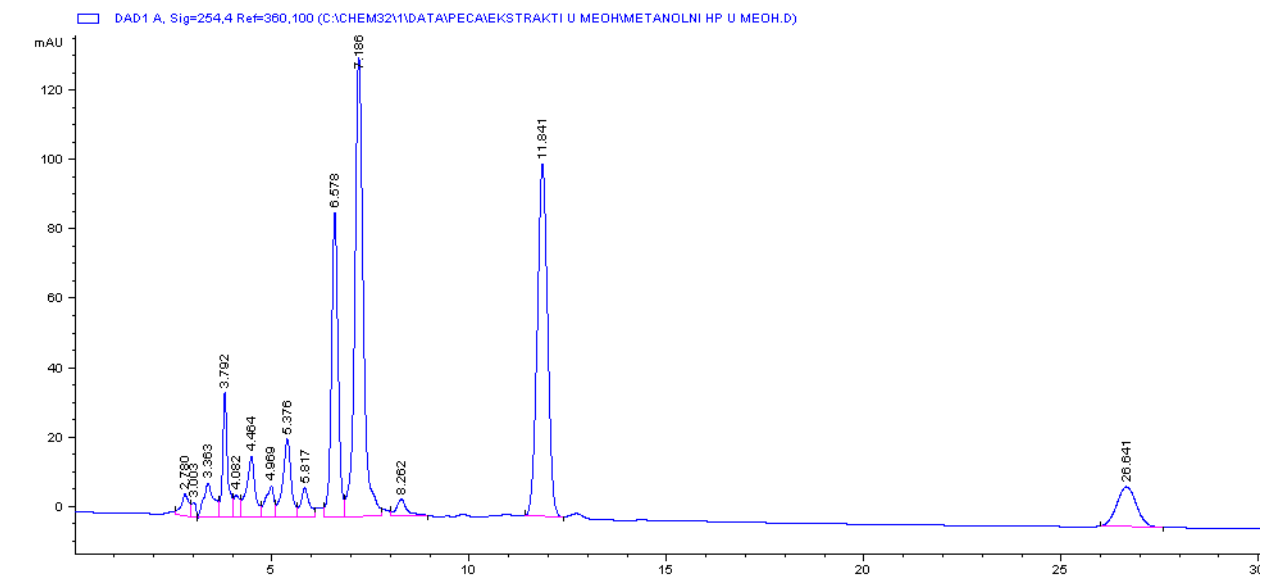
Finalne koncentracije uzoraka za ispitivanje antibakterijske/antigljivične aktivnost kretale su se od 0,005 do 10 mg/mL. Dva reda na svakoj ploči su korišćeni kao kontrola. Jedan red je korišćen kao pozitivna kontrola i korišćen je za određivanje osetljivosti Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija i sadržao je antibiotik širokog spektra delovanja, doksiciklin, u serijskim razblaženjima od 50 do 0,02 μ g/mL. Nistatin u serijskim razblaženjima od 50-0,02 pg/mL, je upotrebljen kao pozitivna kontrola u određivanju antimikotičkog efekta. Svi testovi su vršeni u triplikatu a korišćene su dve kontrole rasta koje sadrže inokulisanu hranljivu podlogu kao i inokulisanu hranljivu podlogu sa serijom duplih razblaženja rastvarača, metanola. Negativna kontrola se sastojala od inokulisane hranljive podlogu sa serijom duplih razblaženja rastvarača.

REZULTATI

4. REZULTATI

4.1. Hemijski sastav

HPLC hromatogrami su dati na slikama 8-10. Prinos ekstrakata, retenciona vremena identifikovanih konstituenata, njihova relativna zastupljenost u ovom radu i ranije objavljenih dati su u Tabeli 3.



Slika 8. HPLC hromatogram metanolnog ekstrakta *Hypogymnia physodes*

REZULTATI

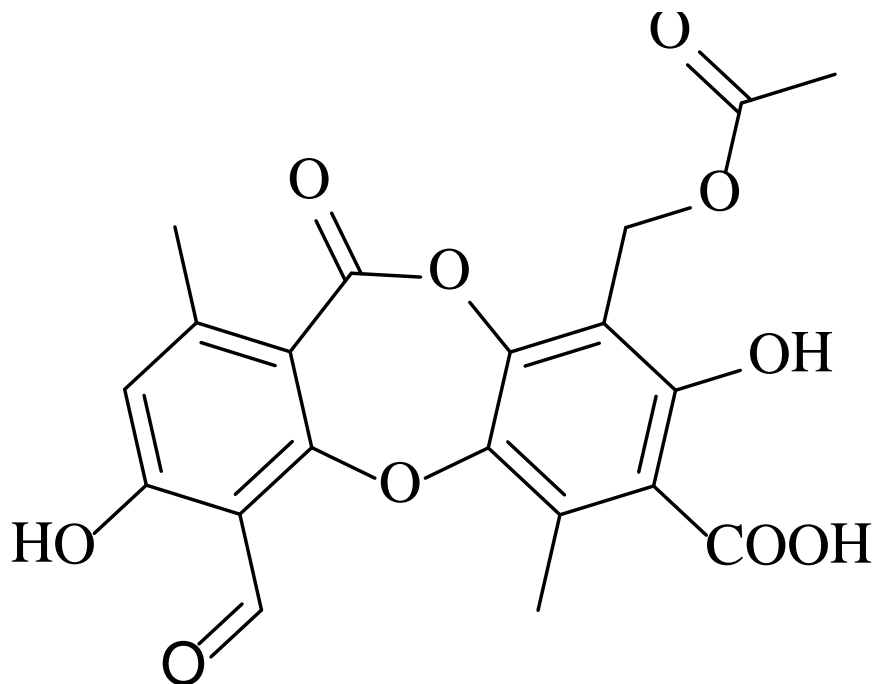
Tabela 3. Prinos ekstrakata iz lišaja *H. physodes*, retenciona vremena identifikovanih konstituenata, njihova relativna zastupljenost (izražena kao % udela pika u ukupnoj površini pikova HPLC hromatograma) u ovom radu i ranije i objavljenih

	Retenciono vreme (Rt)	Metanolni ekstrakt (ME)	Acetonski ekstrakt (AE)	Etarski ekstrakt (EE)	Etanolni ekstrakt (Bialonska i Dayan, 2005)	Acetonski ekstrakt (Molnar i Farkas, 2011)
1	7,115	28,7	38,7	34,9	17,1-25,8	7,9-23,4
2	11,750	26,5	22,8	30,7	22,2-25,8	0,01-5,1
3	6,542	14,8	12,4	16,5	18,4-21,7	22,2-50,7
4	26,521	5,8	12,4	11,0	1,7-3,1	1,7-15,2
Ukupno identifikovano (%)	-	65,8	86,3	82,1	59,4-76,4	31,8-94,4
Prinos ekstrakta u odnosu na suvi biljni materijal (%)	-	10,8	7,3	5,2	-	-

Ekstrakcijom metanolnog ekstrakta toluenom, izolovano je 19,0 mg jedinjenja **4** (HPLC čistoće 99,4 %). Nakon dvadeset injektovanja, preparativnom HPLC hromatografijom, izolovano je 12 mg jedinjenja **1** (HPLC čistoće 93,8 %), 14 mg jedinjenja **2** (HPLC čistoće 95,6 %) i 7,5 mg jedinjenja **3** (HPLC čistoće 94,5%). Za izolovanje većih količina konstituenata korišćena je ekstrakcija i hromatografija na stubu silika-gela (šema 2).

REZULTATI

Fizodalična kiselina (1, 9-(acetoksimetil)-3,8-dihidroksi--1,6-dimetil-4-formil-11-okso-11*H*dibenzo[*b,e*][1,4]dioksepin-7-karboksilna kiselina)

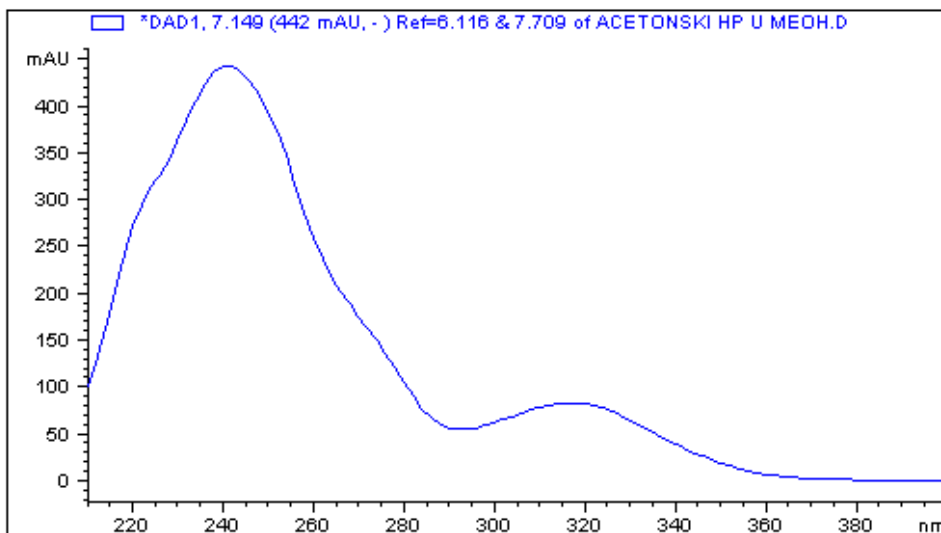


Slika 11. Struktura fizodalične kiseline (1)

TT- na 230 °C počinje razlaganje.

Molekulska formula: C₂₀H₁₆O₁₀; $m/z = 415,06652$ [M-H]⁻.

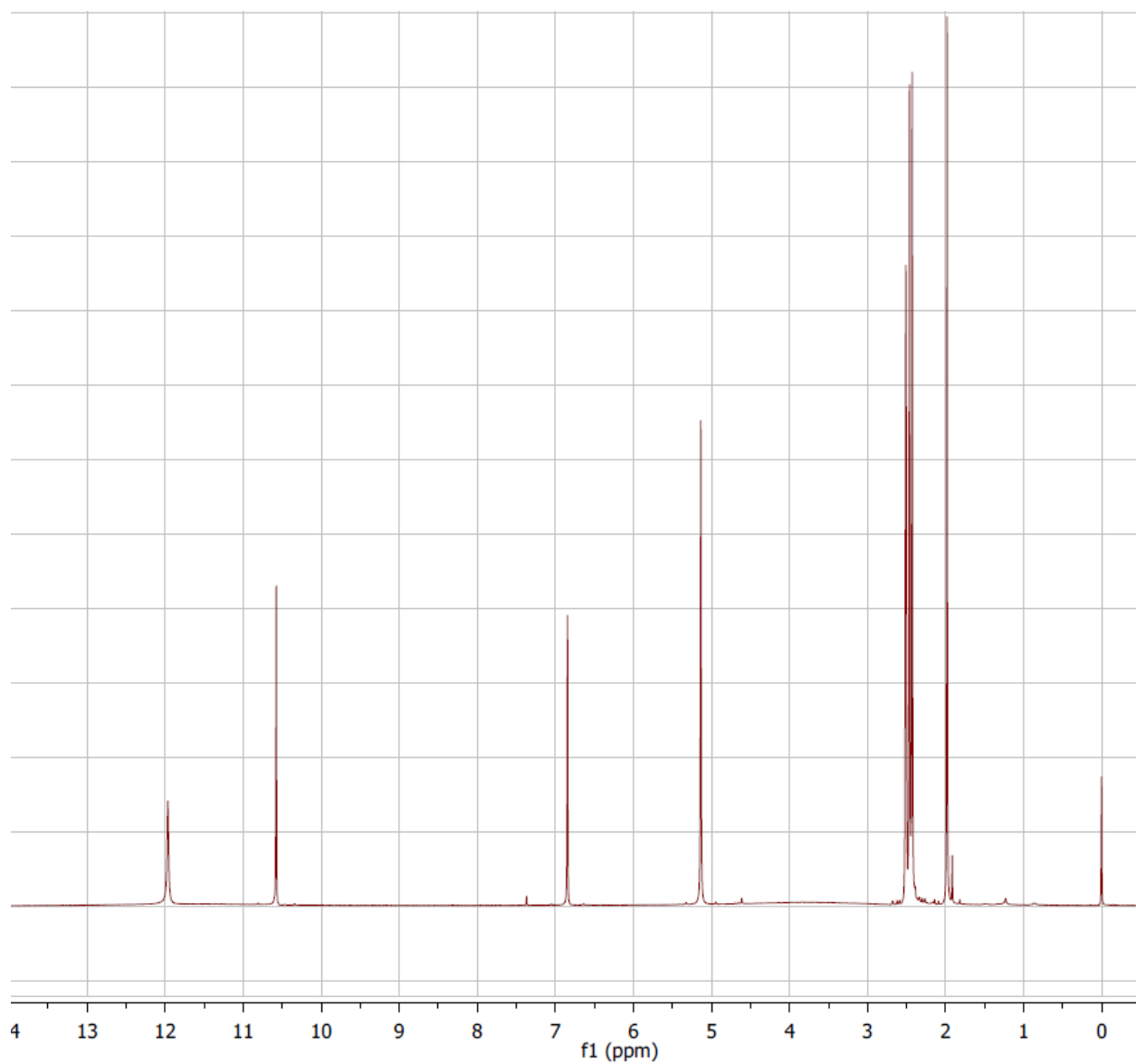
UV (MeOH) λ_{\max} (nm): 242, 318.



Slika 12. UV spektar fizodalične kiseline (1)

REZULTATI

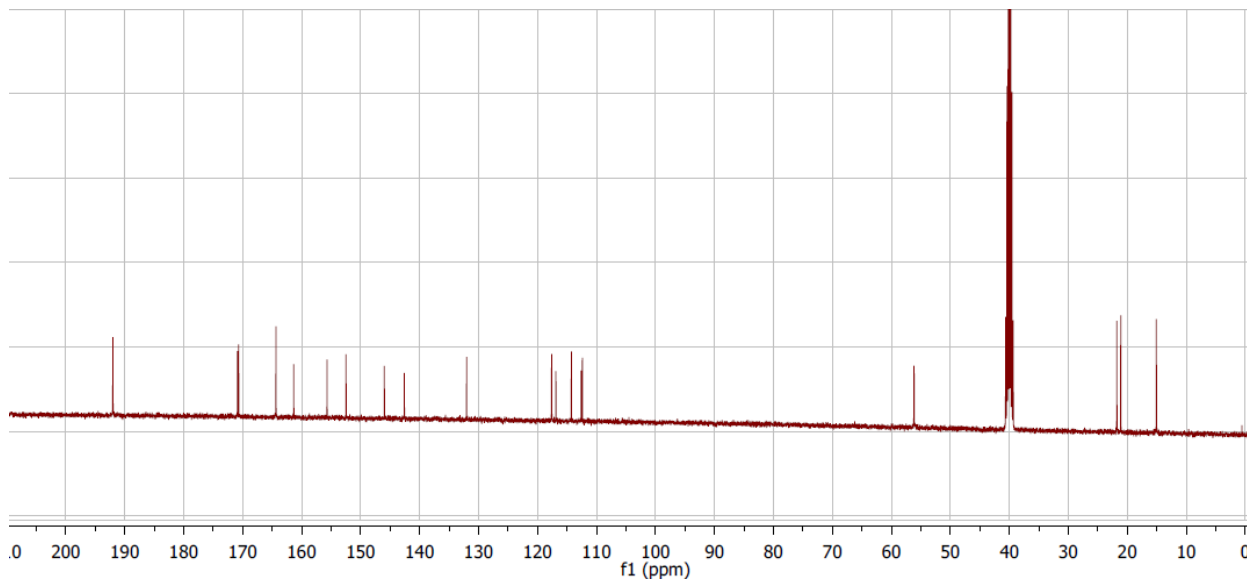
^1H NMR (d_6 -DMSO): δ 6,83 (1H, s, C5-H); 5,13 (2H, s, C9-CH₂); 2,45(3H, s, C1-CH₃); 2,42(3H, s, C6-CH₃); 10,57(1H, s, CHO); 1,97(3H, s, OCOCH₃); 11,95(1H, s, C3-OH);



Slika 13. ^1H NMR spektar fuzodalične kiseline (**1**)

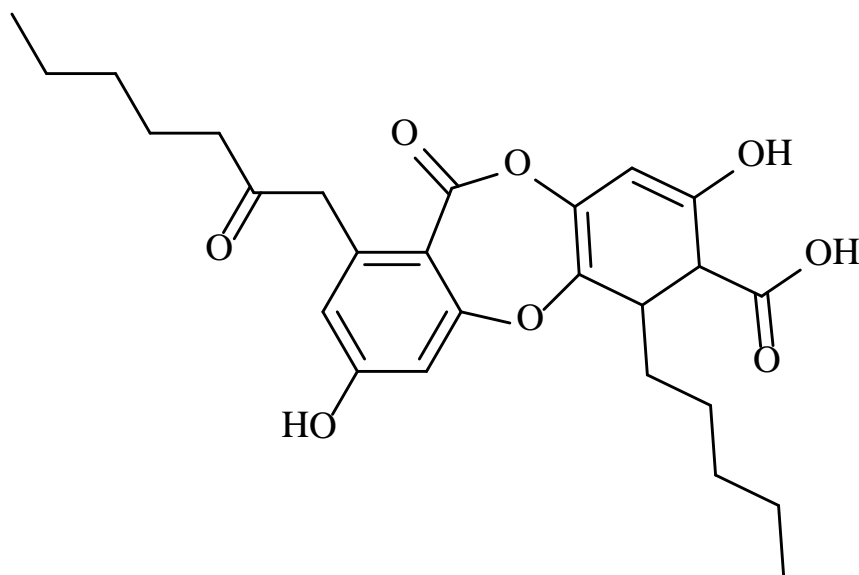
REZULTATI

^{13}C NMR (d_6 -DMSO): δ 112,12 (C-11a); 163,91 (C-4a); 111,89 (C-4); 163,88 (C-3); 113,8 (C-5); 152,02 (C-1); 116,22 (C-7); 155,31 (C-8); 117,14 (C-9); 145,55 (C-9a); 142,12 (C-5a); 131,64 (C-6); 55,66 (C9- CH_2); 21,29 (C1- CH_3); 14,60 (C6- CH_3); 191,55 (CHO); 20,62 (OCOCH_3); 170,26 (OCOCH_3); 160,83 (C11); 170,38 (COOH).



Slika 14. ^{13}C NMR spektar fizodalične kiseline (**1**)

Fizodična kiselina (2, 3,8-dihidroksi-11-okso-1-(2-oksoheptil)-6-pentil-11H-dibenzo[*b,e*][1,4]dioksepin-7-karboksilna kiselina)



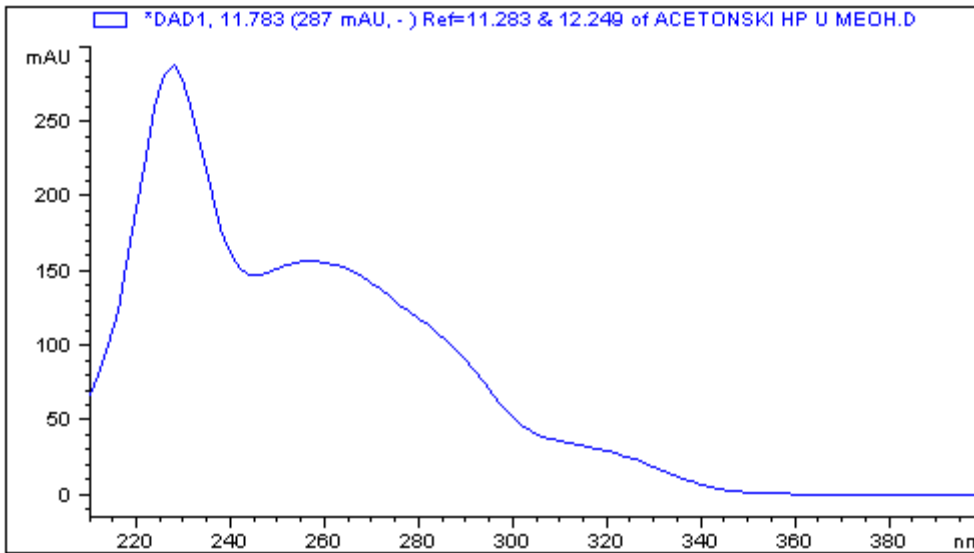
Slika 15. Struktura fizodične kiseline (**2**)

REZULTATI

TT- na 205 °C počinje razlaganje

Molekulska formula: $C_{26}H_{30}O_8$; $m/z = 469,18643 [M-H]^-$.

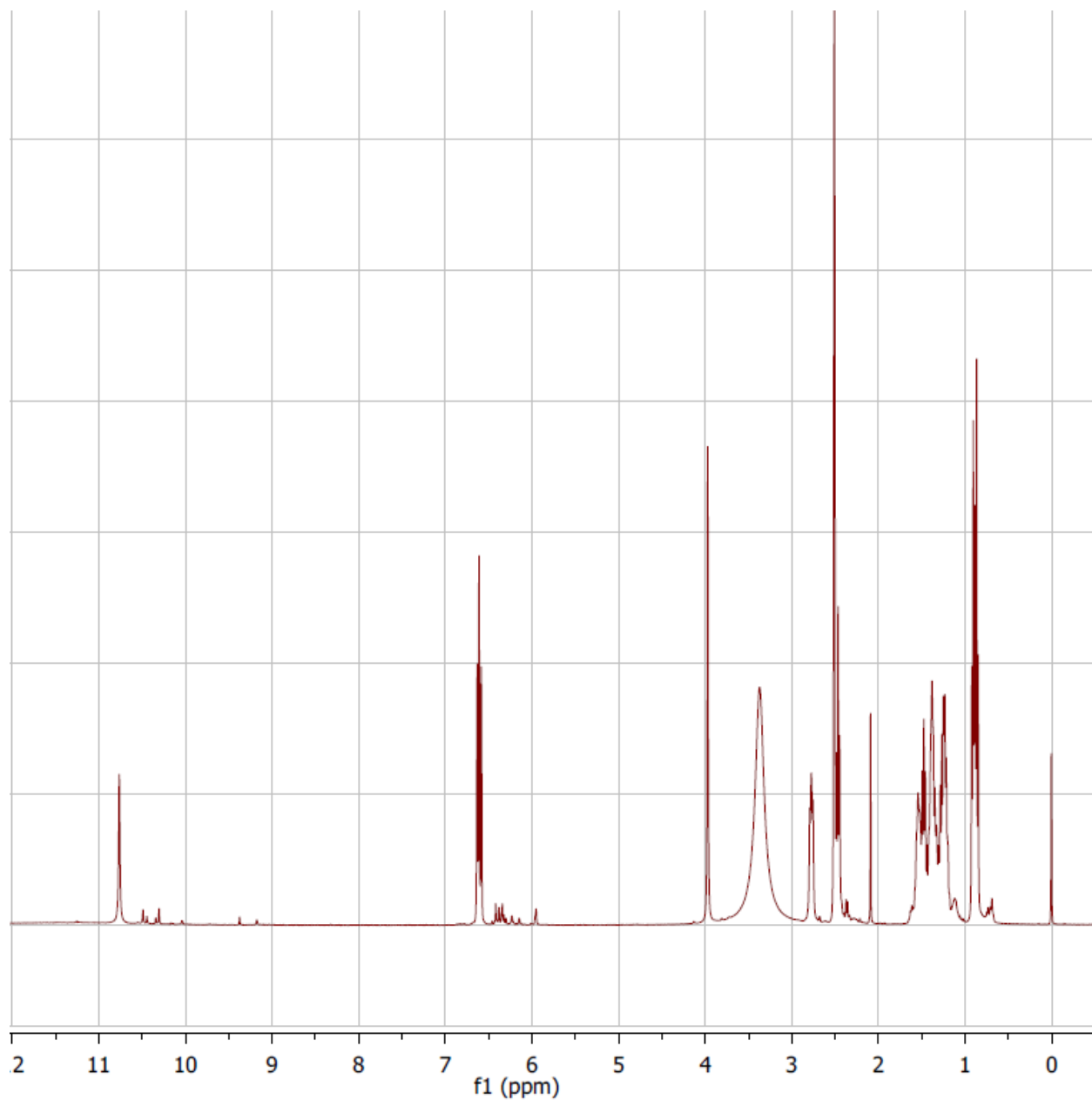
UV (MeOH) λ_{max} (nm): 230, 263, 315.



Slika 16. UV spektar fizidične kiseline (2)

REZULTATI

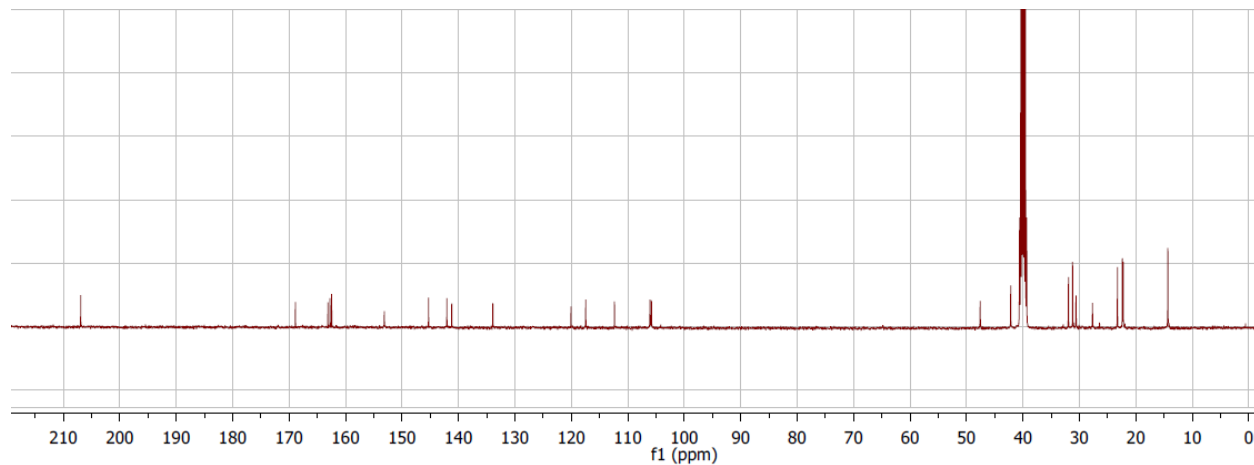
^1H NMR (d_6 -DMSO): δ 6,56 (1H, d, C4-H); 6,59 (1H, d, C5-H); 6,61 (1H, s, C9-H); 2,43 (2H, t, 3,95 (2H, s, C1-CH₂); 10,20 (1H, s, C3-OH); 10,71 (1H, s, C8-OH).



Slika 17. ^1H NMR spektar fizodične kiseline (2)

REZULTATI

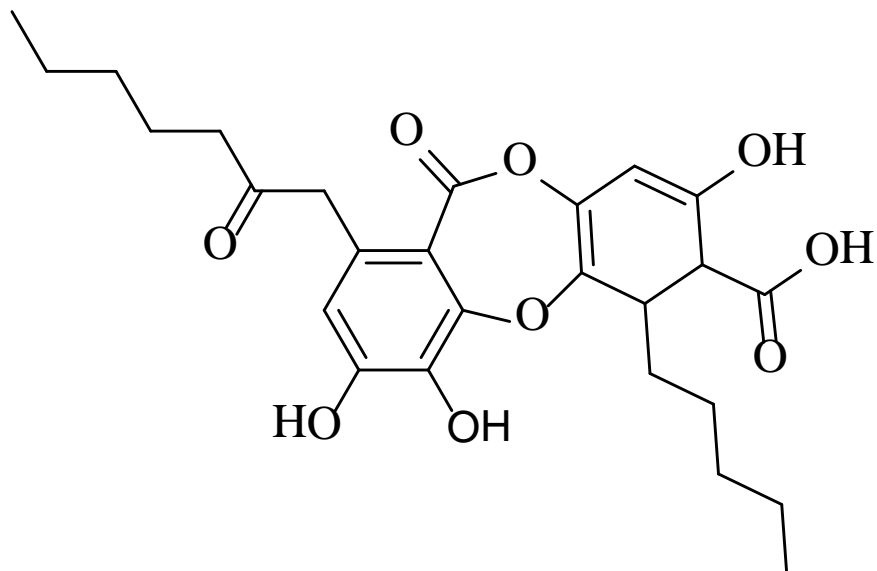
^{13}C NMR ($\text{d}_6\text{-DMSO}$): δ 116,98 (C-11a); 162,65 (C-4a); 105,34 (C-4); 162,28 (C-3); 119,53 (C-5); 133,43 (C-1); 105,63 (C-7); 162,62 (C-8); 111,88 (C-9); 144,87 (C-9a); 141,57 (C-5a); 140,76 (C-6); 47,10 (C1- CH_2); 161,99 (C11); 206,39 (CO); 168,40 (COOH).



Slika 18. ^{13}C NMR spektar fizodične kiseline (2)

REZULTATI

3-Hidroksifizodična kiselina (3, 3,4,8-trihidroksi-11-okso-1-(2-oksoheptil)-6-pentil-11H-dibenzo[b,e][1,4]dioksepin-7-karboksilna kiselina)

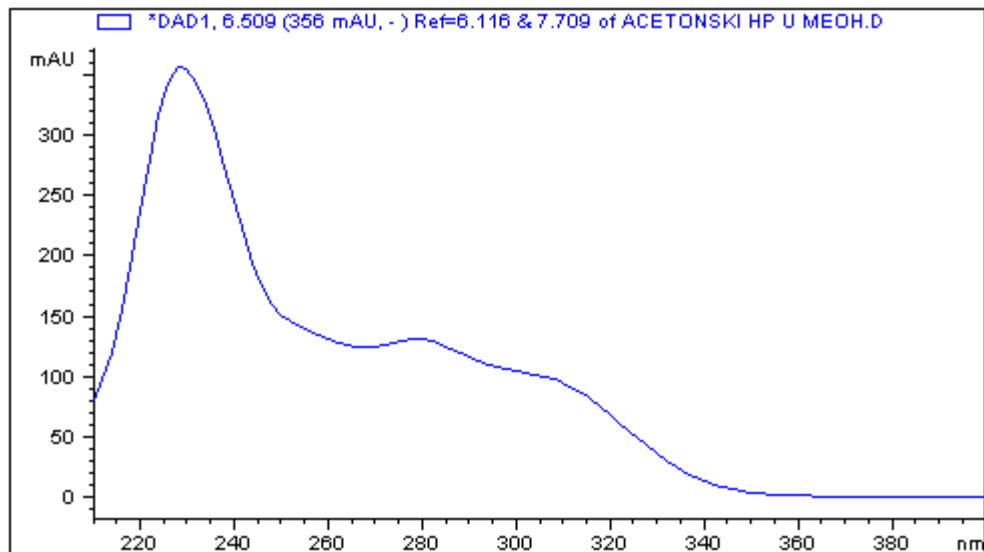


Slika 19. Struktura 3-hidroksifizodične kiseline (3)

TT- na 190 °C počinje razlaganje.

Molekulska formula: C₂₆H₃₀O₉; $m/z = 485,18105$ [M-H]⁻.

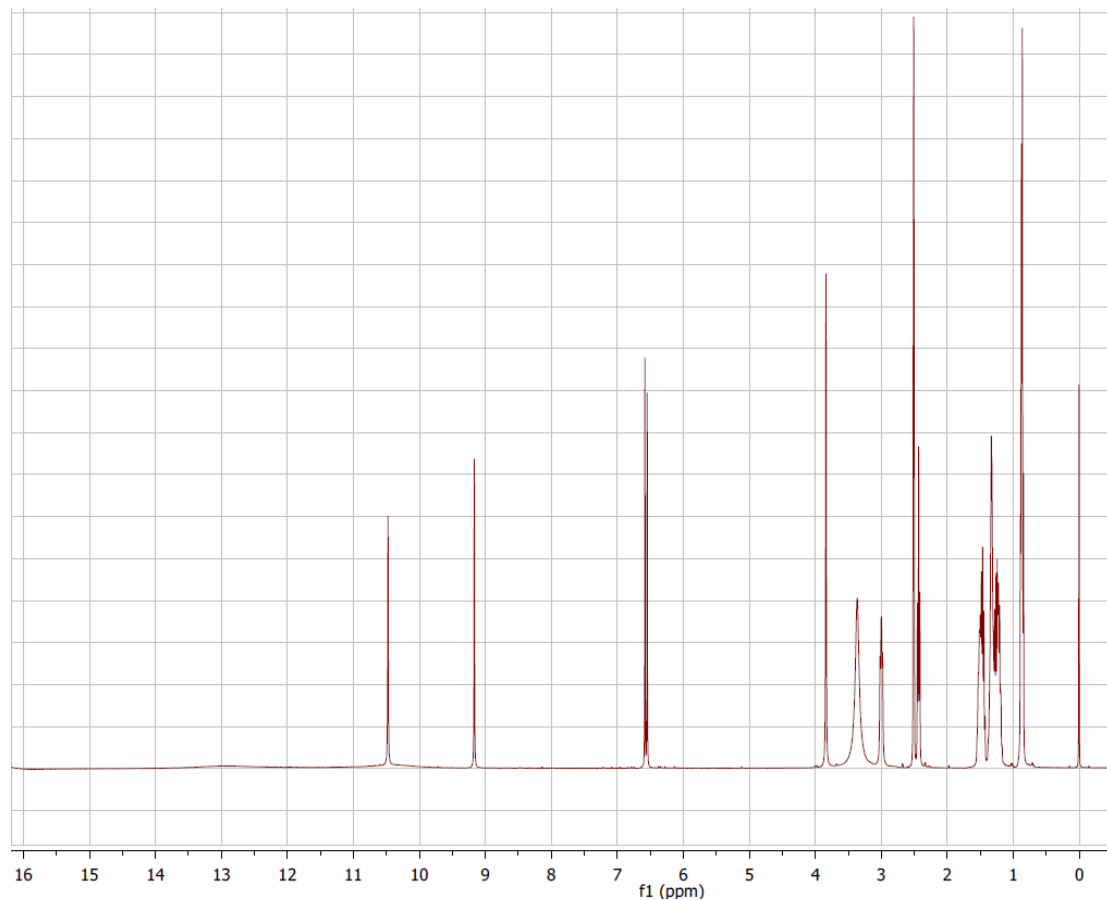
UV (MeOH) λ_{\max} (nm): 230, 280, 310.



Slika 20. UV spektar 3-hidroksifizodične kiseline (3)

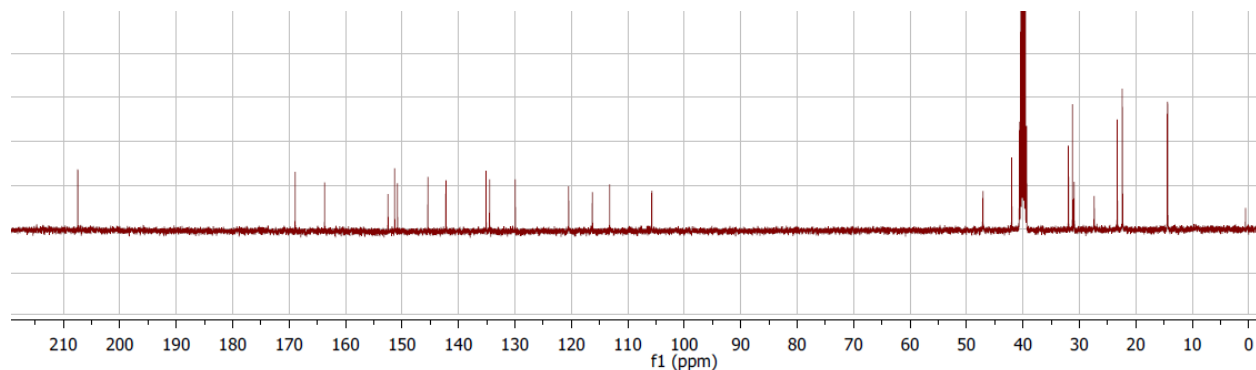
REZULTATI

^1H NMR (d_6 -DMSO): δ 6,58 (1H, s, C2-H); 6,62 (1H, s, C9-H); 3,83 (2H, s, C1-CH₂); 10,45 (1H, s, C3-OH); 10,74 (1H, s, C8-OH); 9,14 (1H, s, C4-OH).



Slika 21. ^1H NMR spektar 3-hidroksifizodične kiseline (**3**)

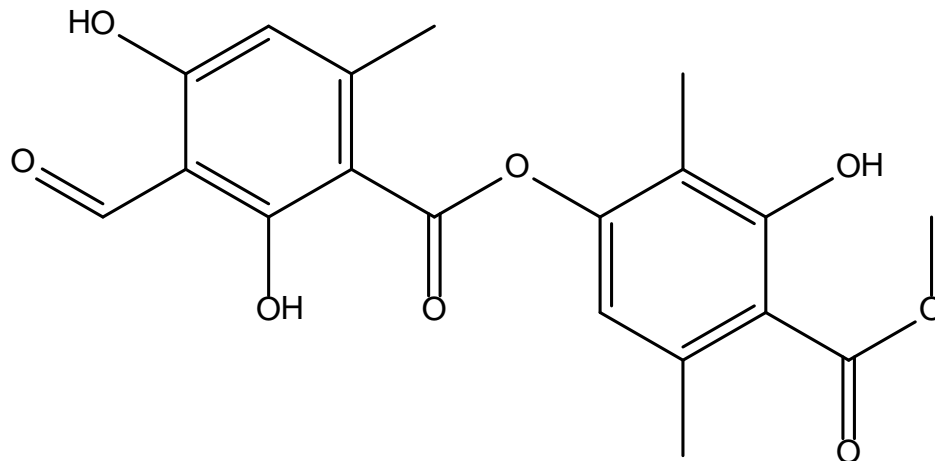
^{13}C NMR (d_6 -DMSO): δ 111,89 (C-11a); 129,52 (C-4); 133,56 (C-1); 105,62 (C-7); 162,29 (C-8); 105,34 (C-9); 144,87 (C-9a); 141,57 (C-5a); 140,72 (C-6); 47,10 (C1-CH₂); 162,00 (C-11); 206,41 (CO); 168,47 (COOH).



Slika 22. ^{13}C NMR spektar 3-hidroksifizodične kiseline (**3**)

REZULTATI

Atranorin (4, (3-hidroksi-4-metoksikarbonil-2,5-dimetilfenil)-3-formil-2,4-dihidroksi-6-metilbenzoat)

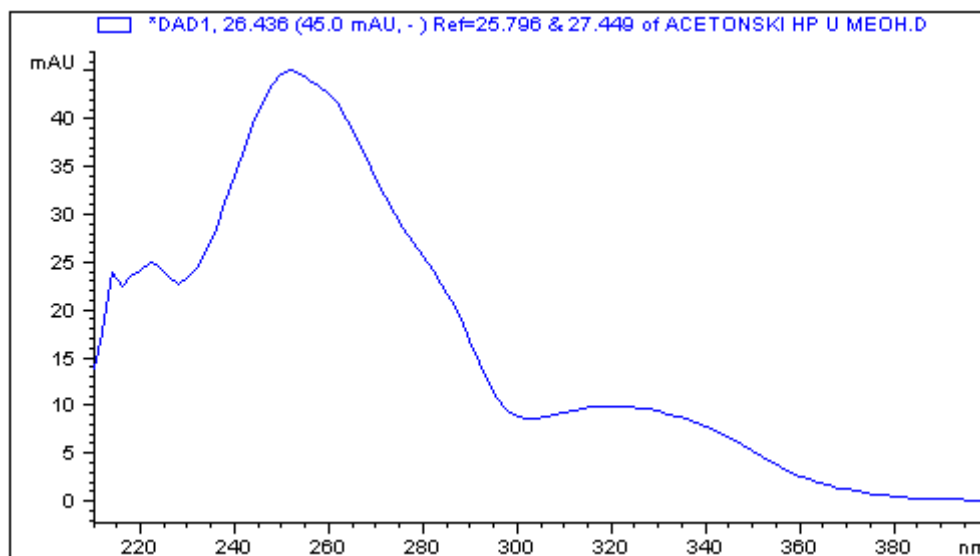


Slika 23. Struktura atranorina (4)

TT na 195 °C počinje razlaganje.

Molekulska formula: $C_{18}H_{14}O_9$; $m/z = 373,0563 [M-H]^-$.

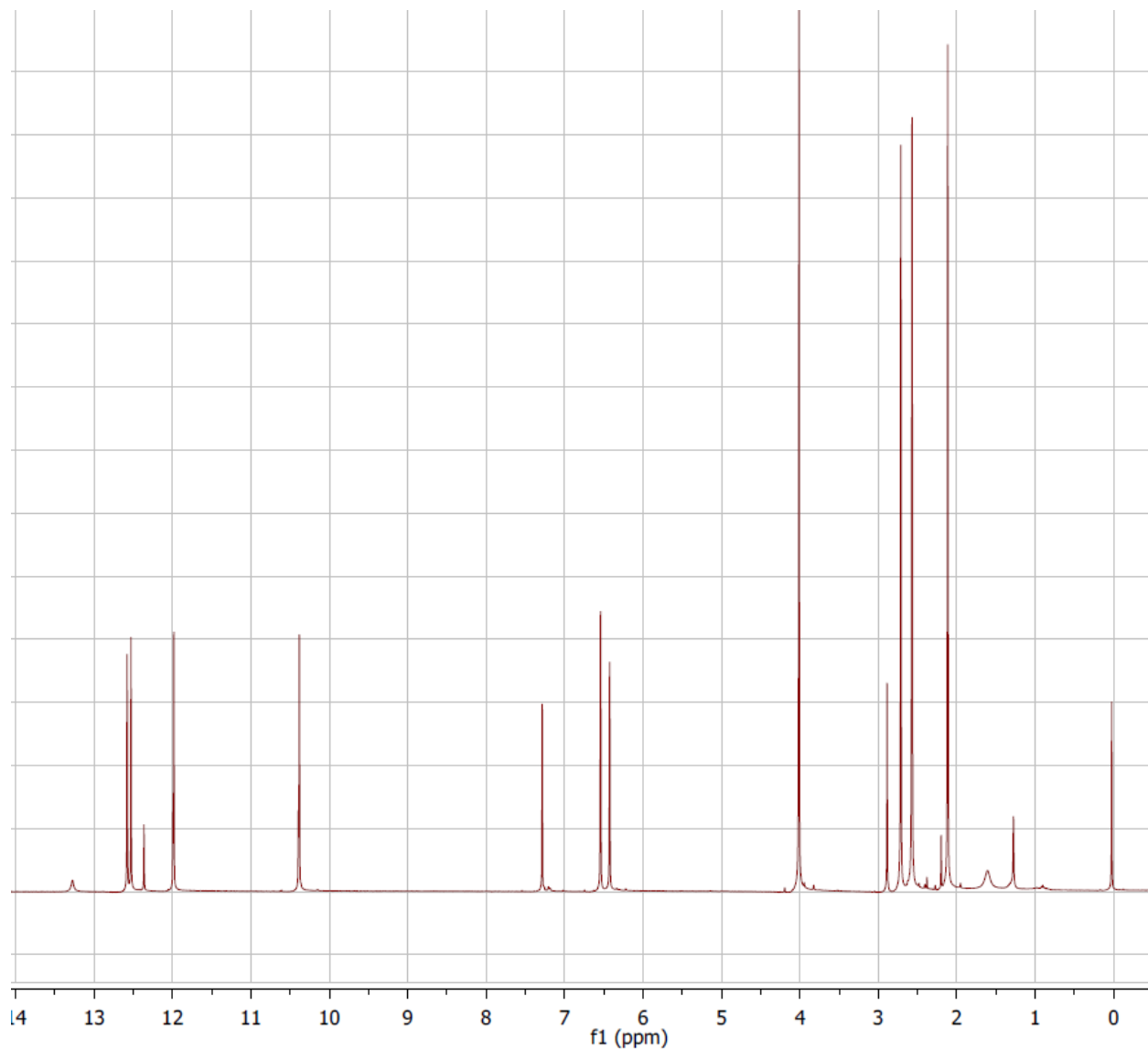
UV (MeOH) λ_{max} (nm): 215, 252, 312.



Slika 24. UV spektar atranorina (4)

REZULTATI

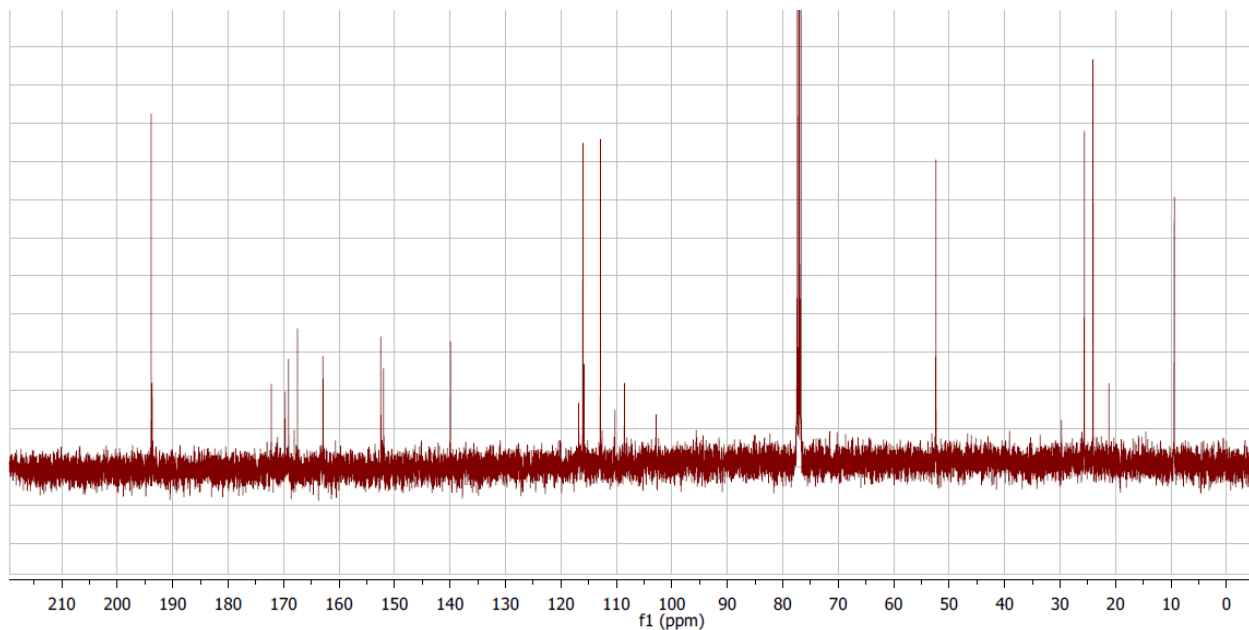
^1H NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz): Ring A: δ 12,53 (1H, s, C2-OH); 10,38 (1H, s, C3-CHO); 12,58 (1H,s, C4-OH); 6,34 (1H, s, C5-H); 2,71 (3H, s, C6-CH₃); Prsten B: δ 2,11 (3H, s, C2-CH₃); 11,98 (1H, s, C3-OH); 4,01 (3H,s, C4-COOCH₃); 2,57 (3H, s, C5-CH₃); 6,54 (1H, s, C6-H).



Slika 25. ^1H NMR spektar atranorina (4)

REZULTATI

^{13}C NMR (d_6 -DMSO, 300MHz): prsten A: δ 10,2,83 (C1); 169,17 (C2); 108,59(C3); 167,49 (C4); 112,87 (C5); 152,46 (C6); 193,87 (C3-CHO); 25,62 (C6- CH_3); prsten B: δ 151,92 (C1); 116,76 (C2); 162,89 (C3); 110,32 (C4); 113,95 (C5); 116,03 (C6); 9,39 (C2- CH_3); 52,37 (C4- COOCH_3); 172,23 (C4- COOCH_3); δ 169,72 (prsten BC1-OCO-C1Prsten A).

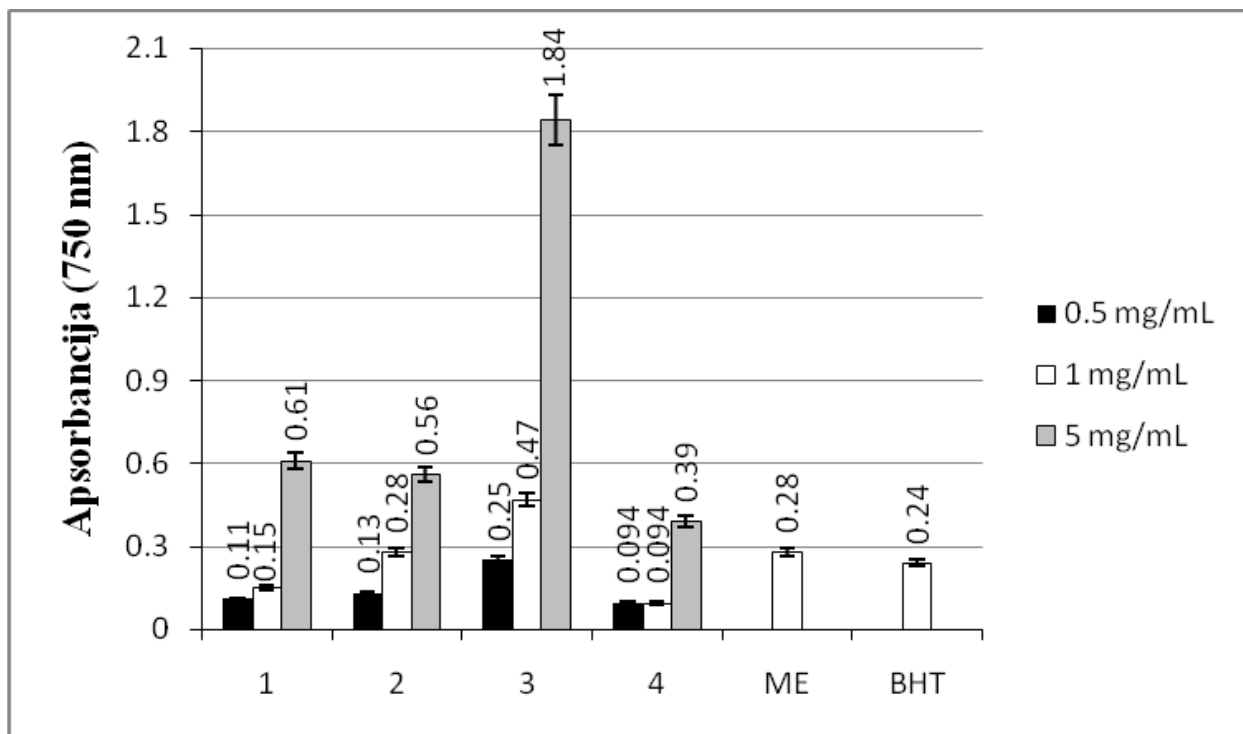


Slika 26. ^{13}C NMR spektar atranorina (4)

REZULTATI

4.3. Antioksidantna aktivnost

Evaluacija antioksidantnog kapaciteta metanolnog ekstrakta *H. physodes* i izolovanih jedinjenja urađena je određivanjem sadržaja ukupnih fenola (TPC), sposobnosti „hvatanja“ DPPH[•] i ABTS[•] radikala kao i ukupnog redukcionog kapaciteta (TRP). Rezultati su prikazani na histogramima (slike 27-30).

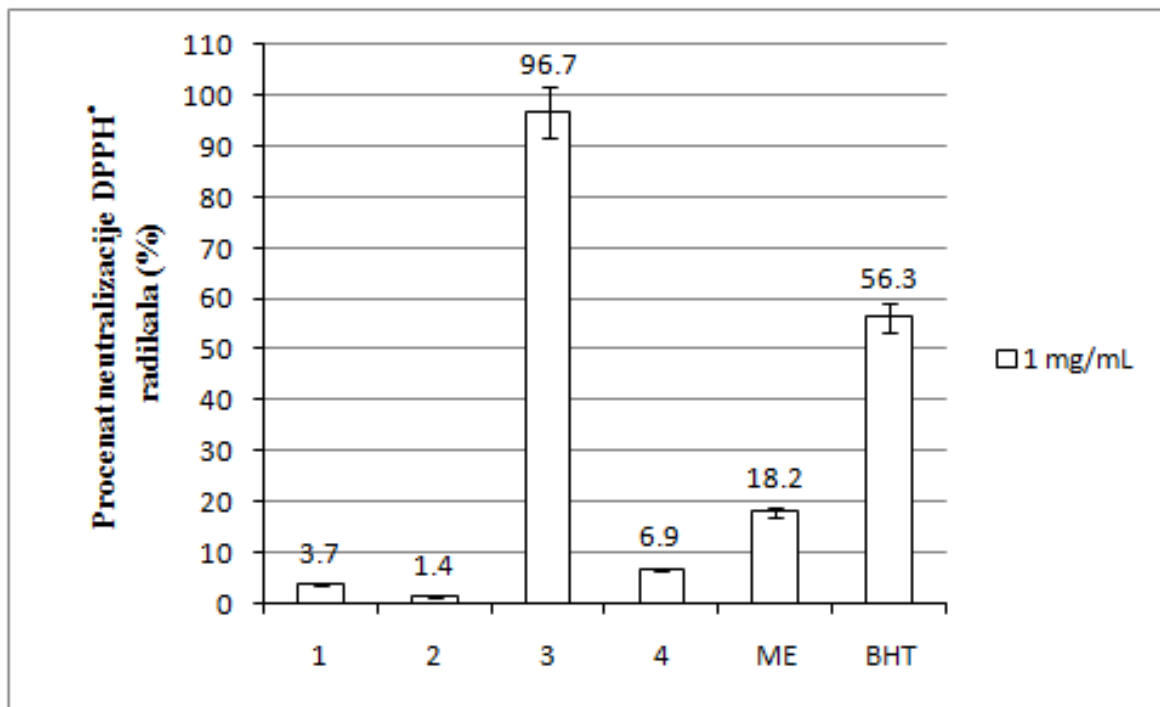


Slika 27. Vrednosti apsorbancije uzoraka u eksperimentu određivanja ukupnog sadržaja fenola izolovanih depsidona **1-3**, atranorina **4** i metanolnog ekstrakta **ME** (50 μ L rastvora koncentracija datih na slici u ukupnoj zapremini od 10 mL)

Folin-Ciocalteu reagens je žuto obojen i sastoji se od natrijum-volframata ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 g), natrijum-molibdata ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 g), 100 mL hlorovodonične kiseline, 50 mL 85% fosforne kiseline, litijum-sulfata ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 150 g) i 700 mL vode. Meri se intenzitet plave boje koja potiče od petovalentnog jona molibdena koji nastaje u reakciji sa uzorkom. Što je veća apsorbancija to je veći antioksidantni kapacitet. Izmerene vrednosti apsorbancije pokazuju da sa porastom koncentracije uzorka raste i redukциони kapacitet. Najveći kapacitet redukcije Mo(VI) ima jedinjenje **3**. Svi depsidoni u svim koncentracijama imaju veći

REZULTATI

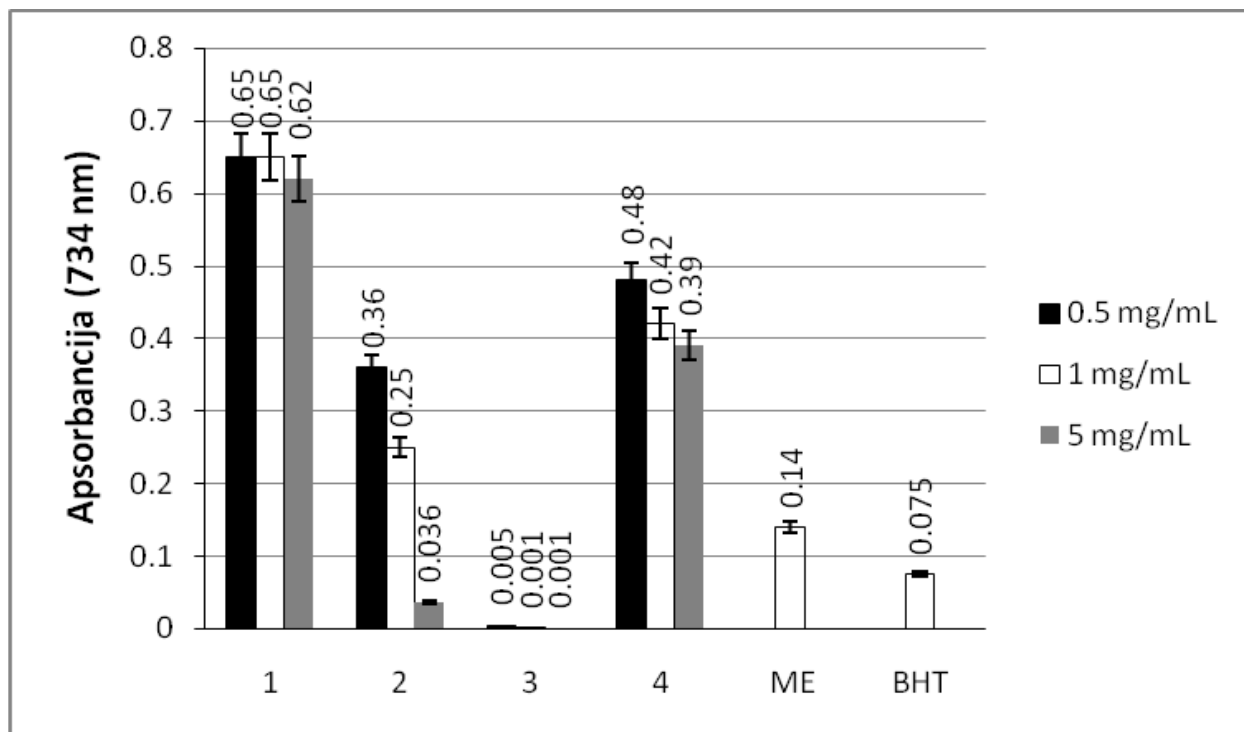
kapacitet od jedinjenja **4**. U koncentraciji od 1 mg/mL, jedinjenja **3**, **2** i metanolni ekstrakt imaju veći kapacitet od BHT-a (slika 27).



Slika 28. Procenat neutralizacije DPPH[•] radikala izolovanih depsidona **1-3**, atranorina **4** i metanolnog ekstrakta **ME** (10 μ L rastvora koncentracija datih na slici u ukupnoj zapremini od 4 mL)

Kao što se može videti iz histograma, najveću sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala, značajno veću od ostalih jedinjenja i metanolnog ekstrakta, a 1,7 puta veću od BHT-a ima jedinjenje **3**. Metanolni ekstrakt ima veću antioksidantnu aktivnost u odnosu na jedinjenja **1**, **2** i **4** (slika 28).

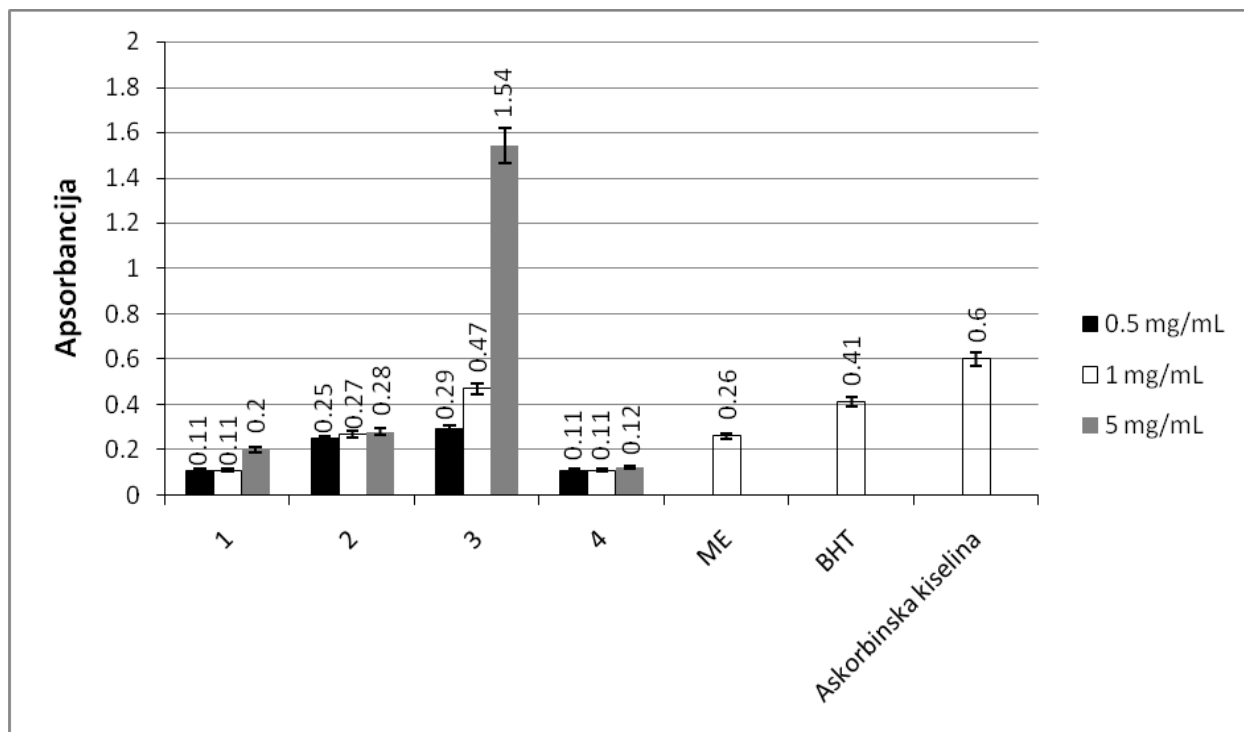
REZULTATI



Slika 29. Vrednosti apsorbancije uzoraka u eksperimentu određivanja sposobnosti „hvatanja“ $ABTS^{\bullet}$ radikala izolovanih depsidona **1-3**, atranorina **4** i metanolnog ekstrakta **ME** (10 μ L rastvora koncentracija datih na slici u ukupnoj zapremini od 1,95 mL)

Rezultat reakcije antioksidansa i $ABTS^{\bullet}$ radikala, koji je plavo obojen, je nastajanje bezbojnog jona $ABTS^{2-}$, pa smanjenje apsorbancije na talasnoj dužini od 734 nm ukazuje na povećanje sposobnosti antioksidansa da neutrališe $ABTS^{\bullet}$ radikal. Izolovana jedinjenja i metanolni ekstrakt imaju veću antioksidantnu aktivnost od BHT-a u koncentraciji od 1 mg/mL. Najveću aktivnost ima jedinjenje **3**, zatim jedinjenja **2**, **4**, a najmanju aktivnost ispoljava jedinjenje **1** (slika 29).

REZULTATI



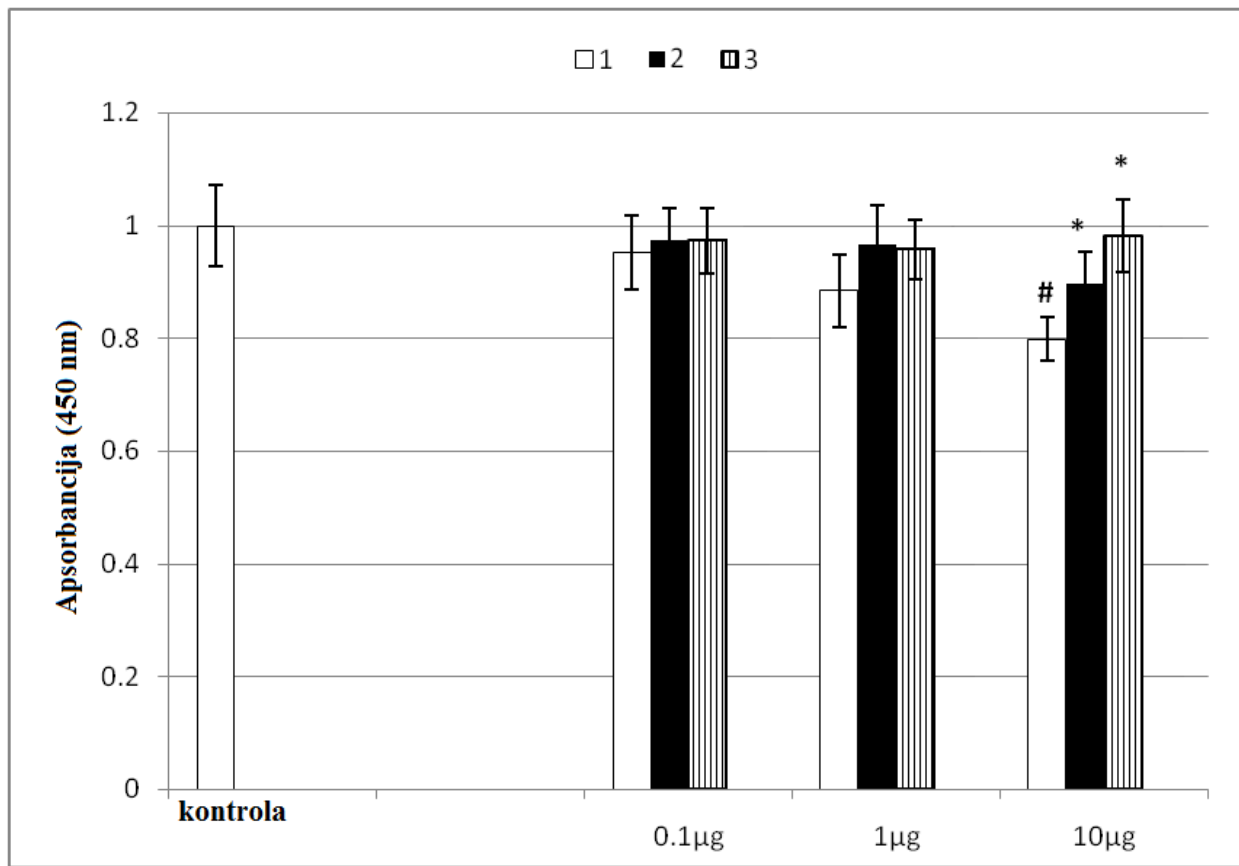
Slika 30. Vrednosti apsorbancije uzoraka u eksperimentu određivanja ukupnog redukcionog kapaciteta izolovanih depsidona **1-3**, atranorina **4** i metanolnog ekstrakta **ME** (10 μ L rastvora koncentracija datih na slici u ukupnoj zapremini od 5 mL)

Određivanje ukupnog redukcionog kapaciteta se meri apsorbancijom plavo obojenog kompleksa koji nastaje u reakciji $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ sa antioksidansom. Opadajući redosled veličine redukcionog kapaciteta izolovanih jedinjenja: jedinjenje **3**, slede jedinjenja **2** i **1** a najmanju aktivnost ispoljava jedinjenje **4**. U koncentraciji od 1 mg/mL jedino jedinjenje **3** ima aktivnost približnu aktivnosti BHT-a, dok svi uzorci imaju nižu aktivnost od askorbinske kiseline (slika 30).

4.4. Uticaj ispitivanih supstanci na vijabilnost i proliferaciju timocita pacova

Rezultati ispitivanja efekta rastućih koncentracija izolovanih depsidona (0,1, 1, 10 μ g/bunarčiću) na proliferaciju timocita pacova nakon inkubacije od 24 h prikazani su na slici 31.

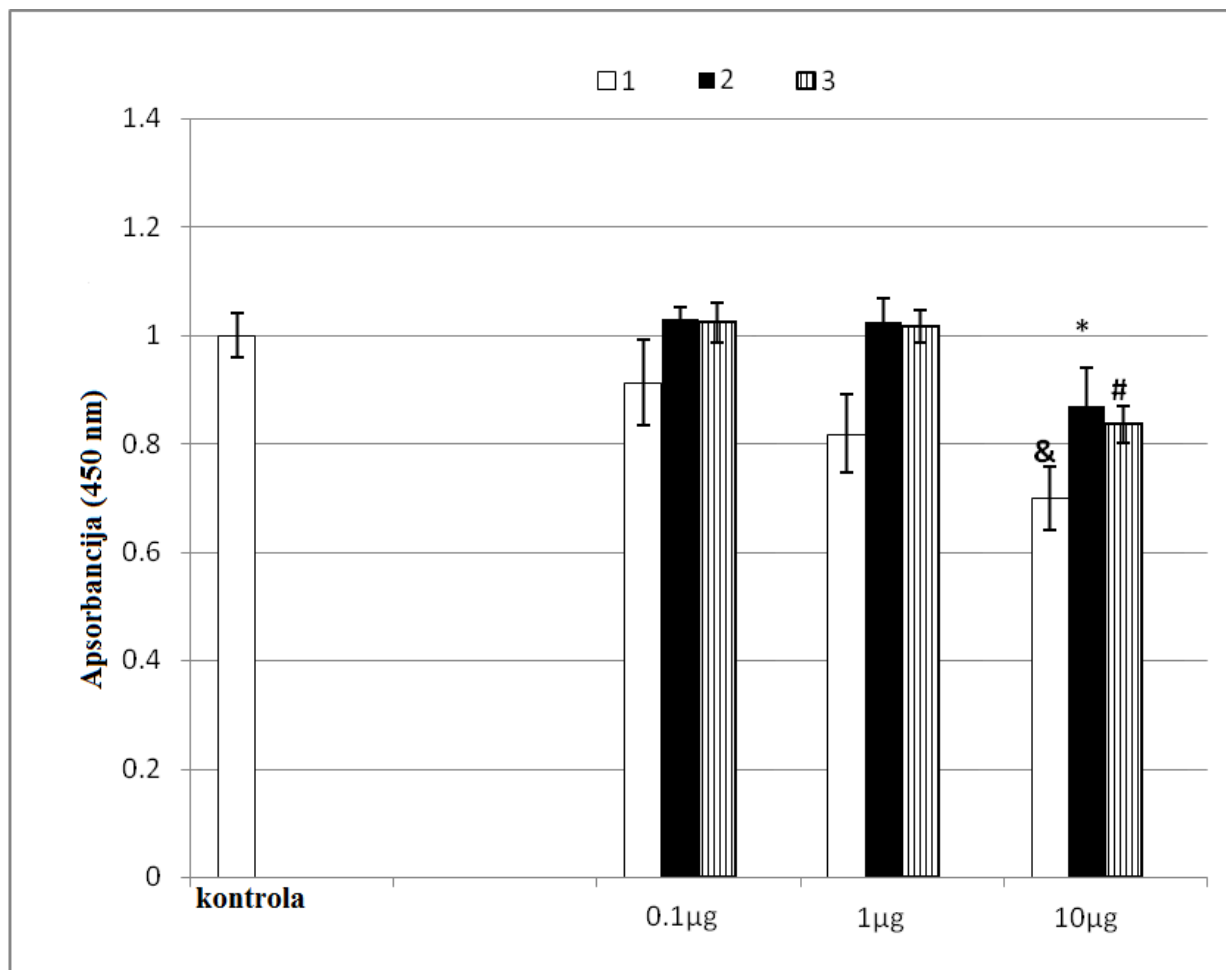
REZULTATI



Slika 31. Rezultati ispitivanja efekta izolovanih depsidona (0,1, 1, 10 µg) na proliferaciju timocita pacova nakon inkubacije od 24 h (1- fizodalična kiselina, 2- fizodična kiselina, 3- 3-hidroksifizodična kiselina, *- p < 0,05, #- p <0,001)

Jedinjenja 1, 2 i 3 u koncentraciji od 10 µg/bunarčiču pokazuju znatno smanjenje proliferacije timocita (slika 31).

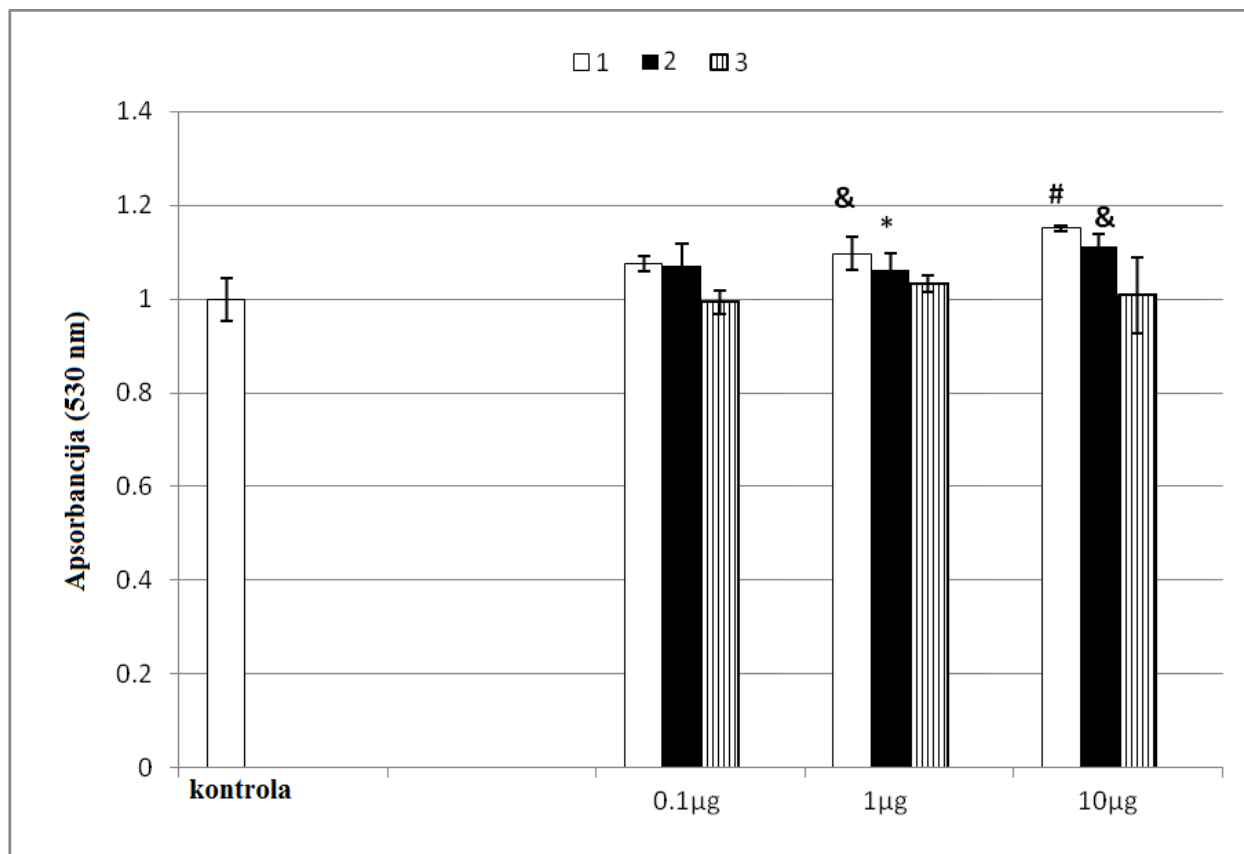
REZULTATI



Slika 32. Rezultati ispitivanja efekta izolovanih depsidona **1-3** na vijabilnost timocita pacova nakon inkubacije od 24 h (**1**- fizodalična kiselina, **2**- fizodična kiselina, **3**- 3-hidroksifizodična kiselina, *-p < 0,05, # -p < 0,001, & -p < 0,01)

Da bi utvrdili da li je smanjena proliferacija timocita uzrokovana povećanjem citotoksičnosti, ispitivan je efekat testiranih jedinjenja na vijabilnost timocita pacova, korišćenjem CCK-8 testa. Kao što je prikazano na slici 32, uočena je značajno povećana citotoksičnost kada su ćelije inkubirane sa jedinjenjima **1**, **2** i **3** u koncentraciji od 10 µg/bunarčiću, u poređenju sa kontrolom.

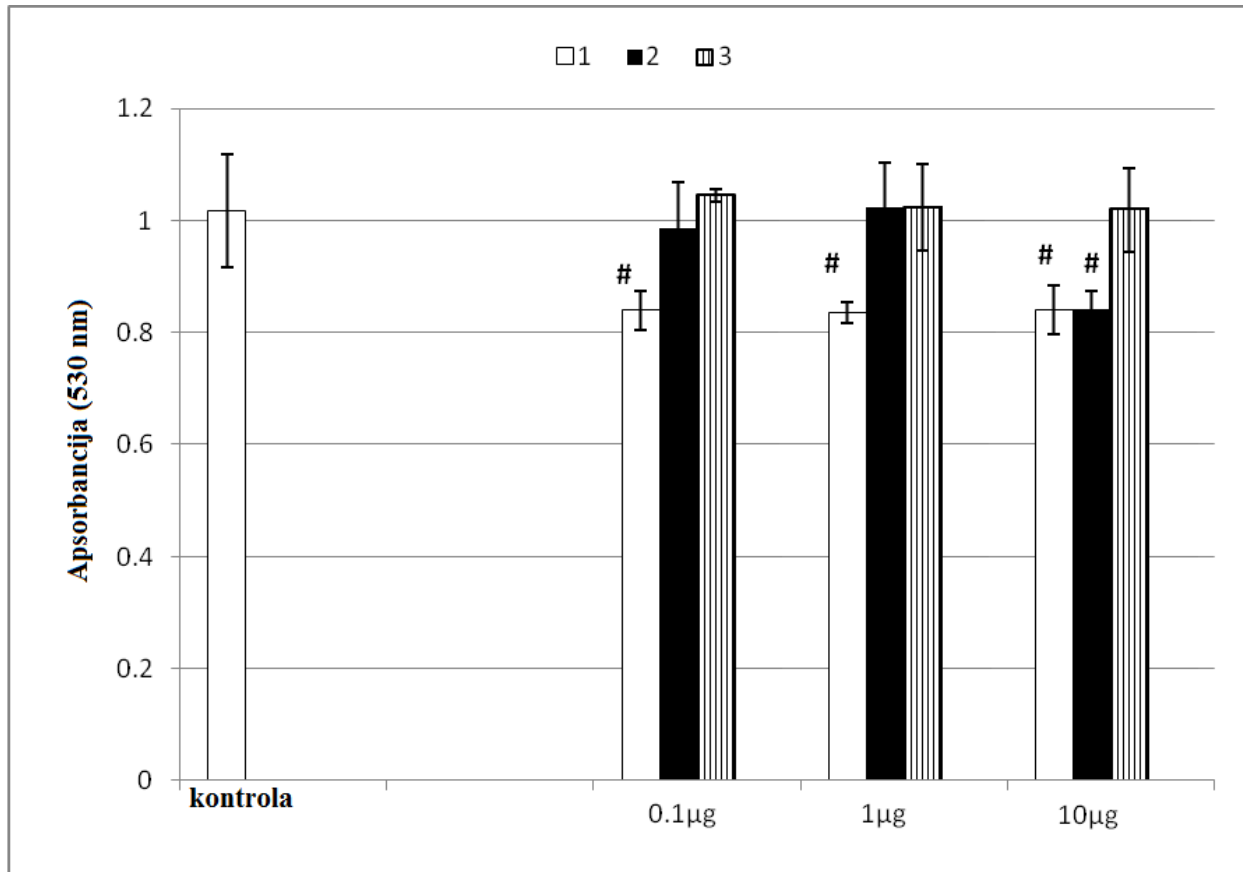
REZULTATI



Slika 33. Rezultati ispitivanja efekta izolovanih depsidona **1-3** na proizvodnju ROS u timocitima pacova (**1**- fizodalična kiselina, **2**- fizodična kiselina, **3**- 3-hidroksifizodična kiselina, *- $p < 0,05$, # - $p < 0,001$, & - $p < 0,01$)

Da bi utvrdili potencijalne mehanizme toksičnosti, određena je intracelularna proizvodnja ROS-a kao i promene u MMP. Rezultati prikazani na slici 33, ukazuju na statistički značajno povećanje proizvodnje intracelularnih ROS čestica kod ćelija tretiranih jedinjenjem **1** i **2** u koncentracijama od 1 µg i 10 µg/bunarčiću. Istovremeno, povećanje nivoa ROS-a je praćeno značajnim smanjenjem MMP timocita inkubiranih jedinjenjem **1** u svim ispitivanim koncentracijama i jedinjenjem **2** u koncentraciji od 10 µg/bunarčiću (slika 34). Tretiranje timocita jedinjenjem **3** nije rezultiralo statistički značajnim promenama MMP-a i intracelularne proizvodnje ROS-a (slike 33 i 34).

REZULTATI

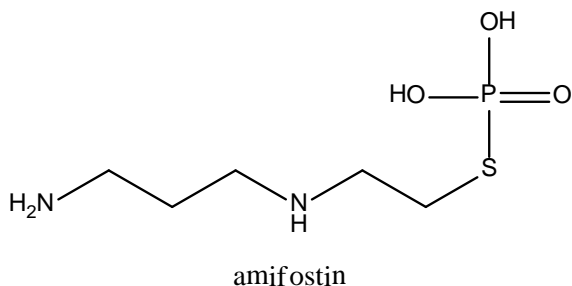


Slika 34. Rezultati ispitivanja efekta izolovanih depsidona **1-3** na mitohondrijalni membranski potencijal timocita pacova (**1**- fizodalična kiselina, **2**- fizodična kiselina, **3**- 3-hidroksifizodična kiselina, # -p <0,001)

REZULTATI

4.5. Uticaj ispitivanih supstanci na formiranje mikronukleusa u humanim limfocitima

Delovanje izolovanih jedinjenja i ekstrakata na formiranje mikronukleusa u humanim limfocitima određeno je citokinezis blok-metodom (CBMN, *Cytokinesis-block micronucleus assay*) Fenech-a i Morley-a (1985). Poređenje aktivnosti je vršeno u odnosu na kontrolu i komercijalni protektant amifostin (slika 35).



Slika 35. Struktura amifostina

Pošto formiranje mikronukleusa zavisi od ćelijske proliferacije, urađena je i kvantifikacija ćelijske proliferacije izračunavanjem citokinezis -blok proliferacionog indeksa (CBPI, *cytokinesis-block proliferation index*) po formuli:

$$\text{CBPI} = (\text{M1} + 2 \times \text{M2} + 3 \times \text{M3} + 4 \times \text{M4}) / \text{N}$$

M1 do M4 je broj ćelija sa jednim do četiri jedara a N je ukupan broj brojanih ćelija.

Rezultati su prikazani u tabeli 4 i na histogramima (slike 36 i 37).

REZULTATI

Tabela 4. Učestalost mikronukeusa (MN), distribucija mikronukleusa po ćeliji, frekvencija mikronukleusa i citokinezis-blok proliferacionog indeksa u ćelijskim kulturama humanih limfocita

Uzorak (koncentracija u $\mu\text{g/mL}$)	MN/1000 Bn ćelija	% Bn ćel. sa MN	MN/Bn ćelija	CBPI	Frekvenc. MN (%)
Kontrola	24,1 \pm 1,7	1,9 \pm 0,2	1,2 \pm 0,04	1,6 \pm 0,02	100,0
Amifostin (1,0)	20,7 \pm 0,4	1,8 \pm 0,04	1,2 \pm 0,03	1,7 \pm 0,02	85,9
1 (1,0)	18,8 \pm 3,5	1,5 \pm 0,3	1,3 \pm 0,1	1,6 \pm 0,02	78,0
1 (2,0)	21,6 \pm 0,7	1,5 \pm 0,1	1,2 \pm 0,05	1,7 \pm 0,01	78,7
2 (1,0)	17,3 \pm 1,4 ^{a*}	1,4 \pm 0,1	1,2 \pm 0,01	1,6 \pm 0,03	71,8
2 (2,0)	19,2 \pm 0,9 ^{a*}	1,5 \pm 0,1	1,2 \pm 0,07	1,6 \pm 0,01	79,7
3 (1,0)	16,8 \pm 1,9 ^{a*}	1,5 \pm 0,1	1,1 \pm 0,05	2,0 \pm 0,3	69,7
3 (2,0)	18,0 \pm 1,0 ^{a*,b*}	1,6 \pm 0,1	1,1 \pm 0,05	2,0 \pm 0,3	74,7
4 (1,0)	18,9 \pm 1,2 ^{a*}	1,5 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	1,6 \pm 0,03	78,4
4 (2,0)	22,3 \pm 1,4	1,6 \pm 0,1	1,2 \pm 0,04	1,9 \pm 0,3	95,5
Metanolni ekstrakt (1,0)	21,9 \pm 0,6	1,7 \pm 0,1	1,3 \pm 0,04	1,7 \pm 0,05	90,9
Metanolni ekstrakt (2,0)	23,7 \pm 0,4 ^b	1,9 \pm 0,1	1,2 \pm 0,05	1,7 \pm 0,02	98,3
Acetonski ekstrakt (1,0)	22,8 \pm 0,6 ^{b*}	1,7 \pm 0,2	1,3 \pm 0,1	1,7 \pm 0,02	94,6
Acetonski ekstrakt (2,0)	24,9 \pm 0,6 ^b	1,9 \pm 0,1	1,3 \pm 0,04	1,7 \pm 0,01	103,3
Etarski ekstrakt (1,0)	19,9 \pm 1,3	1,6 \pm 0,2	1,2 \pm 0,05	1,6 \pm 0,01	82,6
Etarski ekstrakt (2,0)	23,4 \pm 0,8 ^{b*}	1,8 \pm 0,1	1,2 \pm 0,02	1,7 \pm 0,05	97,1

MN/1000 Bn ćelija → učestalost MN na 1000 pregledanih binukleusnih (Bn) ćelija

% Bn ćelija sa mikronukleusima

MN/Bn ćelija → distribucija MN po ćeliji

CBPI → citokinezis blok proliferacioni indeks

Frekvencija MN → učestalost MN predstavljena kao % od kontrole

Statistička značajnost između različitih grupa je računata pomoću analize varijanse (One-way ANOVA), korišćenjem Tukey testa. Statistička značajnost je računata sa stepenom značajnosti $p < 0,01$ i $p < 0,05$

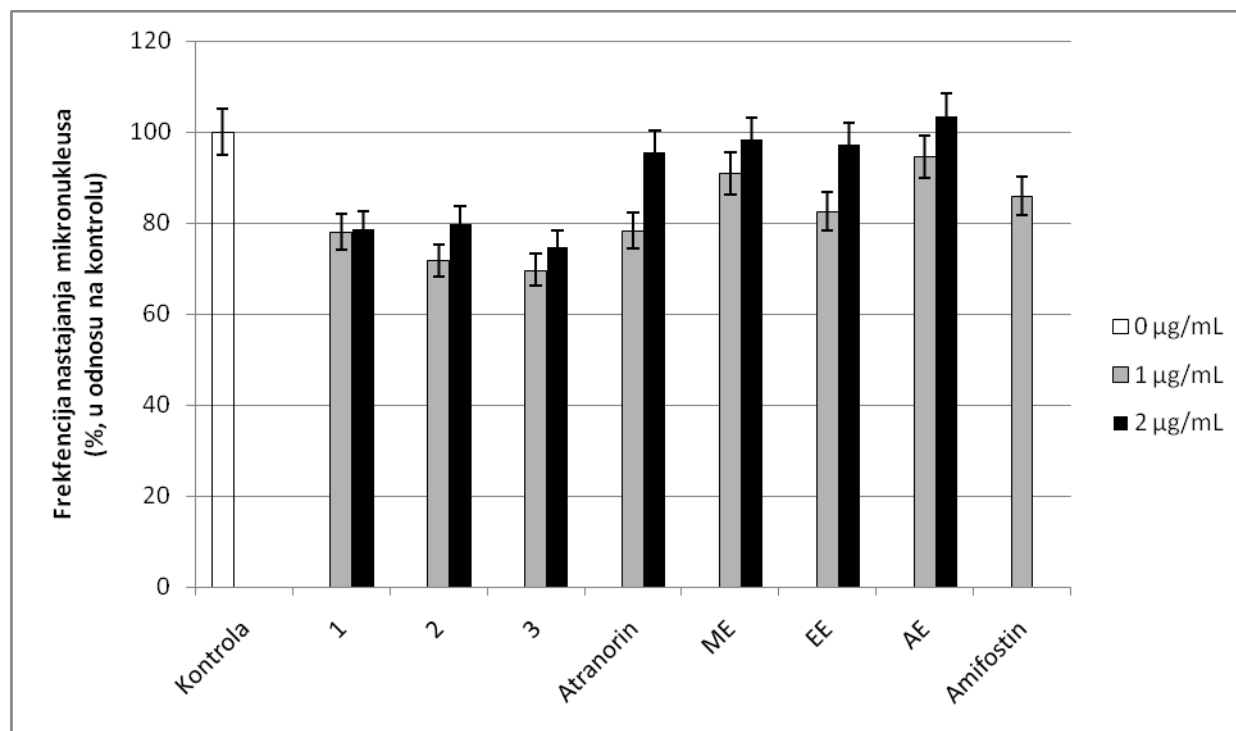
a → poređenje sa kontrolnom grupom, statistička značajnost $p < 0,01$

a* → poređenje sa kontrolnom grupom, statistička značajnost $p < 0,05$

b → poređenje sa amifostinom-WR 2721, statistička značajnost $p < 0,01$

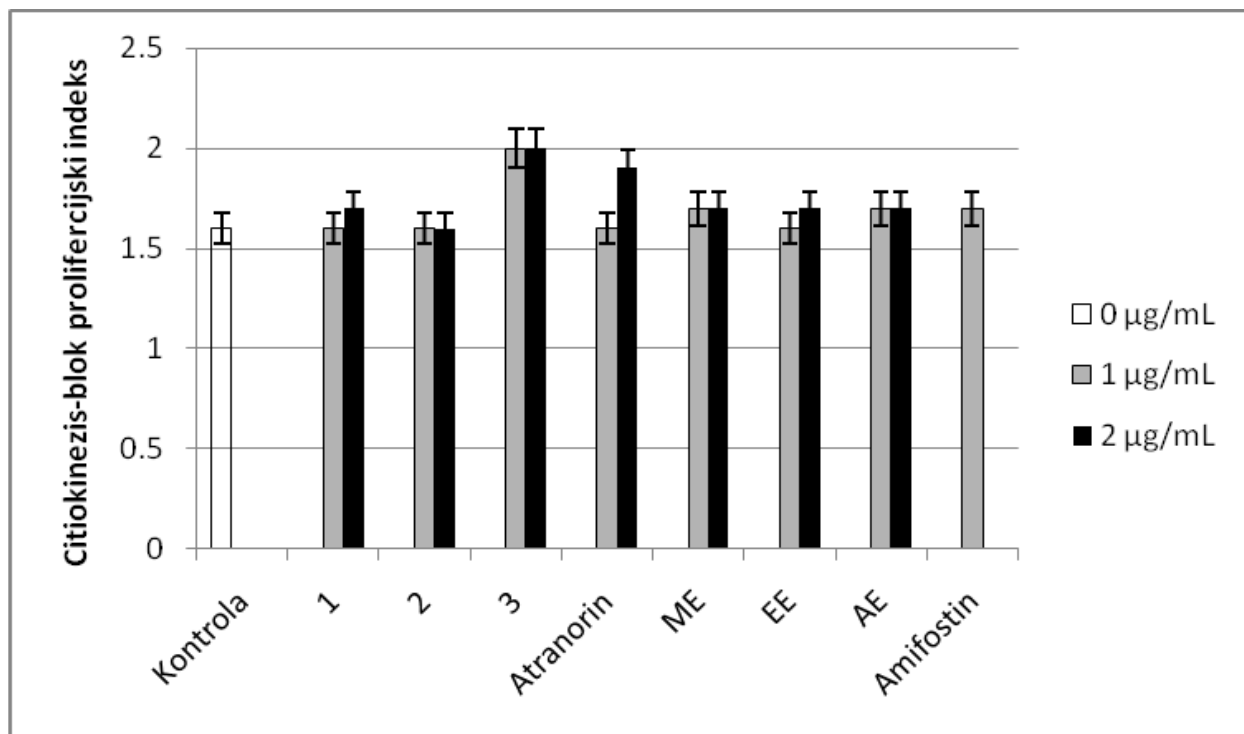
b* → poređenje sa amifostinom-WR 2721, statistička značajnost $p < 0,05$

REZULTATI



Slika 36. Efekat fizodalične kiseline (1), fizodične kiseline (2), 3-hidroksifizodične kiseline (3), atranorina (4) i ekstrakata *H. physodes* na frekvenciju nastajanja mikronukleusa (% u odnosu na kontrolu) u humanim limfocitima

REZULTATI



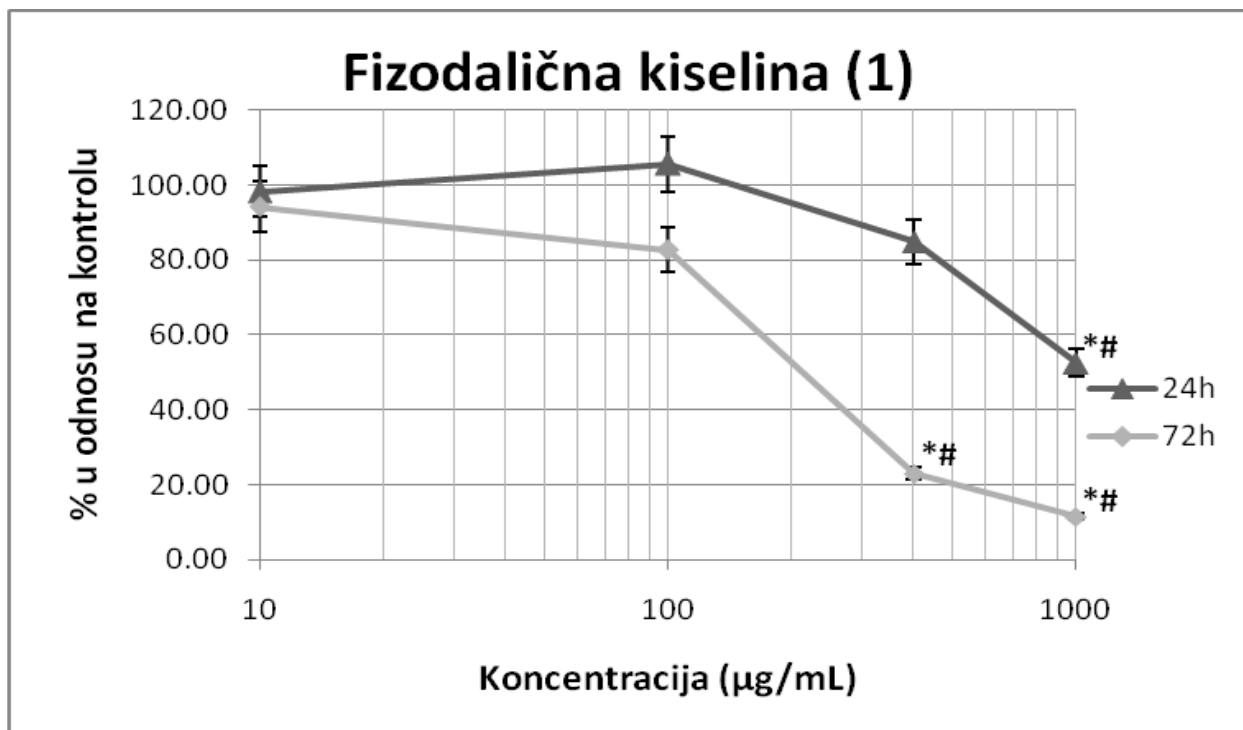
Slika 37. Efekat fizodalične kiseline (1), fizodične kiseline (2), 3-hidroksifizodične kiseline (3), atranorina (4) i metanolnog, etarskog i acetonskog ekstrakata (ME, EE i AE, respektivno) *Hypognmia physodes* na citokinezis-blok proliferacijski indeks u limfocitima humane krvne plazme

Rezultati pokazuju da efekat izolovanih jedinjenja i ekstrakata zavisi od koncentracije. Veće smanjenje broja mikronukleusa uočava se za koncentraciju od 1 µg/mL (tabela 4, slika 36). Uzorak tretiran acetonskim ekstraktom koncentracije 2 µg/mL ima neznatno (3,3 %) veći broj mikronukleusa od kontrolnog uzorka. U koncentraciji od 1 µg/mL najjači efekat ispoljava jedinjenje 3 (smanjenje od 30,3 %), slede jedinjenja 2 (28,2 %), 3 (22,0 %), 4 (21,6 %), etraski (17,4 %), metanolni (9,2%) i acetonski ekstrakt (5,4 %) (tabela 4, slika 36). Sva izolovana jedinjenja i etraski ekstrakt imaju jači efekat od amifostina u koncentraciji od 1 µg/mL, dok u koncentraciji od 2 µg/mL veće smanjenje broja mikronukleusa od amifostina izazivaju depsidoni 1-3, dok jedinjenje 4 i ekstrakti imaju manji efekat. Citokinezis-blok proliferacioni indeks za limfocite tretirane uzorcima i kontrole je približno jednak (slika 37) pa se dobijeni rezultati mogu smatrati pouzdanim.

REZULTATI

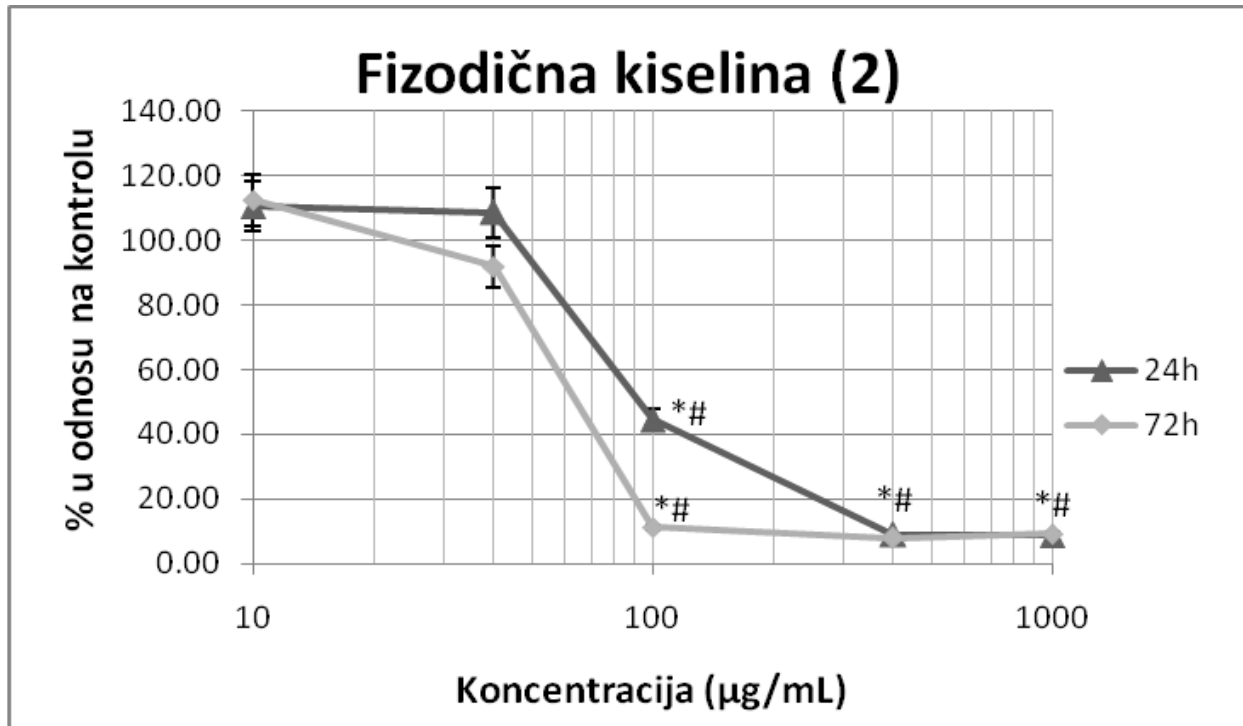
4.6. Uticaj ispitivnih supstanci na vijabilnost i proliferaciju ćelija humanog karcinoma grlića materice

Citotoksičnost i citostatičnost jedinjenja **1**, **2**, **3** i metanolnog ekstrakta *H. physodes* na HeLa ćelije nakon inkubacije od 24 i 72 sata određena je MTT testom. Koncentracije uzoraka su bile u opsegu od 10 do 1000 $\mu\text{g/mL}$ (10, 40, 100, 400 i 1000 $\mu\text{g/mL}$). Na osnovu izmerenih vrednosti apsorbancije izračunat je procenat aktivnosti uzoraka u odnosu na negativnu kontrolu. Rezultati su prikazani na dijagramima (Slika 38-41).



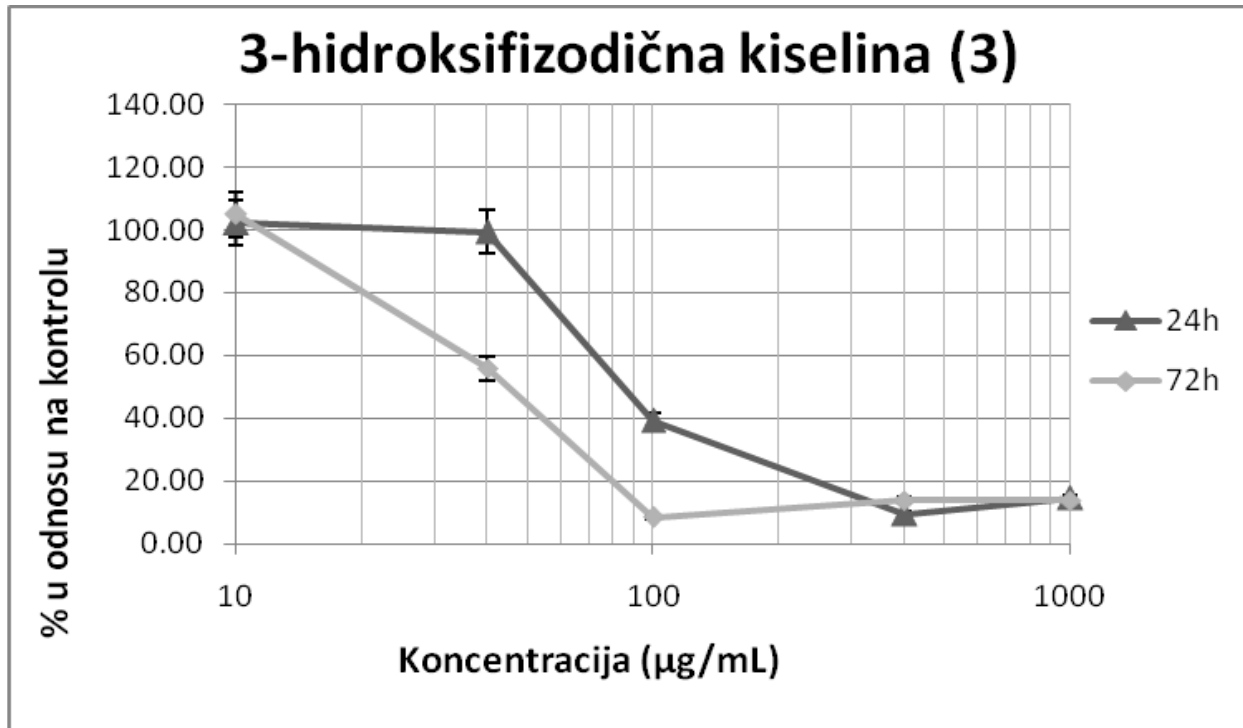
Slika 38. Efekat fizodalične kiseline (**1**) na HeLa ćelije nakon inkubacije od 24 i 72 h određenih MTT testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm\text{SD}$. *- $p < 0,05$, #- $p < 0,01$

REZULTATI



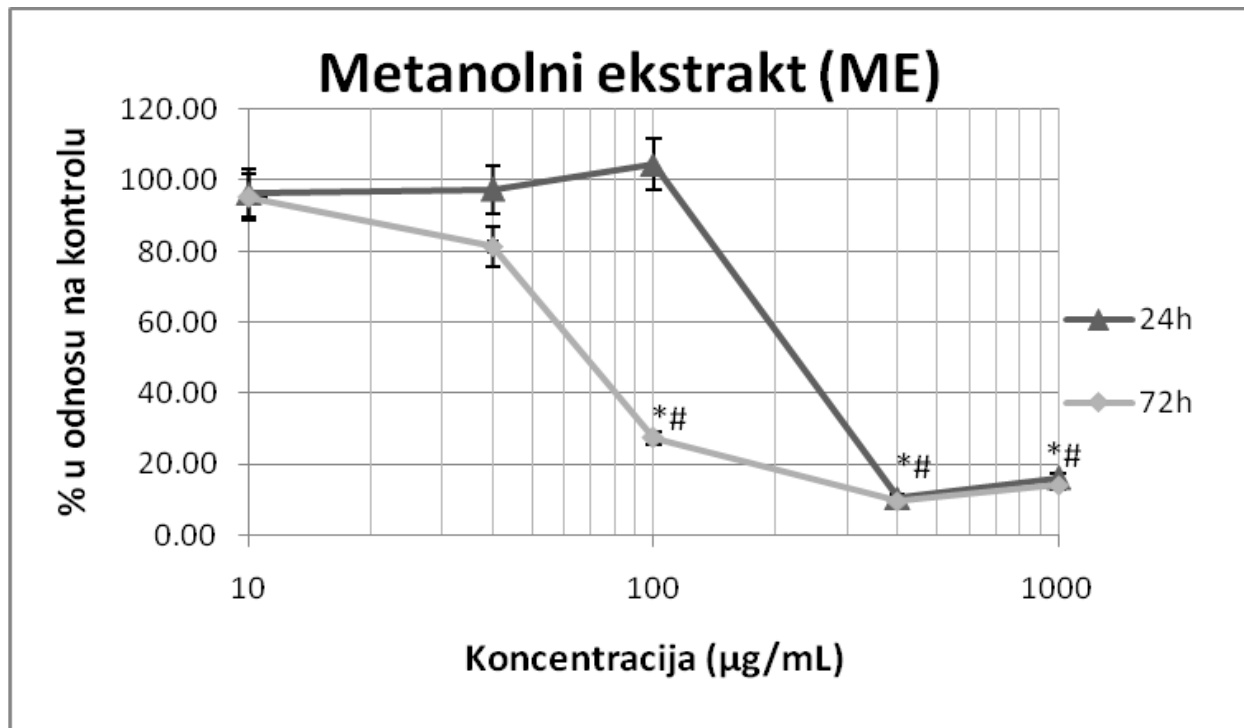
Slika 39. Efekat fizodične kiseline (2) na HeLa ćelije nakon inkubacije od 24 i 72 h određenih MTT testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD.*- $p < 0,05$, #- $p < 0,01$

REZULTATI



Slika 40. Efekat 3-hidroksifizodične kiseline (3) na HeLa ćelije nakon inkubacije od 24 i 72 h određenih MTT testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD.*- $p < 0,05$, #- $p < 0,01$

REZULTATI



Slika 41. Efekat metanolnog ekstrakta *Hypogymnia physodes* na HeLa ćelije nakon inkubacije od 24 i 72 h određenih MTT testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD.*- $p < 0,05$, #- $p < 0,01$

Jedinjenja **2** i **3** pokazuju sličan profil delovanja na HeLa ćelije sa najvećim smanjenjem vijabilnosti (24 h inkubacije) u opsegu koncentracija od 40 do 400 $\mu\text{g/mL}$ (slika 38-41). Jedinjenje **1** i metanolni ekstrakt najjače dejstvo ispoljavaju u opsegu od 200-1000 i 100-1000 $\mu\text{g/mL}$, respektivno. Nakon 72 sata inkubacije uočava se znatno povećanje antiproliferativne aktivnosti jedinjenja **1** u koncentracijama od 100, 400 i 1000 $\mu\text{g/mL}$, jedinjenja **2** u koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$, jedinjenja **3** i metanolnog ekstrakta u koncentracijama od 40 i 100 $\mu\text{g/mL}$.

IC_{50} (koncentracija uzorka koja izaziva smanjenje vijabilnosti i proliferaciju ćelija za 50 %) je izračunavana regresionom analizom. Izračunate vrednosti su date u tabeli 5.

Tabela 5. IC_{50} efekta depsidona (**1-3**), metanolnog ekstrakta (**ME**) i 5-fluorouracila (**5-FU**) na HeLa ćelije nakon inkubacije od 24 h i 72 h

REZULTATI

Uzorak	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)	
	24 h	72 h
1	964,38±104,23	282,91±5,43
2	170,50±72,81	65,96±2,40
3	97,35±4,89	63,41±9,12
Metanolni ekstrakt (ME)	253,54±13,11	67,74±6,76
5-Fluorouracil (5-FU)	8,34±0,72	0,84±0,11
Saponin	0,22±0,12	nt

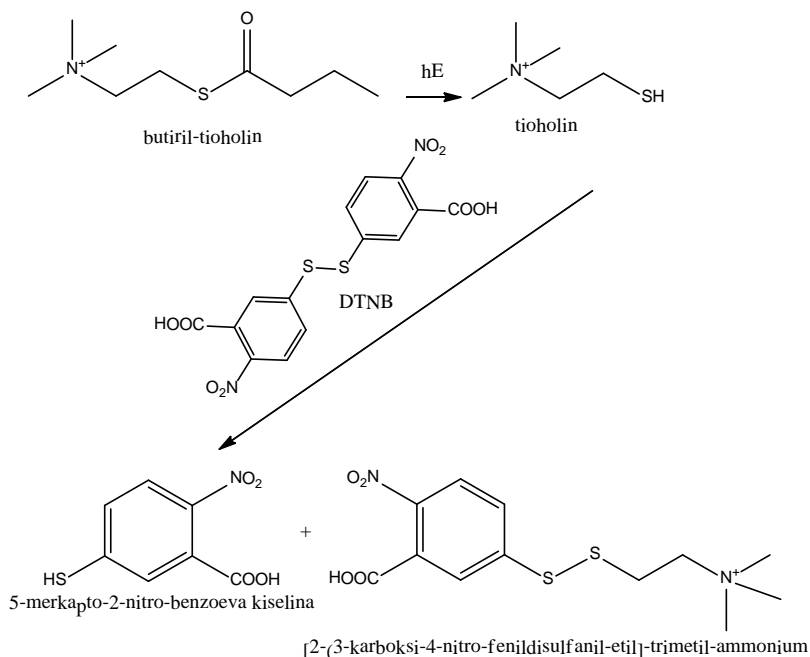
nt-nije testirano

Ispitivani depsidoni i metanolni ekstrakt imaju višestruko veće vrednosti IC₅₀ nakon inkubacije od 24 sata (od 97,35 do 964,38 µg/mL) od IC₅₀ za **5-FU** i saponin (8,34 i 0,22 µg/mL, respektivno). Produžena inkubacija znatno smanjuje vrednosti IC₅₀ ispitivanih uzoraka (63,41-282,91 µg/mL) (tabela 5).

4.7. Uticaj ispitivanih supstanci na aktivnost serumske holinesteraze

Aktivnost serumske holinesteraze u prisustvu jedinjenja **2**, **3**, **4** i komercijalnog inhibitora holinestraze, neostigmin-bromida, je određena Ellman-ovom kolorimetrijskom metodom. Kao substrat korišćen je butiril-tioholin koji nakon hidrolize reaguje sa 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoevom kiselinom (DTNB), stvarajući žuto obojeni 5-merkapt-2-nitrobenzoevu kiselinu (slika 42), čija se apsorbancija meri na 405 nm.

REZULTATI



Slika 42. Reakcije na kojima se zasniva određivanje aktivnosti holinesteraze

Rezultati ispitivanja uticaja jedinjenja **2**, **3**, **4** i neostigmin-bromida na aktivnost holinesteraze su prikazani u tabeli 6.

Tabela 6. Uticaj na aktivnost holinesteraze (%) fizodične kiseline (**2**), 3-hidroksifizodične kiseline (**3**), atranorina (**4**) i neostigmin-bromida (10 μ L rastvora koncentracija datih u tabeli u ukupnoj zapremini od 0,2 mL)

Jedinjenje	koncentracija (mg/mL)	% inhibicije (-)/aktivacije (+)
Neostigmin-bromid	0,2	-96,6
2	1,0	+1,9
2	10,0	-4,4
3	1,0	+2,2
3	10,0	+1,1
4	1,0	+3,6
4	10,0	-0,3

U poređenju sa neostigmin-bromidom uticaj ispitivanih jedinjenja na aktivnost holinesteraze je neznatan. U koncentracijama od 1 mg/mL sva tri ispitivana jedinjenja pokazuju

REZULTATI

slab aktivirajući efekat. U koncentraciji od 10 mg/mL jedinjenja **2** i **4** ispoljavaju slab inhibirajući efekat, dok jedinjenje **3** pokazuje slab aktivirajući efekat (tabela 6).

4.8. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost je određena mikrodilucionom metodom na dve *Gram-pozitivne* bakterije (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538), tri *Gram-negativne* bakterije (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i *Salmonella typhimurium* ATCC 14028), plesan *Aspergillus niger* i kvasac *Candida albicans*.

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti jedinjenja **1-4** i metanolnog ekstrakta su prikazani u tabelama 7 i 8.

Tabela 7. Minimalna inhibitorna (MIC) koncentracija (mg/mL) fizodalične kiseline (**1**), fizodične kiseline (**2**), 3-hidroksifizodične kiseline (**3**), atranorina (**4**) i metanolnog ekstrakta (**ME**)

Jedinjenje	Gram-pozitivne bakterije		Gram-negativne bakterije		Plesan	Kvasac	
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. typhimurium</i>
1	0,625	0,016	2,50	2,5	10,00	-	-
2	0,625	0,039	10,00	10,00	10,00	-	-
3	0,625	0,078	2,50	2,5	1,25	-	-
4	2,5	2,5	5,00	10,00	10,00	-	-
ME	0,625	0,156	5,00	5,00	10,00	-	-
Doksiciklin (µg/ mL)	1,56	0,781	0,781	12,5	6,25	nt	nt
Nistatin (µg/mL)	nt	nt	nt	nt	nt	0,781	6,25

REZULTATI

Tabela 8. Minimalna bactericidna/fungicidna (MBC/MFC) koncentracija (mg/mL) fizodalične kiseline (**1**), fizodične kiseline (**2**), 3-hidroksifizodične kiseline (**3**), atranorina (**4**) i metanolnog ekstrakta *Hypogymnia physodes* (**ME**)

Jedinjenje	Gram-pozitivne bakterije			Gram-negativne bakterije		Plesan	Kvasac
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimirium</i>		
1	>10,00	5,00	10,00	10,00	>10,00	-	-
2	10,00	>10,00	>10,00	>10,00	>10,00	-	-
3	2,5	0,31	10,00	10,00	5,00	-	-
4	>10,00	>10,00	10,00	>10,00	>10,00	-	>10,00
ME	2,50	1,25	10,00	10,00	>10,00	-	>10,00
Doksiciklin (µg/ mL)	1,56	6,25	0,781	12,5	>50,00	nt	nt
Nistatin (µg/mL)	nt	nt	nt	nt	nt	0,781	6,25

Sva ispitivana jedinjenja kao i ekstrakt pokazuju antibakterijsku aktivnost. Depsidoni **1-3** ne pokazuju antifungalnu aktivnost. Metanolni ekstrakt i jedinjenje **4** su aktivni prema kvascu *C. albicans* (MIC 10,0 i 5,0 mg/mL, respektivno). Plesan *A. niger* nije osetljiv na delovanje svih ispitivanih depsidona, depsida i ekstrakta. MIC vrednosti za testirane bakterije su u opsegu od 0,016 do 10,00 mg/mL, dok se MBC vrednosti kreću od 0,31 do više od 10 mg/mL. Najniže vrednosti za MIC i MBC su 0,016 mg/mL, (jedinjenje **1**) i 0,31 mg/mL (jedinjenje **3**) (respektivno) i odnose se na *S. aureus*. Najjaču baktericidnu aktivnost pokazuje jedinjenje **3**. Gram-pozitivne bakterije, *S. aureus* i *B. subtilis*, su osetljivije od drugih testiranih mikroorganizama. Efektivnost testiranih uzoraka je manja od aktivnosti komercijalnog antibiotika doksiciklina i antimikotika nistatina (tabele 7 i 8).

5. DISKUSIJA

5.1. Hemijski sastav

Iako je ekstrakcija prvi korak u procesu određivanja sastava ekstrakta i izolovanja konstituenata, u nama dostupnoj literaturi, samo u jednom radu su navedeni podaci o prinosu ekstrakta *H. physodes*. Ispitujući uticaj izloženosti suncu na količinu sekundarnih metabolita *H. physodes* Solhaug i saradnici (2009) su utvrdili da se prinos ekstrakata kreće od 6,7 % u šumama omorike do 14,4% na osunčanim morskim stenama, pri čemu su medularni depsidoni, jedinjenja **1**, **2** i protocetrarična kiselina, činili više od 95 % ekstrahovanog materijala a depsidi korteksa, jedinjenje **4** i hloratranorin, ostatak ekstrakta. Prinosi metanolnog i acetonskog ekstrakata našeg uzorka su u opsegu vrednosti Solhaug-a i saradnika (2009), dok je prinos etarskog ekstrakta za 1,5 % niži od donje granice koju su oni utvrdili.

Sadržaj jedinjenja **2** u našem i uzorcima Bialonska-e i Dayan-a (2005) se kreće u opsegu od 22,8 do 30,7 % i 22,2-25,8 %, respektivno, što je višestruko više od sadržaja u uzorcima Molnar-a i Farkaš-a (2011) koji iznosi od 0,01–5,1 %. Mogući razlog je pogrešna identifikacija konstituenata. Naime, Molnar i Farkaš su utvrdili da njihovi uzorci sadrže u velikoj količini (4,4 do 15,0 %) 2'-O-metilfizodičnu kiselinu čije retenciono vreme i UV spektar su jako slični vremenu i spektru jedinjenja **2**. Zastupljenost jedinjenja **1** u našem uzorku je nešto veća, dok je sadržaj jedinjenja **3** neznatno manji nego u uzorcima Bialonska-e i Dayan-a (2005) i Molnar-a i Farkaš-a (2011). Sadržaj depsida **4** u našem uzorku je veći u odnosu na rezultate Bialonska-e i Dayan-a (2005) a u opsegu sadržaja u uzorcima Molnar-a i Farkas-a (2011). Može se zaključiti da prisustvo **1-4** u ekstraktima *H. physodes* ne zavisi od spoljašnjih uslova (substrata, izloženosti suncu, zagađenosti atmosfere), ali da spoljašnji uslovi utiču na zastupljenost pojedinih komponenti u ekstraktu.

Upoređujući prinos ekstrakata i ukupni procenat identifikovanih jedinjenja može se zaključiti da sa porastom polarnosti rastvarača raste i količina polarnijih supstanci koje imaju R_t manje od 5 minuta (slike 8-10). Iako su njihova retencionna vremena bila vrlo bliska a zastupljenost ispod 5 %, za izolovanje konstituenata ekstrakata u ovom radu korišćen je metanolni ekstrakt u nadi da će biti moguće razdvojiti ih i izolovati u dovoljnoj količini, makar za identifikaciju. Na žalost, i posle brojnih pokušaja preparativnom HPLC i hromatografijom na atmosferskom pritisku, nije bilo uspeha.

5.2. Antioksidantna aktivnost

Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni koji sadrže nesporeni elektron. Reaguju sa molekulima u okruženju da bi postali stabilni. Ako je to okruženje ćelija onda reagiju sa proteinima, lipidima i drugim biolmolekulima u lančanim slobodnoradikalnim reakcijama. Zavisno od toga na kom atomu je lociran nesporeni elektron postoje: reaktivne vrste kiseonika (ROS - reactive oxygen species), reaktivne vrste azota (RNS - reactive nitrogen species), reaktivne vrste hlora (RCS - reactive chlorine species), reaktivne vrste broma (RBS - reactive bromine species) i reaktivne vrste sumpora (RSS - reactive sulphur species) (Halliwell i Gutteridge, 2006). ROS i RNS su učesnici normalnog metabolizma ćelije. Ako dođe do njihove hiperprodukcije, odnosno oksidativnog stresa, reaktivni kiseonični ili azotni radikali izazivaju oštećenja na proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama u ćeliji. Oštećenja na ovim biomolekulima dovode do brojnih akutnih i hroničnih bolesti koji se klinički manifestuju kao akutni i hronični zapaljenski procesi (reumatoidni artritis, vaskulitis), neurološki poremećaji (Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest, cerebrovaskularna oštećenja, mišićna distrofija), kardiovaskularni poremećaji (hipertenzija i hipertenzivna bolest srca, ateroskleroza), fibroza pluća, katarakta, maligne bolesti, ali i mnoga druga stanja koja izazivaju prerano starenje. Zato je za organizam važna antioksidantna zaštita koja obuhvata usporavanje ili sprečavanje nastajanja slobodnih radikala. Supstance koje u niskoj koncentraciji imaju takvo dejstvo nazivaju se antioksidansi. Ćeliji su potrebni različiti antioksidansi da je zaštite od štetnog dejstva različitih vrsta radikala (Gutteridge i Halliwell, 2010). Koriste se različiti eksperimenti *in vitro* da bi se selektovali substrati za eksperimente *in vivo*. U ovom radu su korišćene metode koje se zasnivaju na prenosu elektrona (ET-*elektron transfer*), TPC, TRP i ABTS^{•-}. Za DPPH[•] metodu se prvobitno smatralo da se zasniva na prenosu protona iz fenolne grupe antioksidansa na DPPH[•], međutim postoje istraživanja koja sugerišu da je transfer elektrona sa fenoksidnog anjona preovlađujući mehanizam jer je prenos protona u reakcionoj sredini (metanol) u kojoj postoje jake vodonične veze, otežan. Autori su takođe utvrdili da rezultati zavise od prisustva baza i kiselina jer utiču na ravnotežu između fenoksidnog anjona i neutralne fenolne grupe antioksidansa (Foti i saradnici, 2004).

Iako redukcionni kapacitet uzoraka koji se zasniva na ET nije direktno povezan sa njegovom sposobnošću hvatanja radikala (RSC – *radical scavenging capacity*) kao što su eksperimenti koji se zasnivaju na prenosu vodonika (HAT - *hydrogen atom transfer*) ipak predstavljaju važnu

DISKUSIJA

karakteristiku antioksidansa. Eksperimenti nisu zahtevni u vremenskom i materijalnom pogledu pa mogu poslužiti kao preliminarni za HAT i *in vivo* ispitivanja (Huang i saradnici, 2005).

Jedinjenje **3** ima najveći redukcionni kapacitet u odnosu na ostala tri ispitivana jedinjenja i metanolni ekstrakt u sva četiri eksperimenta (TPC, TRP, ABTS^{•-} i DPPH[•]). Ono što je značajno, to je, da je za istu koncentraciju, kapacitet jedinjenja **3** veći od kapaciteta koji ispoljava BHT. Poredeći strukture izolovanih jedinjenja uočava se, da u odnosu na jedinjenje **2**, koje ima dve OH grupe, jedinjenje **3** ima jednu hidroksilnu grupu više, što može biti razlog njegove veće aktivnosti. Izgleda da je kruti dibenzo[b,e][1,4]dioksepinski prsten povoljniji za ET reakcije jer jedinjenje **4** koje ima fleksibilnu strukturu, iako ima tri hidroksilne grupe kao i jedinjenje **3** ima manji kapacitet. Jedinjenja **1** i **4** imaju aldehidnu grupu u položaju 4 u kojem jedinjenje **3** ima hidroksilnu grupu. Njihov kapacitet je međusobno približan u odnosu na TPC i TRP u kojima je supstrat neorganski kompleksni jon, dok jedinjenje **4** ima veći kapacitet za voluminozne DPPH i ABTS radikale. Jedinjenja **1** i **2** se međusobno razlikuju po supstituentima u položaju 4 (jedinjenje **1** ima aldehidnu grupu a jedinjenje **2** nema supstituent) i dužini bočnog niza u položaju 6 (jedinjenje **1** ima metil grupu a jedinjenje **2** pentil grupu). Veći kapacitet ispoljava jedinjenje **2** za ABTS, jedinjenje **1** za DPPH, dok je kapacitet za TRP i TPC približano jednak za oba jedinjenja.

5.3. Uticaj ispitivanih supstanci na vijabilnost i proliferaciju timocita pacova

Iako sekundarni metaboliti, izolovani iz lišajeva, pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti (Huneck, 1999.), efekat depsidona na ćelije imunog sistema je ostao u velikoj meri nepoznat. U ovom radu je utvrđeno da izlaganje timocita jedinjenjima **1-3** u koncentraciji od 10 µg po bunarčiću u periodu od 24 h, značajno inhibira proliferaciju i vijabilnost timocita (slike 31 i 32).

Korišćenjem CCK-8 testa, pokazano je da je inhibirana proliferacija timocita praćena smanjenjem vijabilnosti ćelija. Da bi utvrdili mehanizam delovanja anti-proliferativnog i citotoksičnog efekta ispitivanih jedinjenja, urađeni su eksperimenti njihovog uticaja na produkciju ROS-a u ćeliji i promenu mitohondrijalnog membranskog potencijala.

Rezultati su pokazali da je smanjenje vijabilnosti i proliferacije praćeno povećanom proizvodnjom ROS-a i smanjenjem MMP-a ukazujući da je mogući mehanizam delovanja sprečavanje oštećenja koja su izazvana oksidativnim stresom (slike 33 i 34). Dobijeni rezultati su

DISKUSIJA

u skladu sa literaturom gde je navedeno da sekundarni metaboliti lišaja (usninska kiselina, jedinjenje **4** i giroforična kiselina) u različitim ćelijskim linijama dovode do indukovanja proizvodnje ROS-a i poremećaja u MMP (Backorova i saradnici, 2012).

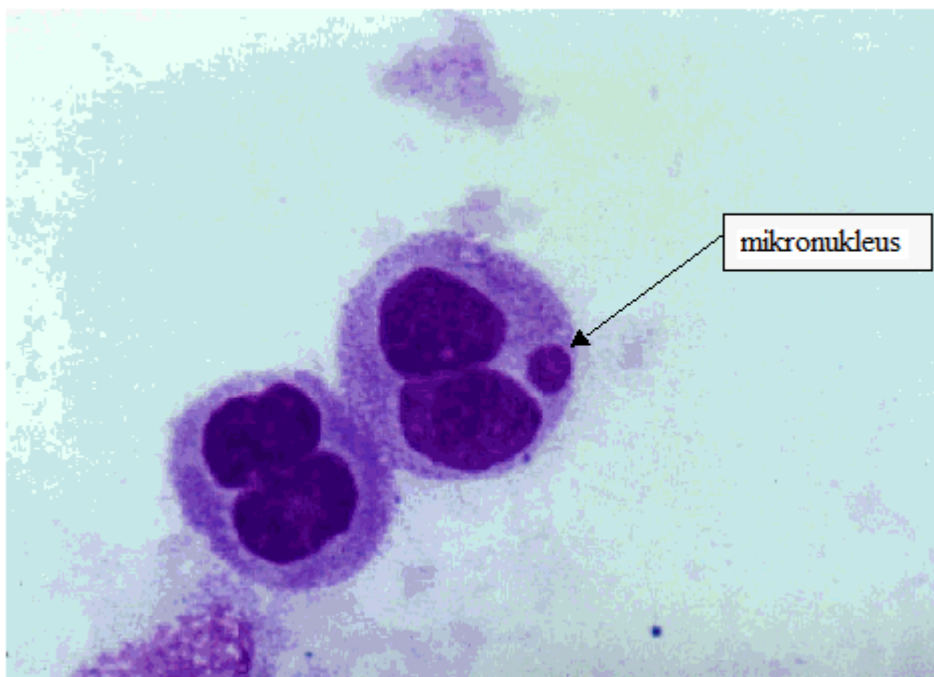
Intracelularni balans antioksidant-oksidant je kritičan za funkcionisanje ćelijskog imuniteta jer održava integritet ćelijskih komponenti i njihovu funkciju. Imune ćelije su posebno osetljive na oksidativni stres zbog visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina u svojim plazma membranama (Victor i saradnici, 2002; Pavlović i saradnici, 2012). ROS su uključeni u regulaciju mnogih važnih ćelijskih događaja, uključujući ekspresiju gena, diferencijaciju i proliferaciju (Pelicano i saradnici, 2004). Ćelijska smrt zavisi delom i od mitohondrijalne disfunkcije, koja se često karakteriše povećanjem proizvodnje ROS-a, povećanom propustljivošću membrane i eventualnim oslobađanjem medijatora ćelijske smrti iz mitohondrija (Exline i Crouser 2008). Na osnovu toga, može se zaključiti, da povišen nivo proizvodnje ROS-a i smanjeni MMP igraju značajnu ulogu u antiproliferativnom efektu jedinjenja **1** i **2** na timocitima pacova. Antiproliferativni efekat jedinjenja **3** nije praćen odgovarajućim promenama u proizvodnji ROS-a i MMP-a što ukazuje na drugačiji mehanizam njegovog delovanja.

5.4. Uticaj ispitivanih supstanci na formiranje mikronukleusa u humanim limfocitima

Mikronukleusi nastaju kao posledica hromozomskih oštećenja ili usled poremećene funkcije deobnog vretena tokom deobe ćelije. Promena broja ćelija sa mikronukleusima pod dejstvom nekog agensa u odnosu na njihov broj bez njegovog dejstva je mera njegovog kapaciteta da spreči (ako je broj ćelija sa mikronukleusima manji) ili podstakne (ako je njihov broj veći) hromozomska oštećenja. Oštećenja na molekulu DNK mogu ozbiljno da ugroze ne samo replikaciju, nego i transkripciju DNK. Da bi održale informacioni integritet genoma, ćelije poseduju sistem reparacije koji uklanja DNK lezije. Ukoliko sistem reparacije DNK funkcioniše dobro, ćelija je u stanju da obezbedi informacioni integritet svog genoma. Međutim, ako neke lezije ostanu neuklonjene, dolazi do grešaka u komplementarnom lancu DNK prilikom replikacije i do mutacije u ćeliji sledeće generacije. Indukovane lezije na molekulu DNK i neuspeli pokušaji njihove popravke, vidljivi su u fazi deobe ćelije kao raznovrsni hromozomski oblici, kakvi normalno ne postoje u humanom kariotipu, a nazivaju se hromozomskim

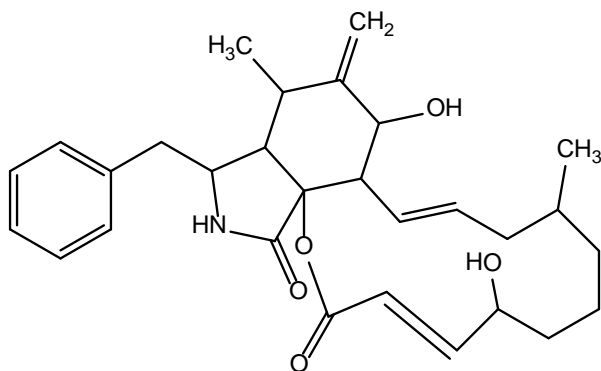
DISKUSIJA

abercijama. Tokom deoba telesnih ćelija, čiji kariotip sadrži hromozomske aberacije, u citoplazmi se formiraju mala jedra - mikronukleusi (slika 43).



Slika 43. Binuklearne ćelije bez mikronukleusa (levo) i Binuklearne ćelije sa mikronukleusom (desno) (preuzeto sa adrese: www.crios.be/genotoxicitytests/micronucleus_test.htm)

Da bi se dobili binuklearni limfoblasti limfocitne ćelijske kulture se tretiraju citohalazinom-B. Ovo jedinjenje blokira razdvajanje ćerki ćelija (citokineza), ali se ne remete biohemijski procesi u samoj ćeliji, što omogućuje neometanu deobu jedra. Na taj način nastaju binuklearni limfoblasti sa udvojenim, jasno odvojenim jedrima.



Slika 44. Struktura citohalazina B

DISKUSIJA

Mikronukleusi su oštećeni delovi hromozoma koji su za ćeliju zauvek izgubljeni i samo se u ovoj fazi mogu videti. Već posle sledeće deobe ovih mikronukleusa nema, ćelija ih odstranjuje i uništava na razne načine (ćelijska reciklaža). Ćelije koje imaju puno ovakvih mikronukleusa obično umiru. Problem su ćelije sa jednim ili dva mikronukleusa, jer one prolaze sledeću deobu ali znatno oštećene, što je siguran put ka mutacijama.

Analiza mikronukleusa CBMN metodom se koristi kao brza proba za klastogene agense (agense koji izazivaju pojavu prekida na hromozomima) (Jensen, 1974; Heddle, 1973). Za mikronukleusni test se obično koriste T-limfociti venske krvi. Za stimulaciju limfocita najčešće se koristi fitohemaglutinin (PHA), protein iz biljke *Phaseolus vulgaris* (Joksić i saradnici, 2003).

Da bi se hromozomske aberacije učinile vidljivim pod mikroskopom, nakon tretiranja uzorkom, ćelije se zaustavljaju u metafazi (jer su oštećenja jedino tada vidljiva), tretiraju hipotoničnim rastvorom da bi hromozomi nabubreli, fiksiraju se, prenose na mikroskopsku pločicu, boje i broje.

Rezultati ovog rada pokazuju da jedinjenje **3** ispoljava 2,2 puta jači efekat od komercijalnog protektanta amifostina (tabela 4) za istu primenjenu koncentraciju što bi je moglo preporučiti za *in vivo* ispitivanja. Etarski ekstrakt, koji sadrži veći procenat ove kiseline (16,5 %) od metanolnog i acetonskog ekstrakta (14,8 % i 12,4 %), izaziva i veće smanjenje broja mikronukleusa. Očito da dodatna hidroksilna grupa jedinjenja **3** u odnosu na jedinjenje **2** znatno pojačava dejstvo. S druge strane, svi depsidoni imaju jači efekat od depsida **4** što upućuje na to da je za delovanje važan i depsidonski prsten. Na osnovu ovih ispitivanja nije moguće utvrditi mehanizam kojim uzorci smanjuju broj mikronukleusa, da li sprečavaju oštećenja DNK hromozoma ili učestvuju u reparaciji prethodno nastalih oštećenja. Smatra se da izlaganje ćelije oksidativnom stresu već posle nekoliko sekundi dovodi do prekida DNK lanca, pa je jedan od mogućih mehanizama delovanja smanjenje ROS-a i RNS čestica u ćeliji. Takođe je uočeno da povećanje koncentracije dovodi do smanjenja dejstva. Ranije je utvrđeno da povećanje koncentracije ekstrakta nekih lekovitih biljaka (*Grape seed extracts*, *Blackberry seed extracts*, *Raspberry seed extracts*) koji se dodaju u ćelijske kulture humanih limfocita, dovodi do povećanja učestalosti mikronukleusa (Joksić i saradnici, 2003).

5.5. Uticaj ispitivnih supstanci na vijabilnost i proliferaciju ćelija humanog karcinoma grlića materice

HeLa ćelije su dobile naziv od početnih slova imena i prezimena pacijentkinje (**Henrietta Lacks**, 1920 – 1951) iz čijeg su kancera grlića materice izolovane. Ovo je bila prva ćelijska linija uspešno gajena *in vitro*. Zbog izdržljivosti i velike moći deobe često se primenjuju za ispitivanje citotoksičnosti različitih farmakološki aktivnih supstanci (Liu i saradnici, 2012; Guo i saradnici, 2013).

U ovom radu inkubacioni period od 24 sata je korišćen da se utvrdi dejstvo jedinjenja **1-3** i metanolanog ekstrakta na vijabilnost HeLa ćelija. Najmanju vrednost IC_{50} pokazuje jedinjenje **3**, praćeno jedinjenjem **2** i jedinjenjem **1**. Metanolni ekstrakt ima 3,8 puta manju vrednost IC_{50} od IC_{50} najmanje toksičnog depsidona, jedinjenja **1**, 1,4 i 2,6 puta veću vrednost od jedinjenja **2** i **3**, respektivno. Period od 72 sata inkubacije sa ispitivanim uzorcima je korišćen da bi se ispitao njihov uticaj na proliferaciju HeLa ćelija. Očekuje se da se u normalnim uslovima (bez dejstva uzoraka) za ovaj period inkubacije ćelije podele više puta što dovodi do povećanja broja ćelija. Za HeLa ćelije u periodu od 24 sata dolazi do dupliranja broja ćelija što podrazumeva minimalno jednu deobu. Supstance koje sprečavaju deobu i/ili smanjuju vijabilnost ćelija dovode do smanjenog broja živih ćelija što se manifestuje smanjenjem redukcije MTT-a u formazan, jer se redukcija odvija pod dejstvom mitohondrijalne sukcinat-dehidrogenaze, što je moguće samo u živim ćelijama. Zbog toga je broj živih ćelija u kulturi proporcionalan količini formazana koja se meri apsorbancijom na 540 nm.

Ispitivani uzorci pokazuju kumulativni efekat tokom vremena, naime toksični efekat je jači za period inkubacije od 72 sata u odnosu na period od 24 sata. Jedinjenja **2** i **3** imaju IC_{50} za inkubacion period od 72 h (tabela 5) približnu vrednosti IC_{50} za usninsku kiselinu (178,3 μ mol, odnosno 61,38 μ g/mL), najispitivaniji dibenzofuranski derivat izolovan iz mnogih lišaja (Backorova i saradnici, 2011).

Jedinjenje **1** ima višestruko veće vrednosti IC_{50} za oba perioda inkubacije u odnosu na jedinjenja **2** i **3**. Sve tri kiseline su depsidoni za koje je karakterističan kruti 11H-dibenzo[b,e][1,4]dioksepin-11-onski prsten (slika 4.). Ranije je utvrđeno da je ovakva struktura odgovorna za citotoksičnost (Correche i Carrasco, 2002) kao i za inhibiciju HIV-1 integraze (Neamati i saradnici, 1997). Jedinjenja **2** i **3** u pozicijama 1 i 6 imaju supstituente sa 7 i 5 C atoma, respektivno, dok jedinjenje **1** u tim pozicijama ima supstituente sa po jednim C atomom.

DISKUSIJA

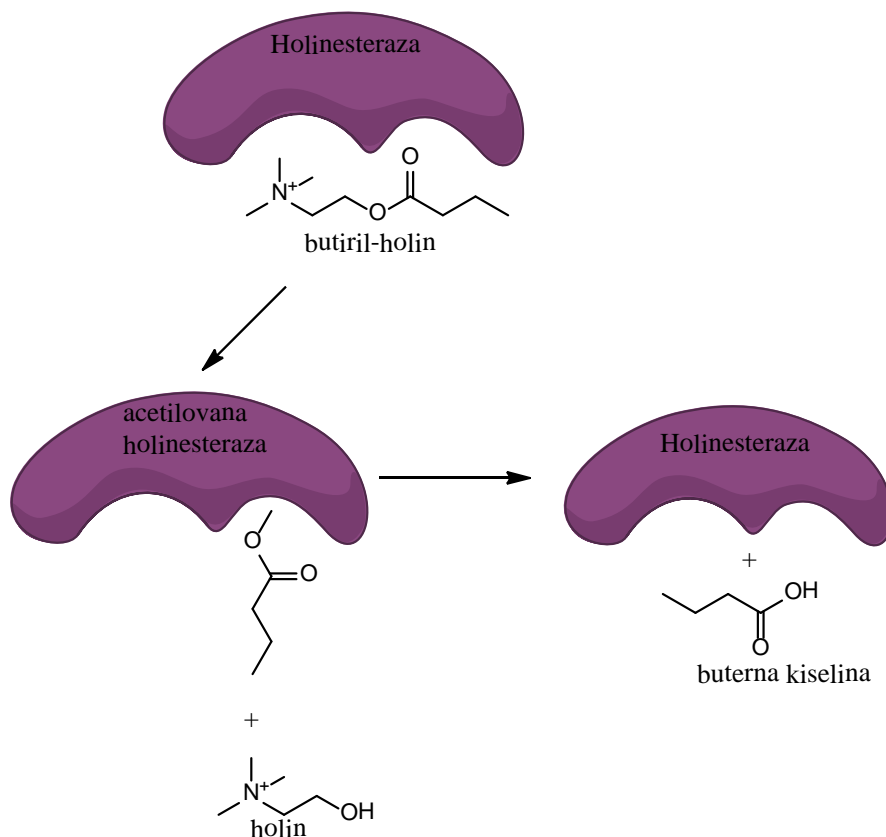
Ovakvo razmatranje bi bilo u skladu sa zapažanjima Micheletti-ja i saradnika (2009) da produženje alkil niza di-O-alkil derivata salazinske kiseline povećava citotoksičnost na ćelijske linije HCT-8, SF-295 i MDA/MB-435.

Vrednost IC_{50} metanolnog ekstrakta za period inkubacije od 24 sata je skoro jednak vrednosti koju su utvrdili Mitrović i saradnici (2011) za HCT-116 (254 $\mu\text{g/mL}$). Međutim, za period inkubacije od 72 sata naš uzorak pokazuje nižu vrednost IC_{50} (68 $\mu\text{g/mL}$) od uzorka Mitrović i saradnika (2011) (102 $\mu\text{g/mL}$).

5.6. Uticaj ispitivnih supstanci na aktivnost serumske holinesteraze

Nespecifična holinesteraza (acilholin acilhidrolaza, EC 3.1.1.8) katalizuje hidrolizu estara holina (acetil-holina, butiril-holina i benzoil-holina) (slika 45). Enzim se, osim u serumu, nalazi i u jetri, pankreasu, slezini i intestinalnoj mukozi. Postoji i prava, specifična holinesteraza (acetilholinesteraza, AchE, E.C. 3.1.1.7.), koja hidrolizuje samo acetil-holin ili acetil- β -metilholin. Prava holinesteraza se nalazi u presinaptičkim i postsinaptičkim holinergičkim neuronima i na membrani eritrocita, pa se naziva i eritrocitna holinesteraza. Ovaj enzim kontroliše ekscitabilne membrane i ima ključnu ulogu u nervnoj provodljivosti pri neuromuskularnom prenosu. Ima je u sivoj masi nervnog sistema, amnionskoj tečnosti i placenti, ali ne u plazmi.

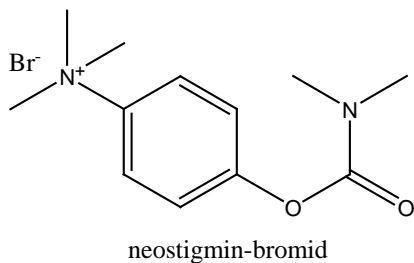
DISKUSIJA



Slika 45. Šematski prikaz delovanja holjesteraze na butiril-holin

U mozgu obolelih od Alchajmerove boleti pronađeno je sniženje nivoa više neurotransmitera, od kojih je najviše izražen deficit acetyl-holina – neurotransmitera neophodnog za procese učenja, pamćenja i pažnje. Inhibitori AChE dovode do povećanja koncentracije acetyl-holina što usporava napredovanje boleti. Neostigmin-bromid (slika 46) je komercijalni inhibitor holjestraze, koji ima i neke neželjene efekte (glavobolja, zamagljen vid, alergijske reakcije), zbog čega je potrebno tragati za jedinjenjima koja imaju inhibitorski efekat ali nemaju/imaju manje izražene štetne efekte.

DISKUSIJA



Slika 46. Struktura neostigmin bromida

Rezultati ispitivanja aktivnosti serumske holinesteraze u prisustvu jedinjenja **2-4**, pokazuju da ispitivana jedinjenja nisu inhibitori holinesteraze kao što je to neostigmin-bromid (koji ima i katjonski i estarski deo kao i estri holina, dok ispitivana jedinjenja nemaju katjonski deo).

5.7. Antimikrobna aktivnost

Ispitivana jedinjenja **1-4** i metanolni ekstrakt ispoljavaju bakteriostatsku i baktericidnu aktivnost prema dve *Gram-pozitivne* bakterije (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538), tri *Gram-negativne* bakterije (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i *Salmonella typhimurium* ATCC 14028), dok samo metanolni ekstrakt i jedinjenje **4** pokazuju antifungalnu aktivnost na *C. albicans*. Plesan *A. niger* je rezistentan na delovanje ispitivanih jedinjenja **1-4** i metanolnog ekstrakta. Rezultati ispitivanja Rankovića i saradnika (2008; 2014), Turk-a i saradnika (2006) i Kosanića i saradnika (2013) pokazuju da jedinjenje **2** ispoljava antimikrobnu aktivnost na *Gram-pozitivne* bakterije *B. subtilis* i *S. aureus*, što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Za razliku od Turk-a i saradnika (2006), naša ispitivanja pokazuju da jedinjenje **2** ispoljava antimikrobnu aktivnost prema *E. coli* što je u skladu sa ispitivanjima Rankovića i saradnika (2008; 2014) i Kosanića i saradnika (2013). Takođe, za razliku od rezultata Turk-a i saradnika (2006), naši rezultati pokazuju da jedinjenje **2** ispoljava antimikrobnu aktivnost prema *S. typhimurium* i *P. aeruginosa*. U našim eksperimentima jedinjenje **2** nije ispoljilo antifungalnu aktivnost prema *C. albicans* za razliku pokazane aktivnosti u radovima Rankovića i saradnika (2008; 2014), Turk-a i saradnika (2006) i Kosanića i saradnika (2013). Za jedinjenje **4** je utvrđeno da ispoljava antimikrobnu aktivnost prema *B. subtilis*, *E. coli*, *C. albicans* (Ranković i saradnici, 2008; 2014) i *S. aureus* (Marante i saradnici, 2003; Ranković i saradnici, 2008; 2014) što je u skladu sa našim rezultatima. Jedinjenje **3** u našim eksperimentima pokazuje antimikrobnu aktivnost prema *B. subtilis*, *S.*

DISKUSIJA

aureus, *E. coli* i *S. typhimurium* što je u saglasnosti sa istraživanjem Yilmaz-a i saradnika (2005). Za razliku od Yilmaz-a i saradnika (2005), naša ispitivanja pokazuju da jedinjenje **3** ne poseduje antifungalnu aktivnost prema *C. albicans*. Metanolni ekstrakt *H. physodes* pokazuje antimikrobnu aktivnost na sve ispitivane bakterije i antifungalnu aktivnost prema *C. albicans* što je u saglasnosti sa istraživanjem Mitrović i saradnika (2011). O antimikrobnoj aktivnosti jedinjenja **1** nismo našli podatke u dostupnoj literaturi, tako da je u ovoj disertaciji prvi put ispitivana antimikrobna aktivnost jedinjenja **1**.

6. ZAKLJUČAK

Ciljevi doktorske disertacije "Biološka aktivnost depsidona i atranorina izolovanih iz lišaja *Hypogymnia physodes*" su ostvareni određivanjem hemijskog sastava ekstrakata *H. physodes*, izolovanjem, strukturnom determinacijom i ispitivanjem biološke aktivnosti tri depsidona (**1-3**) i jednog depsida (**4**). Dobijeni su sledeći rezultati:

- Ekstrakcijom metanolom, acetonom i etrom dobijeno je 10,8 %, 7,3 % i 5,2% suvog ekstrakta u odnosu na suv biljni materijal (respektivno).
- Relativna zastupljenost komponenti metanolnog, acetonskog i etarskog ekstrakata izražena kao % udela pika u ukupnoj površini pikova HPLC hromatograma je bila: 28,7 %, 38,7 % i 34,9 %, respektivno, za fizodaličnu kiselinu (**1**), 26,5 %, 22,8 % i 30,7 %, respektivno, za fizodičnu kiselinu (**2**), 14,8 %, 12,4 % i 16,5 %, respektivno, za 3-hidroksifizodičnu kiselinu (**3**) i 5,8 %, 12,4 % i 11,0 %, respektivno, za atranorin (**4**).
- Preparativnom HPLC i hromatografijom na koloni na atmosferskom pritisku metanolnog ekstrakta *Hypogymnia physodes*, nakon izolovanja atranorina, dobijeni su depsidoni, **1**, **2** i **3** HPLC čistoće 93,8 %, 95,6 % i 94,5 %, respektivno
- Depsid atranorin (**4**), HPLC čistoće 99,4 %, je dobijen prekrizacijom iz acetona toluenske frakcije metanolnog ekstrakta.
- Strukturna determinacija je izvršena masenom spektrometrijom, UV, ¹H-NMR i ¹³C-NMR spektroskopijom.
- Evaluacija antioksidantnog kapaciteta metanolnog ekstrakta *H. physodes* i izolovanih jedinjenja urađena je određivanjem sadržaja ukupnih fenola (TPC), sposobnosti „hvatanja“ DPPH• i ABTS• radikala kao i ukupnog redukcionog kapaciteta (TRP).
- Najveću kapacitet redukcije Mo(VI) u Mo(V) (reakcija na kojoj se zasniva određivanje TPC) ima 3-hidroksifizodična kiselina (**3**). Svi depsidoni u svim koncentracijama imaju veći kapacitet od depsida atranorina (**4**). U koncentraciji od 1 mg/mL, 3-hidroksifizodična kiselina (**3**), fizodična kiselina (**2**) i metanolni ekstrakt imaju veći kapacitet od BHT-a.

ZAKLJUČAK

- Najveću sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala, značajno veću od ostalih jedinjenja i ekstrakta, a 1,7 puta veću od BHT-a ima 3-hidroksifizodična kiselina (3). Metanolni ekstrakt ima veću aktivnost u odnosu na fizodaličnu kiselinu (1), fizodičnu kiselinu (2) i atranorin (4).
- Najveću sposobnost neutralizacije ABTS[•] radikala ima 3-hidroksifizodična kiselina (3), slede metanolni ekstrakt, fizodična kiselina (2), atranorin (4), a najmanju aktivnost ispoljava fizodalična kiselina (1).
- Opadajući redosled redukcionne sposobnosti Fe(CN)₆³⁻ u Fe(CN)₆⁴⁻ (reakcija na kojoj se zasniva TRP) je 3-hidroksifizodična kiselina (3), metanolni ekstrakt, fizodična kiselina (2), fizodalična kiselina (1) i atranorin (4).
- Uočena je značajno povećana citotoksičnost i citostatičnost kada su ćelije timocita inkubirane sa fizodaličnom kiselinom (1), fizodičnom kiselinom (2) i 3-hidroksifizodičnom kiselinom (3) u koncentraciji od 10 µg po bazenčiću.
- Tretiranje timocita fizodaličnom kiselinom (1) i fizodičnom kiselinom (2) u koncentracijama od 1 µg i 10 µg po bazenčiću dovodi do povećanje proizvodnje intracelularnih ROS-a dok tretiranje 3-hidroksifizodičnom kiselinom (3) nije rezultiralo značajnim povećanjem intracelularne proizvodnje ROS-a.
- Značajno smanjenje MMP-a izaziva jedinjenje 1 u svim ispitivanim koncentracijama i jedinjenje 2 u koncentraciji od 10 µg po bazenčiću.
- Sva izolovana jedinjenja i etraski ekstrakt izazivaju veće smanjenje broja ćelija humanih limfocita sa mikronukleusima od komercijalnog protektanta amifostina za koncentraciju od 1 µg/mL, dok za koncentraciju od 2 µg/mL veće smanjenje od amifostina izazivaju depsidoni (1, 2 i 3), a atranorin (4), etraski, acetonski i metanolni ekstrakt imaju manji efekat.
- Za inkubacioni period od 24 sata (određivanje vijabilnosti HeLa ćelija) i 72 sata (određivanje proliferacije HeLa ćelija) redosled citotoksične i citostatične aktivnosti je isti, 3-hidroksifizodična kiselina (3), praćena fizodičnom kiselinom (2), metanolnim

ZAKLJUČAK

ekstraktom i fizodaličnom kiselinom (2), ali su vrednosti IC_{50} znatno manje za duži inkubacioni period.

- Uticaj fizodične kiseline (2), 3-hidroksifizodične kiseline (3) i atranorina (4) na aktivnost holinesteraze je neznatan. U koncentracijama od 1 mg/mL sva tri jedinjenja pokazuju slab aktivirajući efekat, pri čemu nešto jači efekat pokazuje depsid atranorin (4). Slab inhibirajući efekat ispoljavaju atranorin (4) i fizodična kiselina (2) u koncentraciji od 10 mg/mL, dok 3-hidroksifizodična kiselina (3) pokazuje slab aktivirajući efekat.
- Sva ispitivana jedinjenja (1-4), kao i metanolni ekstrakt, pokazuju antibakterijsku aktivnost u odnosu na dve Gram-pozitivne bakterije (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) i tri Gram-negativne bakterije (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i *Salmonella typhimurium* ATCC 14028). Depsidoni (1-3) ne pokazuju antifungalnu aktivnost. Ekstrakt i depsid atranorin (4) su aktivni prema kvascu *C. albicans*. Plesan *A. niger* je rezistentan na delovanje svih ispitivanih depsidona, depsida i ekstrakta.

Poređenjem nama dostupne literature i navedenih rezultata ustanovljeno je da su po prvi put urađena ispitivanja:

- uticaja metanolnog ekstrakta *Hypogymnia physodes* na ćelije humanog karcinoma grlića materice i broj mikronukleusa u humanim limfocitima,
- uticaja atranorina (4) na broj mikronukleusa u humanim limfocitima i aktivnost serumske holinesteraze,
- antioksidantne aktivnosti 3-hidroksifizodične kiseline (3) i njenog uticaja na timocite pacova, na broj mikronukleusa u humanim limfocitima, na ćelije humanog karcinoma grlića materice i na aktivnost serumske holinesteraze kao i
- uticaja fizodične kiseline (2) na timocite pacova, na broj mikronukleusa u humanim limfocitima, na ćelije humanog karcinoma grlića materice i na aktivnost serumske holinesteraze i

ZAKLJUČAK

- antioksidantne aktivnosti fizodalične kiseline (**1**) i njen uticaj na na timocite pacova, na broj mikronukleusa u humanim limfocitima, na ćelije humanog karcinoma grlića materice i na aktivnost serumske holinesteraze.

Jedinjenje **3** (3-hidroksifizodična kiselina) pokazuje veću antioksidantnu aktivnost od komercijalnog antioksidansa 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroksitoluena (BHT) i smanjuje broj mikronukeusa u limfocitima humane krvne plazme 2,2 puta više od komercijalnog protektanta amifostina što ga svrstava u dobre kandidate za *in vivo* eksperimente.

7. LITERATURA

- Abdou R, Scherlach K, Dahse HM, Sattler I, Hertweck C. Botryorhodines A-D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*. *Phytochemistry* 2010; 71(1): 110-6.
- Asahina Y, Shibata S. Chemistry of lichen substances. California: Asher, 1954.
- Backorova M, Backor M, Mikes J, Jendzelovsky R, Fedorocko P. 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.
- Backorova M, Jendzelovsky R, Kello M, Backor M, Mikes J, Fedorocko P. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicol In Vitro* 2012; 26: 462-8.
- Barreto RSS, Albuquerque-Júnior RLC, Pereira-Filho RN, Quintans JSS, Barreto AS, DeSantana JM, Santana-Filho VJ, Santos MRV, Bonjardim LR, Araújo AAS, Quintans-Júnior LJ. Evaluation of wound healing activity of atranorin, a lichen secondary metabolite, on rodents. *Rev Bras Farmacogn* 2013; 23(2): 310-9.
- Białońska D, Dayan FE. Chemistry of the lichen *Hypogymnia physodes* transplanted to an industrial region. *J Chem Ecol* 2005; 31(12): 2975-91.
- Boldogh I, Roy G, Lee MS, Bacsı A, Hazra TK, Bhakat KK, Das GC, Mitra S. Reduced DNA double strand breaks in chlorambucil resistant cells are related to high DNAPKCs activity and low oxidative stress. *Toxicology* 2003; 193: 137-52.
- Bugni TS, Andjelic CD, Pole AR, Rai P, Ireland CM, Barrows LR. Biologically active components of a Papua New Guinea analgesic and anti-inflammatory lichen preparation. *Fitoterapia* 2009; 80(5): 270-3.
- Bugni TS, Harper MK, McCulloch MW, Reppart J, Ireland CM. Fractionated marine invertebrate extract libraries for drug discovery. *Molecules*. 2008; 13: 1372-83.
- Cekic S, Pavlovic D, Sarac M, Kamenov B, Dimic A, Pavlovic V. The effect of vitamin C on amiodarone-induced toxicity in rat thymocytes. *Cent Eur J Med* 2011; 6: 58-63.
- Chomcheon P, Wiyakrutta S, Sriubolmas N, Ngamrojanavanich N, Kengtong S, Mahidol C, Ruchirawat S, Kittakoop P. Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant

LITERATURA

- activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassicola* L36. *Phytochemistry* 2009; 70(3): 407-13.
- Correche´ ER, Carrasco M. Cytotoxic screening activity of secondary lichen metabolites. *Acta Farm Bonaerense* 2002; 21: 273-8.
- Countryman PI, Heddle JA. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 1976; 41: 321-32.
- Culberson CF. *Chemical and botanical guide to lichen products*. Chapel Hill: Univ N Carolina Press, 1969.
- Das A, Hazra TK, Boldogh I, Mitra S, Bhakat KK. Induction of the human oxidized base-specific DNA glycosylase Neil1 by reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2005; 280: 35272-80.
- Dayan FE, Romagni JG. Lichens as a potential source of pesticides. *Pesticide Outlook* 2011; 12 (6): 229-32.
- Elix JA. Hypogimniaceae. In: *Flora of Australia*, volume 54. Canberra: Australian government 1992.
- Elix JA., Jenie UA, Parker JL. A novel synthesis of the lichen depsidones divaronic acid and stenosporonic acid, and the biosynthetic implications. *Aust J Chem* 1987; 40(8): 1451-64.
- Elix JA, Stocker-Wörgötter E. Biochemistry and secondary metabolites In: Nash III TH, Editor. *Lichen Biology*, Second edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2008: 104-33.
- Emsen B, Turkez H, Togar B, Aslan A. Evaluation of antioxidant and cytotoxic effects of olivetoric and physodic acid in cultured human amnion fibroblasts. *Hum Exp Toxicol* 2016; Epub 2016 May 20.
- Emsen B, Aslan A, Togar B, Turkez H. *In vitro* antitumor activities of the lichen compounds olivetoric, physodic and psoromic acid in rat neuron and glioblastoma cells. *Pharm Biol* 2016; 54(9): 1748-62.
- Exline MC, Crouser ED, Mitochondrial mechanisms of sepsis induced organ failure. *Front Biosci* 2008; 13: 5030-41.
- Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mut Res* 1985; 147: 29-36.
- Fenech M, Denham J, Francis W, Morley A. Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes of cancer patients following fractionated partial-body radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 1990; 57(2): 373-83.

LITERATURA

- Fenech M, Morley AA. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human population. *Mutat Res* 1993; 285: 35-44.
- Fernandez E, Reyes A, Hidalgo ME, Quilhot W. Photoprotector capacity of lichen metabolites assessed through the inhibition of the 8-methoxypsoralen photo-binding to protein. *J Photochem Photobiol B* 1998; 42: 195-201.
- Feuerer T, Hawksworth DL. Biodiversity of lichens, including a world-wide analysis of checklist data based on Takhtajan's floristic regions. *Biodivers Conserv* 2007; 16: 85-98.
- Foti MC, Daquino C, Geraci C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *J Org Chem* 2004; 69: 2309-14.
- Gutteridge JM, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393(4): 561-4.
- Guo P, Zhao P, Liu J, Ma H, Bai J, Cao Y, Liu Y, He H, Qi C. Preparation of a novel organoselenium compound and its anticancer effects on cervical cancer cell line HeLa. *Biol Trace Elem Res* 2013; 151: 301-6.
- Halama P, van Haluwin C. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. *Bio Control* 2004; 49: 95-107.
- Halliwell BG, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Oxford: Clarendon Press, 2006: 245.
- Hamano K, Kinoshita-Okami M, Hemmi A, Sato A, Hisamoto M, Matsuda K, Yoda K, Haruyama H, Hosoya T, Tanzawa K. Folipastatin, a new depsidone compound from *Aspergillus unguis* as an inhibitor of phospholipase A2. Taxonomy, fermentation, isolation, structure determination and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* 1992; 45(8): 1195-201.
- Hansen ES, McCune B. The lichen genus *Hypogymnia* in Greenland. *Folia Cryptogam Est* 2010; 47: 13-20.
- Heddle JA. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat Res* 1973; 18: 187-90.
- Hegnauer R. Phytochemistry and plant taxonomy an essay on the chemotaxonomy of higher plants. *Phytochemistry* 1986; 25(7): 1519-35.
- Honegger R. Functional aspects of the lichen symbiosis. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1991; 42: 553-78.

LITERATURA

- Hori R, Kashiba M, Toma T, Yachie A, Goda N, Makino N, Soejima A, Nagasawa T, Nakabayashi K, Suematsu M. Gene transfection of H25A mutant heme oxygenase-1 protects cells against hydroperoxide-induced cytotoxicity. *J Biol Chem* 2002; 277: 10712-8.
- Huang E, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53(6): 1841-56.
- Huneck S. New results in the chemistry of lichens. *Symbiosis* 1991; 1: 225-48.
- Huneck S, Yoshimura I. Identification of Lichen Substances. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1996.
- Huneck S. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* 1999; 86(12): 559-70.
- Ingólfssdóttir K, Chung GA, Skulason VG, Gissurarson SR, Vilhelmsdóttir M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites *in vitro*. *Eur J Pharm Sci* 1998; 6: 141-4.
- Ingólfssdóttir K, Gissurarson SR, Muller-Jakic B, Breu W, Wagner H. Inhibitory effects of the lichen metabolite lobaric acid on arachidonate metabolism *in vitro*. *Phytomedicine* 1996; 2(3): 243-6.
- Ingólfssdóttir K. Usnic acid. *Phytochemistry* 2002; 61(7): 729-36.
- Jensen D, Ramel C, Gothe R. The production of micronuclei by frameshift mutagens at the time of nucleus expulsion in mouse erythroblasts. *Mut Res* 1974; 26: 553-5.
- Joksić G, Stanković M, Novak A. Antibacterial medicinal plants *Equiseti herba* and *Ononidis radix* modulate micronucleus formation in human lymphocytes *in vitro*. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2003; 22: 41-8.
- Joulain D, Tabacchi R. Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 1: oakmoss. *Flavour Fragr J* 2009; 24(2): 49-61.
- Kirk PM, Cannon PF, Mintner DW, Stalpers JA. Ainsworth & Bisby's dictionary of the Fungi. 10th edn. UK: CAB International, 2008.
- Kosanić M, Manojlović N, Janković S, Stanojković T, Ranković B. *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuraceae* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food Chem Toxicol* 2013; 53: 112-8.
- Kosanic M, Rankovic B, Vukojevic J. Antioxidant properties of some lichen species. *J Food Sci Technol* 2011; 48(5): 584-90.

LITERATURA

- Kumar KC, Muller K. Lichen metabolites. 1. Inhibitory action against leukotriene B4 biosynthesis by a non-redox mechanism. *J Nat Prod* 1999; 62: 817-20.
- Latkowska E, Bober B, Chrapusta E, Adamski M, Kaminski A, Bialczyk J. Secondary metabolites of the lichen *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. and their presence in spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst.) bark. *Phytochemistry* 2015; 118: 116-23.
- Legaz EM, de Armas R, Vicente C. Bioproduction of depsidones for pharmaceutical purposes. In: Rundfeld C, Editor. Drug development - a case study based insight into modern strategies, Rijeka, Croatia: InTech, 2011: 487-508.
- Liu MR, Li BY, Zhong JJ. Cytotoxic and proapoptotic effects of novel ganoderic acid derivatives on human cervical cancer cells in vitro. *Eur J Pharmacol* 2012; 681: 23-33.
- Lukač M, Onderka M. Application of DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyano-benzoquinone) in detection of lichen acids. *Acta Fac Pharm Univ Comen* 2006; 53: 160-6.
- Manojlović N, Ranković B, Kosanić M, Vasiljević P, Stanojković T. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine* 2012; 19: 1166-72.
- Marante FJT, Castellano AG, Rosas FE, Aguiar JQ, Barrera JB. Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: phytotoxicity and antioxidative activity. *J Chem Ecol* 2003; 29(9): 2049-71.
- McCune B, Wang LS. The lichen genus *Hypogymnia* in southwest China. *Mycosphere* 2014; 5(1): 27-76.
- McFarlin M. A morphological and chemical study of the lichen genus *Hypogymnia* in North America and north of Mexico. Honors Projects 1991; Paper 29.
- Micheletti CA, Beatriz A, Pires de Lima D, Honda KN, Pessoa C, Odorico de Moraes M, Lotufo VL, Magalhães IFH, Carvalho CPN. Chemical constituents of *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & Adler - isolation, structure modification and evaluation of antibiotic and cytotoxic activities. *Quim Nova* 2009; 32: 12-20.
- Millot M, Tomasi S, Articus K, Rouaud I, Bernard A, Boustie J. Metabolites from the lichen *Ochrolechia parella* growing under two different heliotropic conditions. *J Nat Prod* 2007; 70(2): 316-8.

LITERATURA

- Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Tošić S, Stanković M, Radojević I, Stefanović O, Comić L, Dačić D, Curčić M, Marković S. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *Int J Mol Sc* 2011; 12: 5428-48.
- Molnar K, Farkas E. Depsides and depsidones in populations of lichen *Hypogymnia physodes* and its genetic diversity. *Ann Bot Fennici* 2011; 48: 473-82.
- Molnar K, Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Z. Naturforsch* 2010; 65c: 157-73.
- Müller K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; 57: 9-16.
- Murati, M.: Flora lišajeva Slovenije, Hrvatske, Vojvodine, Bosne i Hercegovine, Srbije, Kosova i Makedonije I. Priština: Univerzitet u Prištini, 1992
- Nash TN. *Lichen Biology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, M100-S11. Wayne, PA, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standard, 2003.
- Neamati N, Hong H, Mazumder A, Wang S, Sunder S, Nicklaus MC, George WAM, Proksa B, Pommier Y. Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 integrase: discovery of novel inhibitors through 3D database searching. *J Med Chem* 1997; 40: 942-51.
- Osawa T, Kumon H, Reece CA, Shibamoto T. Inhibitory effect of lichen constituents on mutagenicity induced by heterocyclic amines. *Environ Mol Mutagen* 1991; 18: 35-40.
- Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap J Nutr* 1986; 44: 307-15.
- Pathak N, Khandelwal S. Modulation of cadmium induced alterations in murine thymocytes by piperine: oxidative stress, apoptosis, phenotyping and blastogenesis. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 486-97.
- Pavlovic V, Cekic S, Kocic G, Sokolovic D, Zivkovic V. Effect of monosodium glutamate on apoptosis and Bcl-2/Bax protein level in rat thymocyte culture. *Physiol Res* 2007; 56: 619-26.
- Pavlovic V, Cekic S, Sokolovic D, Djindjic B. Modulatory effect of monosodium glutamate on rat thymocyte proliferation and apoptosis. *Nat Prod Rep* 2006; 107: 185-91.

LITERATURA

- Pavlovic V, Djordjevic A, Cherneva E, Yancheva D, Smelcerovic A. Stimulatory effect on rat thymocytes proliferation and antimicrobial activity of two 6-(propan-2-yl)-4-methylmorpholine-2,5-diones. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 761-6.
- Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004; 7: 97-110.
- Proksa B, Adamcová J, Sturdíková M, Fуска J. Metabolites of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. and their inhibition potential of proteolytic enzymes. *Pharmazie* 1994; 49(4): 282-3.
- Radford AE, Caddell GM. *Fundamentals of plant systematics*. New York, NY: Harper & Row, c1986.
- Rankovic B, Misic M. The antimicrobial activity of the lichen substances of the lichens *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna*, *Parmelia caperata* and *Parmelia conspresca*. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2008; 22(4): 1013-6.
- Ranković B, Kosanić M, Manojlović N, Rancic A, Stanojkovic T. Chemical composition of *Hypogymnia physodes* lichen and biological activities of some its major metabolites. *Med Chem Res* 2014; 23(1): 408-16.
- Ranković B, Mišić M, Sukdolak S. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. *World J Microbiol Biotechnol* 2008; 24: 1239-42.
- Ranković B, Mišić M, Sukdolak S. Antimicrobial activity of the lichens *Caledonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *Br J Biom Sci* 2007; 64: 143-8.
- Re R, Pellegrini N, Proreggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationdecolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(9-10): 1231-7.
- Sala T, Sargent MV. Depsidone synthesis. Part 16. Benzophenone-grisa- 3',5'-diene-2',3-dione-depsidone interconversion: a new theory of depsidone biosynthesis. *J Chem Soc, Perkin Trans 1* 1981; 855-69.
- Sarker SA, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 2007; 42: 321-4.

LITERATURA

- Seo C, Sohn JH, Ahn JS, Yim JH, Lee, HK, Oh H. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory effects of depsidone and pseudodepsidone metabolites from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 2801-3.
- Singh G. *Plant Systematics: An Integrated Approach*. Enfield, NH: Science Publishers, Inc., 2004.
- Solhaug KA, Lind M, Nybakken L, Gauslaa Y. Possible functional roles of cortical depsides and medullary depsidones in the foliose lichen *Hypogymnia physodes*. *Flora* 2009; 204: 40-8.
- Stankov-Jovanovic V, Nikolic-Mandic S, Mandic Lj, Mitic V. A modification of the kinetic determination of pancuronium bromide based on its inhibitory effect on cholinesterase. *J Clin Lab Anal* 2007; 21: 124-31.
- Stark AA, Kobbe B, Matsuo D, Büchi G, Wogan GN, Demain AL. Mollicellins: mutagenic and antibacterial mycotoxins. *Appl Environ Microbiol* 1978; 36(3): 412-20.
- Stocker-Wörgötter E. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Nat Prod Rep* 2008; 25(1): 188-200.
- Stojanović G, Stojanović I, Šmelcerović A. Lichen depsidones as potential novel pharmacologically active compounds. *Mini Rev Org Chem* 2012; 9: 178-84.
- Stratil P, Klejdus B, Kuban V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-evaluation of spectrophotometric methods. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 607-16.
- Studzińska-Sroka E, Piotrowska H, Kucińska M, Murias M, Bylka W. Cytotoxic activity of physodic acid and acetone extract from *Hypogymnia physodes* against breast cancer cell lines. *Pharm Biol* 2016; 1-6.
- Talapatra SK, Rath O, Clayton E, Tomasi S, Kozielski F. Depsidones from lichens as natural product inhibitors of M-Phase Phosphoprotein 1, a human kinesin required for cytokinesis. *J Nat Prod* 2016; 79(6): 1576-85.
- Tay T, Türk AO, Yilmaz M, Türk H, Kivanç M. 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 C* 2004; 59(5-6): 384-8.
- Taylor TN, Hass H, Remy W, Kerp H. The oldest fossil lichen. *Nature* 1995; 378: 244.

LITERATURA

- Türk H, Yilmaz M, Tay T, Türk AO, Kivanç M. Antimicrobial activity of extracts of chemical races of the lichen *Pseudoevernia furfuracea* and their physodic acid, chloroatratorin, atratorin and olivetoric acid constituents. *Z Naturforsch C* 2006; 61: 499-507.
- Varol M, Tay T, Candan M, Türk A, Tansu Koparal A. Evaluation of the sunscreen lichen substances usnic acid and atranorin. *Bio Cell* 2015; 39(1): 25-31.
- Victor VM, Guayerbas N, De la Fuente, M. Changes in the antioxidant content of mononuclear leukocytes from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Mol Cell Biochem* 2002; 229: 107-111.
- Wang ZB, Liu YQ, Zhang Y, Li Y, An XX, Xu H, Guo Y, Jin W, Jiang ZJ, Cui YF. Reactive oxygen species, but not mitochondrial membrane potential, is associated with radiation-induced apoptosis of AHH-1 human lymphoblastoid cells. *Cell Biol Int* 2007; 31: 1353-8.
- Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem* 2007; 105: 940-9.
- Yilmaz M, Tay T, Kivanç M, Türk H, Türk AO. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Hypogymnia tubulosa* and its 3-hydroxyphysodic acid constituent. *Z Naturforsch C* 2005; 60(1-2): 35-8.

Biografija

1.1. Lični podaci

Igor Stojanović je rođen 30.12.1985. godine u Nišu. Prebivalište i mesto stalnog boravka su u Nišu.

1.2. Podaci o dosadašnjem obrazovanju

Osnovnu školu "Vožd Karađorđe" je završio školske 1999/2000. godine sa prosečnom ocenom 5,00. Za uspehe u osnovnoj školi nagrađen je diplomom "Vuk Karadžić". Prirodno-matematički smer gimnazije "Bora Stanković" u Nišu je završio školske 2003/2004. godine sa odličnim uspehom. Učestvovao je na republičkim takmičenjima iz hemije i iz multimedijalnih prezentacija Siemens Join Multimedia 2003.

Školske 2004/2005. godine upisao je Medicinski fakultet u Nišu, Odsek Farmacija. Diplomirao je 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,71. Školske 2014/15. godine upisao je Studijski program doktorskih akademskih studija iz oblasti farmaceutskih nauka, na Medicinskom fakultetu u Nišu. Položio je sve planom i programom predviđene ispite i ostvario 180 ESPB bodova.

Završio je 2nd international Summer School on The Mass Spectrometry Opens on the Environment and the Life, 2009 godine, pod rukovodstvom profesora JC Tabet-a (University Pierre and Marie Curie, Paris, France).

1.3. Profesionalna karijera

Školske 2007/08. godine je bio demonstrator na predmetu Organska hemija II, a školske 2011/12. i 2012/13. godine je bio angažovan u svojstvu saradnika-volontera za izvođenje praktične nastave na predmetima Farmaceutska hemija II i Farmaceutska hemija III.

Bio je istraživač na studentskom projektu "Razvoj hemijsko-ekološkog centra grada Niša" u okviru programa "Partnerstvo za obrazovanje i razvoj zajednice" (od 01.09.2009. do 01.09.2010.).

Od 2011. godine radi na Medicinskom fakultetu u Nišu u svojstvu saradnika na projektu osnovnih istraživanja "Dobijanje, fizičko-hemijska karakterizacija, analitika i biološka aktivnost farmakološki aktivnih supstanci", broj 172044. U zvanje istraživač-saradnik izabran je 27.08.2013. godine, a reizabran 21.09.2016.

2. Pregled naučnog i stručnog rada

Igor Stojanović je objavio jedan rad u vodećem međunarodnom časopisu, šest radova u časopisima međunarodnog značaja, jedan rad u časopisu nacionalnog značaja, 6 radova saopštenih na međunarodnim simpozijumima štampanih u izvodu, jedan rad usmeno izlagan na nacionalnom simpozijumu štampan u izvodu i jedan rad izlagan u obliku postera na nacionalnom simpozijumu štampan u izvodu. Zvezdicom su označeni radovi iz doktorske disertacije.

Objavljeni radovi:

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu, M21

1*. Pavlovic V, Stojanovic I, Jadranin M, Vajs V, Djordjevic I, Smelcerovic A, Stojanovic G, Effect of four lichen acids isolated from *Hypogymnia physodes* on viability of rat thymocytes, Food and Chemical Toxicology, 2013, 51, 160-164

Radovi u međunarodnom časopisu, M23

1*. Stojanović I, Stanković M, Jovanović O, Petrović G, Šmelcerović A, Stojanović G, Effect of *Hypogymnia physodes* extracts and their depsidones on micronucleus distribution in human lymphocytes, Natural Product Communications, 2013, 8, 109-112

2*. Stojanovic I, Najman S, Jovanovic O, Petrovic G, Najdanovic J, Vasiljevic P, Smelcerovic A, Effects of depsidones from *Hypogymnia physodes* on HeLa cell viability and growth, Folia Biologica, 2014, 60, 89-94

3*. Stojanović G, Stojanović I, Šmelcerović A, Lichen depsidones as potential novel pharmacologically active compounds, Mini-Reviews in Organic Chemistry, 2012, 9, 178-184

4. Stojanović I, Radulović N, Mitrović T, Stamenković S, Stojanović G, Volatile constituents of selected Parmeliaceae lichens, Journal of Serbian Chemical Society, 2011, 76, 987-994.

5. Stojanović G, Stojanović I, Stankov-Jovanović V, Mitić V, Kostić D, Reducing power and radical scavenging activity of four Parmeliaceae species, Central European Journal of Biology, 2010, 5, 808-813

6*. Stojanovic G, Stankovic M, Stojanovic I, Palic I, Milovanovic V, Rancic S, Clastogenic effect of atranorin, evernic acid, and usnic acid on human lymphocytes, Natural Product Communications, 2014, 9, 503-504

Rad u naučnom časopisu nacionalnog značaja, M52

1. Stojanović I, Radulović N, Cvetković V, Mitrović T, Stamenković S, Antimicrobial activity of methanol extracts of four Parmeliaceae lichen species, *Facta Universitatis:Series Physics, Chemistry and Technology*, 2013,11, 45-53

Radovi na međunarodnom naučnom skupu štampan u izvodu, M34

1*. Stojanović I, Đorđević A, Jovanović O, Petrović G, Šmelcerović A. Antimicrobial activity of *Hypogymnia physodes* depsidones and extracts. BOOK of Abstracts of the 32nd Balkan Medical Week, Niš, Serbia, 2012, P69.

2. Lazarević, J., Stojanović, I., Đorđević, A., Zlatković, B., Stojanović, S., Šmelcerović A, Stojanović G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Juglans regia* L. (Juglandaceae) flower volatiles. BOOK of Abstracts of the 32nd Balkan Medical Week, Niš, Serbia, 2012, P73.

3. Petrović G, Stojanović G, Radulović N, Stojanović I. Encapsulation of cinnamon oil in cyclodextrin, 41st International Symposium on Essential Oils, Wroclaw, Poland, Book of abstracts, 2010, PP-B1, 121.

4. Stojanović G, Stojanović I, Radulović N, Mitrović T, Stamenković S. Volatiles of four Parmeliaceae species growing on the same host tree, 41st International Symposium on Essential Oils, Wroclaw, Poland, Book of abstracts, 2010, PP-A22, 78.

5. Stojanovic G, Palic I, Ursic-Jankovic J, Stojanović I, Essential oil composition of *Micromeria kosaninni* Šilić, *Micromeria parviflora* (Vis.) Reincheb. and *Micromeria juliana* (L.) Benth. ex Reich.. 39th International Symposium on essential Oils, Quedlinburg, Germany, Book of abstracts, 2008, A 033, 116.

6. Zrnzević I, Jovanović O, Zlatanović I, Stojanović I, Petrović G, 1, Stojanović G. Constituents of *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl. Extracts. 6th International Congress of Aromatic and Medicinal Plants (CIPAM 2016), Coimbra, Portugal, Book of abstracts, 2016, P181, 273.

Rad na nacionalnom naučnom skupu sa međunarodnim učešćem štampan u izvodu, M64

1. Stojanović I, Radulović N, Jovanović O, Petrović G, Stojanović G. Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata odabranih vrsta lišajeva familije Parmeliaceae. 09. Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona, Vlasina, Apstrakti, 2010, 98. (usmeno izlaganje).

2. Zlatanović I, Zrnzević I, Jovanović O, Stojanović I, Petrović G, 1, Stojanović G. GC-MS profile of *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey and *Umbilicaria cylindrica* (L.) Duby extracts. 12.

Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona, Kopaonik, Apstrakti (Abstracts), 2016,
97.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Биолошка активност депсидона и атранорина изолованих из лишаја *Hypogymnia physodes*

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:
Игор Стојановић

(Име, средње слово и презиме)

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације: **Биолошка активност депсидона и атранорина
изолованих из лишаја *Hypogymnia physodes***

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:
Игор Стојановић

(Име, средње слово и презиме)

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Биолошка активност депсидона и атранорина изолованих из лишаја *Hypogymnia physodes*

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:
Игор Стојановић

(Име, средње слово и презиме)