

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Тања М. Лунић

Испитивање имуномодуlatorног
потенцијала екстраката маховине
Hypnum cupressiforme Hedw.

докторска дисертација

Београд, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Tanja M. Lunić

Investigation of the immunomodulatory potential
of moss extracts

Hypnum cupressiforme Hedw.

doctoral dissertation

Belgrade, 2022.

МЕНТОРИ:

др Биљана Божић Недељковић, редовни професор
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

др Бојан Божић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ И ОДБРАНУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

др Анета Сабовљевић, редовни професор
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

др Марко Сабовљевић, редовни професор
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

др Мирјана Рајилић-Стојановић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

др Тања Џопалић, ванредни професор
Универзитет у Нишу, Медицински факултет

др Сергеј Томић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду, Институт за примену нуклеарне енергије ИНЕП

Датум одбране: _____

Експериментални део докторске дисертације урађен је на Биолошком факултету Универзитета у Београду, у лабораторијама Института за физиологију и биохемију „Иван Баја“ и Института за ботанику и Ботаничке баште „Јевремовац“.

Захваљујем се свима који су допринели изради ове докторске дисертације:

Проф. др Биљани Божић Недељковић, мојој менторки, на указаном поверењу и пруженој прилици да постанем део њеног тима. Хвала на пренетом знању, корисним саветима и подршци коју ми је несебично пружила, као и на огромној помоћи у реализацији ове докторске дисертације.

Др Бојану Божићу, мом ментору, за неизмерну помоћ и подршку током сваког корака у изради ове докторске дисертације, на изузетној темељности у раду и значајним сугестијама током читања дисертације које су битно допринеле њеном квалитету.

Члановима комисије на корисним саветима и сугестијама који су значајно унапредили ову докторску дисертацију и подигли је на виши ниво.

Драгим колегицама Марији Ракић, др Мариани Оалђе Павловић, др Катарини Митић и др Јелени Репач на искреном пријатељству, доброј атмосфери и несебичној помоћи и подршци током израде ове дисертације.

Свим колегама са различитих факултета и института на саветима и искуству које су ми пренели.

И на крају, бескрајно хвала на разумевању, стрпљењу и огромној подршци мојој породици, партнеру и пријатељима, а посебно мојим родитељима којима посвећујем ову докторску дисертацију.

Испитивање имуномодулаторног потенцијала екстраката маховине

Hypnum cupressiforme Hedw.

САЖЕТАК

Циљ ове докторске дисертације био је одређивање хемијског састава различитих екстраката маховине *Hypnum cupressiforme* Hedw. и испивање њиховог имуномодулаторног потенцијала применом (1) *in vitro* и (2) *in silico* истраживања.

Екстракти маховине *H. cupressiforme* садрже различите групе фенолних једињења. Најприсутнија фенолна киселина у екстрактима била је *p*-хидроксibenзоева киселина, а кемпферол најприсутнији флавоноид. Екстракти су показали значајан антиоксидативни, антидијабетични и антинеуродегенеративни потенцијал, а поред цитокомпатибилности, показали су и значајан антитуморски, антинеуроинфламаторни и неуропротективни потенцијал. Антитуморска активност је показана према MDA-MB-231 ћелијама хуманог аденокарцинома дојке, где су екстракти смањили метаболичку активност и повећали продукцију реактивних врста кисеоника (РВК) и азот оксида (NO) од стране ових ћелија. Третман екстрактима маховине липополисахаридом (ЛПС) активираних BV2 ћелија довео је до значајног смањења продукције NO, РВК и проинфламаторних цитокина, што указује на њихов антинеуроинфламаторни потенцијал. Екстракти су значајно смањили неуроцитотоксични потенцијал солубилних медијатора ослобађених од стране ЛПС-ом активираних ћелија микроглије према SH-SY5Y неуронима, што је значајно за њихову неуропротективну активност. Молекулским докингом показано је да најјачи афинитет везивања према ацетилхолинестерази показује ериодиктиол, према тирозинази гљиве кверцетин-3-*O*-рутинозид, а према тирозинази човека кофеинска киселина.

Сумирано, испитивани екстракти маховине *H. cupressiforme* садрже разноврсна биолошки активна једињења која показују значајне активности, те постоји основ за њихову употребу као потенцијалне помоћне терапије у терапији болести повезаних са оксидативним стресом и инфламацијом.

Кључне речи: *Hypnum cupressiforme* Hedw.; екстракт маховине; хемијска карактеризација; антиоксидативна и анти-инфламаторна активност; имуномодулација; молекулски докинг.

Научна област: Биологија

Ужа научна област: Имунологија

Investigation of the immunomodulatory potential of moss extracts

Hypnum cupressiforme Hedw.

ABSTRACT

The aim of this doctoral dissertation was to determine the chemical composition of different extracts of the moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. and to test their immunomodulatory potential using (1) *in vitro* and (2) *in silico* studies.

Extracts of moss *H. cupressiforme* contain different groups of phenolic compounds. The most abundant phenolic acid in the extracts was *p*-hydroxybenzoic acid, while kaempferol was the most abundant flavonoid. The extracts exhibited significant antioxidant, antidiabetic and antineurodegenerative potential, and together with biocompatibility, they showed significant antitumor, antineuroinflammatory and neuroprotective potential. Antitumor activity was demonstrated against MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cells, where extracts reduced metabolic activity and increased the production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) by these cells. Treatment of lipopolysaccharide (LPS)-activated BV2 mouse microglia cells with moss extracts has led to a decrease in the production of NO, ROS, and pro-inflammatory cytokines, indicating their antineuroinflammatory potential. The extracts reduced the neurocytotoxic potential of soluble mediators released by LPS-activated microglia cells towards SH-SY5Y neurons, thus exhibiting neuroprotective activity. Molecular docking showed that eriodictyol has the strongest binding affinity to acetylcholinesterase, quercetin-3-*O*-rutinoside to mushroom tyrosinase, and caffeic acid has the highest affinity to human tyrosinase.

In summary, investigated extracts of moss *H. cupressiforme* contain various biologically active compounds that show significant activities, and there is a basis for their use as a potential adjuvant therapy in the treatment of diseases associated with oxidative stress and inflammation.

Keywords: *Hypnum cupressiforme* Hedw.; moss extract; chemical characterization; antioxidant and anti-inflammatory activity; immunomodulation; molecular docking.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Immunology

Садржај

1	УВОД	1
1.1	Имунски систем и имуномодулација	2
1.2	Бриофите	5
1.2.1	<i>Hypnum cupressiforme</i> Hedw.	6
1.2.2	Традиционална употреба бриофита	7
1.3	Хемијски састав бриофита	8
1.3.1	Секундарни метаболити бриофита	10
1.4	Биолошка активност бриофита	16
1.4.1	Антиоксидативна активност	17
1.4.2	Антидијабетична активност	20
1.4.3	Антитуморска активност	23
1.4.4	Анти-инфламаторна активност	28
1.4.5	Зарастање ране	34
1.5	Молекулски докинг	35
2	ЦИЉЕВИ	38
3	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	41
3.1	Хемикалије и реагенси	42
3.2	Раствори	43
3.3	Биљни материјал	45
3.4	Припрема екстракта	45
3.5	Принос екстракције	46
3.6	Хемијска карактеризација екстракта	46
3.6.1	Одређивање укупног садржаја фенола	47
3.6.2	Одређивање укупног садржаја фенолних киселина	47
3.6.3	Одређивање укупног садржаја флавоноида	48
3.6.4	Одређивање укупног садржаја флавонола	48
3.6.5	Одређивање укупног садржаја тритерпеноида	49
3.6.6	Одређивање укупног садржаја кумарина	49
3.6.7	Течна хроматографија-масена спектрометрија	50
3.7	Одређивање антиоксидативне активности екстракта	50
3.7.1	ДППХ тест	51
3.7.2	Укупни редукциони потенцијал	51
3.7.3	Инхибиција обезбојавања β -каротена	52

3.8	Одређивање антидијабетичне активности екстраката.....	53
3.8.1	Инхибиција α -амилазе	53
3.8.2	Инхибиција α -глюкозидазе	54
3.9	Одређивање биолошке активности екстраката	55
3.9.1	Култивација ћелија	57
3.9.2	Пасажирање ћелија	58
3.9.3	Бројање ћелија	58
3.9.4	Третман ћелија	59
3.9.5	Модел трансфера супернатаната BV2 ћелија микроглије на SH-SY5Y неуроне.....	60
3.9.6	Одређивање метаболичке активности ћелија МТТ тестом.....	60
3.9.7	Одређивање продукције реактивних врста кисеоника NBT тестом.....	61
3.9.8	Одређивање продукције нитрита Griess-овим тестом	62
3.9.9	Одређивање продукције цитокина TNF- α и IL-6 ELISA тестом	63
3.10	Одређивање антинеуродегенеративне активности екстраката.....	64
3.10.1	Инхибиција ацетилхолинестеразе	64
3.10.2	Инхибиција тирозиназе	65
3.11	Зарастање повреде у једнослоју ћелијске културе.....	66
3.12	Докинг секундарних метаболита идентификованих у екстрактима на ацетилхолинестеразу и тирозиназу гљиве и човека	68
3.12.1	Креирање тродимензионалног модела тирозиназе човека.....	68
3.12.2	Припрема протеина и лигананда	68
3.12.3	Докинг процедура	69
3.13	Обрада и приказ података	70
4	РЕЗУЛТАТИ.....	71
4.1	Екстракција маховине.....	72
4.1.1	Пролећни аспект маховине	73
4.1.2	Летњи и јесењи аспекти маховине	73
4.2	Хемијска карактеризација екстраката.....	74
4.2.1	Пролећни аспект маховине	74
4.2.2	Летњи и јесењи аспекти маховине	79
4.2.3	Утицај годишњег доба на укупни садржај различитих класа једињења	79
4.3	Антиоксидативна активност	81
4.4	Антидијабетична активност	85
4.5	Антитуморска активност.....	87
4.5.1	Цитокомпатибилност.....	88

4.5.2	Антитуморска активност екстраката према MDA-MB-231 ћелијама	89
4.5.3	Антитуморска активност екстраката према HCT-116 ћелијама	91
4.6	Антинеуроинфламаторна активност	92
4.6.1	Модел систем: активација BV2 ћелија ЛПС-ом.....	93
4.6.2	Модел систем: активација BV2 ћелија водоник-пероксидом.....	101
4.7	Антинеуродегенеративна активност	103
4.8	Молекулски докинг.....	108
4.8.1	Ре-докинг анализа	109
4.8.2	Докинг на ацетилхолинестеразу	109
4.8.3	Тродимензионални модел тирозиназе човека	113
4.8.4	Докинг на тирозиназу из гљиве и моделовану тирозиназу човека	116
4.9	Утицај екстраката на миграцију ћелија у <i>in vitro</i> моделу зарастања рана.....	122
5	ДИСКУСИЈА.....	125
6	ЗАКЉУЧЦИ	149
7	ЛИТЕРАТУРА.....	154

1 УВОД

1.1 Иmunски систем и имуномодулација

Иmunски систем представља скуп ћелија, ткива и молекула чија основна улога у организму јесте да спречи и/или да искорени инфекцију. На тај начин имунски систем пружа заштиту организма од великог броја патогена из спољашње средине (вируса, бактерија, гљива и паразита) као и различитих физичких и хемијских оштећења. Поред тога, имунски систем обезбеђује одбрану организма од сопствених измењених ћелија, а учествује и у одстрањивању мртвих ћелија и процесу репарације ткива [1]. Иmunски систем састављен је од урођеног (неспецифичног или природног) и стеченог (специфичног или адаптивног) имунитета, који се разликују један од другог, али међусобно сарађују. Урођена имуност представља рану линију одбране организма, док стечена имуност обезбеђује каснију и спорију, али специјализовану заштиту. Главне компоненте урођене имуности су епителне баријере, фагоцити, урођеноубилачке ћелије, дендритске ћелије, мастоцити, лимфоцити са ограниченом разноликошћу рецептора и систем комплемента. Са друге стране, постоје два типа адаптивне имуности, хуморална и целуларна имуност, које имају различите улоге. Хуморална имуност обезбеђује одбрану организма од екстрацелуларних патогена, помоћу антитела продукованих од стране ефекторских В лимфоцита (плазма ћелија), док целуларна имуност учествује у елиминацији интрацелуларних инфективних агенаса, деловањем ефекторских Т лимфоцита. Након елиминације инфективног агенса, имунски одговор се враћа у стање мировања – *хомеостазу* и обезбеђује се *меморија* за дати инфективни агенс [1].

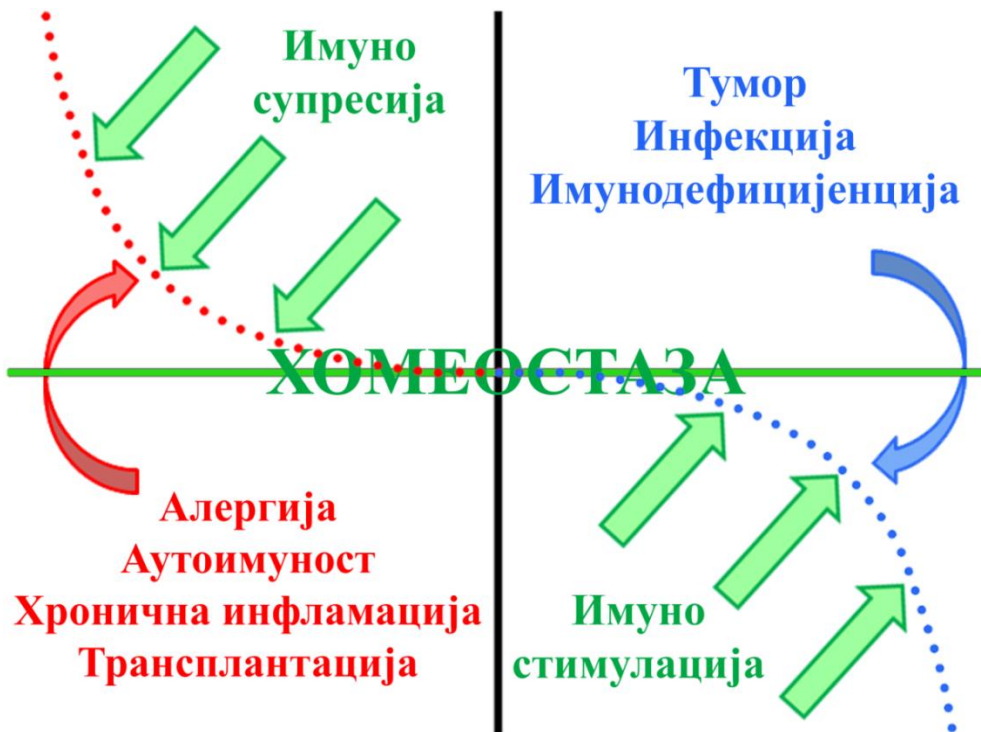
Дакле, имунски систем се развио са циљем одржавања хомеостазе у организму, штитећи га на тај начин од различитих патогена из спољашње средине, али и од инвазије сопствених измењених ћелија из унутрашње средине. Иmunски систем има посебно важну улогу у процесу репарације ткива и значајан је за генералну робустност организма, односно његову способност да одржи своје функције и перформансе упркос одступању од хомеостазе. Због оваквих захтева, имунски систем представља веома сложен и софистициран систем, са својствима као што су динамичност, вишекомпонентност и пластичност. У обављању својих функција (борба против патогена, елиминисање оштећених и измењених ћелија и поправка ткива), имунски систем континуирано модулира своје механизме – активира се и реагује када је то неопходно, али се,

захваљујући способности самоограничавања, супримира након извршене функције и враћа у стање мировања [1].

Међутим, постоје случајеви када имунски одговор није довољно ефикасан у борби против одређених патолошких стања, или је пак са друге стране изузетно изражен и перзистентан, што у оба случаја води до нарушавања хомеостазе у организму. Стога је способност модулације имунског одговора спољним агенсима од великог значаја у терапији широког спектра имунских патолошких стања. Оваква модулација имунског одговора означава се као *имуномодулација*, а у смислу имунотерапије, имуномодулација се означава као интервенција у којој се имунски одговор мења како би се вратио на жељени ниво (било да се стимулише или супримира) [2]. Супстанце које утичу на функције имунског система називају се *имуномодулатори*, а на основу њиховог утицаја на имунски систем, имуномодулатори се условно могу класификовати у две категорије: *имуностимуланси* и *имуносупресори* [3]. Ова класификација није идеална, пре свега због комплексности имунског система и сложених механизма међусобне регулације између његових компоненти, али је ипак погодна за генерални опис ефеката имуномодулатора у дефинисаном тренутку. Имуномодулатори представљају разнолику групу рекомбинантних, синтетских, полусинтетских и природних једињења. Интересовање за ова једињења је значајно порасло у последњих неколико деценија због могуће примене било за стимулацију или супресију имунског система, што се показало као ефикасна терапеутска стратегија за многе поремећаје.

Стимулација имунског одговора је неопходна у терапији различитих тумора, инфекција или имунодефицијенција (слика 1) [2, 4]. Имуностимуланси обично изазивају неспецифичну активацију имунског система, осим када су повезани са антигенима (попут адјуванаса у вакцинама) када изазивају специфичне механизме у индукцији адаптивне имуности. Они директно активирају различите ефекторске механизме имунског одговора, укључујући фагоцитозу, продукцију реактивних врста кисеоника и интрацелуларно убијање организама, презентацију антигена, цитотоксичну и антивирусну активност, продукцију и ослобађање цитокина и производњу антитела [5]. Имуностимуланси могу деловати и тако што инхибирају супресивне механизме имунског система и на тај начин активирају имунски систем (нпр. блокатори инхибиторних контролних тачака,

PD1/PD1L). Стога, имуностимуланси побољшавају механизме имунског система и помажу организму да се избори против различитих патогена/тумора. Са друге стране, имуносупресија је важна у лечењу аутоимунских болести, превенцији одбацивања органа након трансплантације, као и у терапији хроничних инфламаторних процеса (слика 1). Имуносупресивни лекови укључују глукокортикоиде, цитостатике, антитела и остале, а обично делују кроз неке од следећих механизма: имунодеплеција ефекторских ћелија и/или инхибиција стимулације и/или пролиферације Т и Б ћелија [6]. У идеалним условима, имуносупресивни агенси првенствено циљају хиперактивне компоненте имунског система, инхибирајући или умањујући интензитет имунског одговора у организму. Пошто је један од уобичајених нежељених ефеката многих клинички коришћених имуносупресивних лекова имунодефицијенција, потреба за проналажењем селективнијих и ефикаснијих алтернатива за индукцију имунске толеранце непрестано расте.



Слика 1. Имуностимулација и имуносупресија и њихов утицај на хомеостазу у различитим патолошким стањима.

Први покушаји да се развију имуномодулаторни агенси заснивали су се на примени различитих традиционалних биљних лекова, а и данас једињења природног (биљног) порекла играју важну улогу у развоју нових лекова [7, 8]. Природно добијени имуномодулатори су прихваћени као сигурније и одрживе алтернативе синтетичким, клинички коришћеним имуносупресивима и имуностимулансима, који обично поседују многобројне нежељене ефекте. Међу осталим биљкама, бриофите и њихови екстракти показују значајан имуномодулаторни потенцијал, због чега се у последње време све више истражују [9-15] и представљају перспективно поље за будућа истраживања.

1.2 Бриофите

Бриофите или маховине у ширем смислу представљају једну од еволутивно најстаријих група копнених биљака, која обједињује три раздела: рожњаче (*Anthocerotophyta*), јетрењаче (*Marchantiophyta*) и маховине у ужем смислу (*Bryophyta*). Таксономски се бриофите налазе између алги и папратњача, а процењује се да широм света постоји око 300 врста рожњача, око 6 000 врста јетрењача и око 14 000 врста маховина [9]. Величина им се креће од неколико милиметара па до нешто мање од метра. Бриофите су распрострањене широм света, а после цветница чине најбројнију групу копнених биљака. Заступљене су у готово свим екосистемима (нема их једино у морима), а преживљавају и у екстремним условима, па се могу наћи у пустињама, као и у хладним пределима као што су Арктик и Антарктик [16].

Бриофите се разликују од других виших биљака по својим карактеристикама. То су прве копнене биљке које су могле да живе ван водених станишта, иако им је вода и даље потребна за њихов потпуни развој и размножавање. У животном циклусу бриофита доминантна фаза је хаплоидни гаметофит. Комплетан животни циклус бриофита зависи од присуства воде, мада постоји и значајан број врста које су отпорне на сушу и могу да преживе високе температуре. С обзиром на то да су се прве врсте бриофита (конкретно преци талусних јетрењача) појавиле пре око 472 милиона година, верује се управо су ове биљке преци свих данашњих копнених биљака [9].

Маховине представљају најбројнији раздео бриофита, са око 14 000 рецентних врста, при чему је овај број у сталном порасту. Заступљене су у готово свим деловима света, у широком спектру станишта и климатских зона. На територији Србије, на основу најновије листе маховина, постоји 638 таксона [17]. Могу се наћи на различитим врстама земљишта, камењу, стенама, дрвећу, трулим деблима и крововима. У готово свим екосистемима у којима се налазе, маховине су од великог значаја и доприносе њиховом правилном функционисању. Њихова улога се, између осталог, огледа у повећању биомасе, производњи различитих органских супстанци, као и задржавању и филтрирању седимента и воде. Поред тога, маховине представљају погодно станиште за многе алге, гљиве, бескичмењаке и водоземце. Познате су и као хиперакумулатори тешких метала и органских загађивача, па се користе у биомониторингу ових полутаната и ремедијацији животне средине. Маховине су показале значајан потенцијал у терапији различитих патолошких стања, па се од давнина користе у традиционалној медицини, а посебно у Кини, Европи, Северној Америци и Индији, где су први пут забележене неке од њихових биолошких активности [12, 18-20].

1.2.1 *Hypnum cupressiforme* Hedw.

Hypnum cupressiforme Hedw. је уобичајена и распрострањена маховина која припада роду *Hypnum*. Може се наћи на свим континентима (осим Антарктика) у широком спектру станишта и климатских зона. Расте у полусенци, у умерено влажним местима, како у равничарским тако и у планинским подручјима. Добро подноси сунчеву светлост и делимичну сушу, а обично расте на кори дрвета, зидовима, земљишту, стенама и разним другим површинама. Преферира благо киселу подлогу и прилично је толерантна на загађење. Раније се ова маховина користила за подглавље и подлогу за спавање, па је управо због повезаности са сном цео род добио име *Hypnum* (од грчке речи *Hypos* (гр. ὕπνος), што значи спавати). Род чини од око 200 врста распрострањених широм света и 18 врста које се могу наћи у Европи. *H. cupressiforme*, поред типског, обухвата шест интраспецијских таксона у Европи [21].

H. cupressiforme је маховина средње величине, дуга 2-10 cm. Плеурокарпна је и има простране, пузеће каулоиде (структуре аналогне стаблима васкуларних биљака) који формирају густе простирке. Каулоиди су разгранати и прекривени филоидима

(структурама налик листовима) који се преклапају, па ова врста подсећа на дрво чемпреса. Листови на стабљикама су дуги и танки, српасте, сужавају се према врху, а изданци стабљике изгледају као плетенице, леже или су усправни (слика 2, лево). Маховина производи кратке, цилиндричне и благо закривљене капсуле дужине 1,7-2,4 mm које садрже споре [22] (слика 2, десно). Ова маховина је дводома, што значи да постоје одвојене мушке и женске биљке. *H. cupressiforme* је веома варијабилна врста и у оквиру ове сложене врсте описани су бројни таксони [21]. Маховина *H. cupressiforme* се од давнина користила за лечење различитих инфламаторних стања (упала грла, ждрела, упале плућа), алергија и повреда [5].



Слика 2. Изглед маховине *Hypnum cupressiforme*.

(преузето са https://wnmu.edu/academic/nspages/gilflora/h_cupressiforme.jpg;
https://en.wikipedia.org/wiki/Hypnum_cupressiforme#/media/File:Moos_Baumstamm_11z.jpg)

1.2.2 Традиционална употреба бриофита

Представници бриофита су се користили за ублажавање и лечење различитих тегоба у традиционалној медицини у готово свим цивилизацијама, а посебно у Кини, Европи, Северној Америци и Индији. Њихово антибактеријско и антигљивично дејство је било добро познато, те су се користиле за лечење различитих патолошких стања, посебно оних изазваних бактеријским инфекцијама. Користиле су се и за лечење кардио-васкуларних и неуролошких болести, бронхитиса, кожних инфекција, третман рана и опекотина као и различитих стања повезаних са инфламацијом [8, 12, 19].

Маховина *Polytrichum commune* се у Кини користила за смањење упале и грознице и као антипиретик, диуретик и хемостатик. У Северној Америци људи су користили мале

маховине *Barbula unguiculata* и *Bryum capillare*, као и веће маховине попут *Octoblepharum albidum* за спољашњу употребу код грознице и болова у телу. У Индији и Северној Америци, маховина *Philonotis fontana* се користила за лечење аденофарингитиса, упале ждрела и крајника. Поред ове врсте, у лечењу аденофарингитиса користила се и *Haplocladium capillatum*. За лечење ринитиса коришћене су маховине *Bryum argenteum* и *Weissia controversa*, маховина *Homalothecium sericeum* је коришћена за лечење кашља, а маховина *Haplocladium microphyllum* за лечење бронхитиса, тонзилитиса и упале плућа [8].

Медицинска употреба биљака у прошлости често се заснивала на њиховом изгледу и сличности са обликом и грађом неког органа у људи или животиња. На пример, јетрењача *Marchantia polymorpha* се користила за лечење различитих болести јетре, јер изглед ове биљке веома подсећа на попречни пресек јетре [8]. У Кини се и даље користи за лечење жутице, хепатитиса и као лек за смањење упала и спољашњих повреда, а у Европи и Јужној Америци се такође користи за различите проблеме са јетром. Међутим, *M. polymorpha* није једина врста из рода *Marchantia* која се користила за лечење различитих тегоба повезаних са јетром. У Индији су се за лечење хепатитиса користиле и *Marchantia convoluta* и *Marchantia palacea* [8]. Јетрењача *Plagiochasma appendiculatum* коришћена је у Индији за лечење различитих кожних болести. Од биљке се правила паста са водом која се наносила споља два пута дневно у трајању од недељу дана. Користила се за лечење опекотина, чирева, пликова по телу као и за оштећења настала од сунца. Маховина *Sphagnum teres* се примењивала код различитих очних болести, а *Rhodobryum giganteum* и *Rhodobryum roseum* за кардиоваскуларне и неуролошке болести [12].

1.3 Хемијски састав бриофита

Иако је познато више од 20 000 врста бриофита, само мањи број врста је хемијски окарактерисан [23]. Испитивање хемијског састава бриофита било је ограничено из неколико разлога. Бриофите су ситне, па их је тешко сакупити у великим количинама као чисте узорке. У већини случајева имају тенденцију да приликом раста формирају колоније што донекле олакшава њихово сакупљање, међутим ове колоније често укључују мале количине других врста бриофита или васкуларних биљака, као и различите организме

попут бактерија, гљива, инсеката и других. Једно од ограничења у истраживању бриофита је и њихова идентификација, која чак и под микроскопом може бити изузетно компликована. Сви ови фактори чине сакупљање и идентификацију бриофита тежом у односу на остале више биљке. Међутим, упркос ограничењима, у последњих неколико година, са развојем аналитичких метода (нуклеарна магнетна резонанца, течна хроматографија, масена спектрометрија) хемијски састав одређеног броја врста је окарактерисан, а интересовање за бриофите све више расте. Ипак, већина ових врста је и даље неиспитана, а на основу неких процена, свега око 3,2% познатих маховина и око 8,8% познатих јетрењача је до сада хемијски анализирано [24].

Биљке свакодневно производе велики број различитих малих органских молекула који су неопходни за њихово нормално функционисање, а који се означавају као *примарни* и *секундарни метаболити* [25]. Иако је тешко успоставити прецизне границе при њиховој класификацији, у примарне метаболите углавном спадају једињења директно укључена у раст и метаболизам биљака, док се секундарним метаболитима сматрају једињења које биљка производи у одговору на различите стимулусе из спољашње средине, односно када су јој потребни. Поред чињенице да су и сами биолошки активни, секундарни метаболити могу представљати полазну основу за синтезу нових активних једињења. Већина истраживања фокусирана је на испитивање секундарних метаболита биљака управо због разноврсних биолошких активности које показују [25].

Приликом одређивања хемијског састава било које биљне врсте веома је важно које се методе екстракције и растварачи користе, јер се њиховим варирањем могу изоловати различита једињења. Стога је оптимизација екстракције важан део студија у којима се испитује хемијски састав. Како су секундарни метаболити главна мета интересовања када је у питању већина биљака, растварачи који се користе за екстракцију треба да буду погодни за екстракцију ових једињења. Због веома различитих структура секундарних метаболита, користе се и растварачи различитих поларности: вода, метанол, етанол, етил-ацетат, хлороформ [26]. Осим тога, хемијски састав бриофита зависи од много фактора као што су врста, географски локалитет, еколошки услови средине, сезонска динамика, што све треба узети у обзир приликом истраживања и упоређивања резултата са истом или сличним врстама [23, 27, 28].

1.3.1 Секундарни метаболити бриофита

Као прве копнене биљке бриофите су биле изложене неповољним условима животне средине, као што су напади патогена, ултраљубичасто зрачење и високе температуре. С обзиром на то да немају механичку заштиту попут виших биљака, бриофите су развиле различите хемијске и биолошке механизме као део њихове стратегије преживљавања, укључујући продукцију различитих секундарних метаболита. Секундарни метаболити се синтетишу кроз бројне путеве у биљкама са главним циљем да их заштите од биотичких или абиотичких стресова. Већина ових фактора стреса има јасан сезонски образац, што значи да укупан садржај као и релативне пропорције секундарних метаболита у биљкама варирају у зависности од промена у спољашњој средини, као што су годишња доба или географска позиционираност [27]. Промене у саставу секундарних метаболита последично утичу и на терапијску ефикасност одређене биљке. За многе лековите биљке утврђени су оптимални услови бербе (годишње доба, време у току дана, део биљке, и други), али када је реч о бриофитама, у литератури постоји свега неколико студија о хемијским и биохемијским променама у бриофитама као одговор на промене годишњег доба [27, 29, 30].

На пример, студија о саставу липида у маховинама рода *Sphagnum* открила је јасан утицај годишњег доба на укупни садржај липида у овим врстама [30]. Друга студија је истраживала хемијски састав и концентрацију одређених метаболита у четири врсте маховина током различитих годишњих доба и пронашла сезонске варијације унутар главних група секундарних метаболита маховина [27]. Поред тога, студија која је испитала неколико врста јетрењача показала је сезонске варијације у укупном садржају фенола и флавоноида, као и ензима укључених у антиоксидативну заштиту ових врста [29]. С обзиром на то да не постоји опште правило о времену бербе биљке за бољи принос и однос специфичних секундарних метаболита [31], студије које се односе на сезонске варијације секундарних метаболита бриофита и последично на њихову биолошку активност су веома корисне за проналажење оптималних услова за бербу врсте од интереса.

Секундарни метаболити који су до сада идентификовани код бриофита су различити гликозиди, липиди, различити деривати масних киселина, бибензили, феноли и

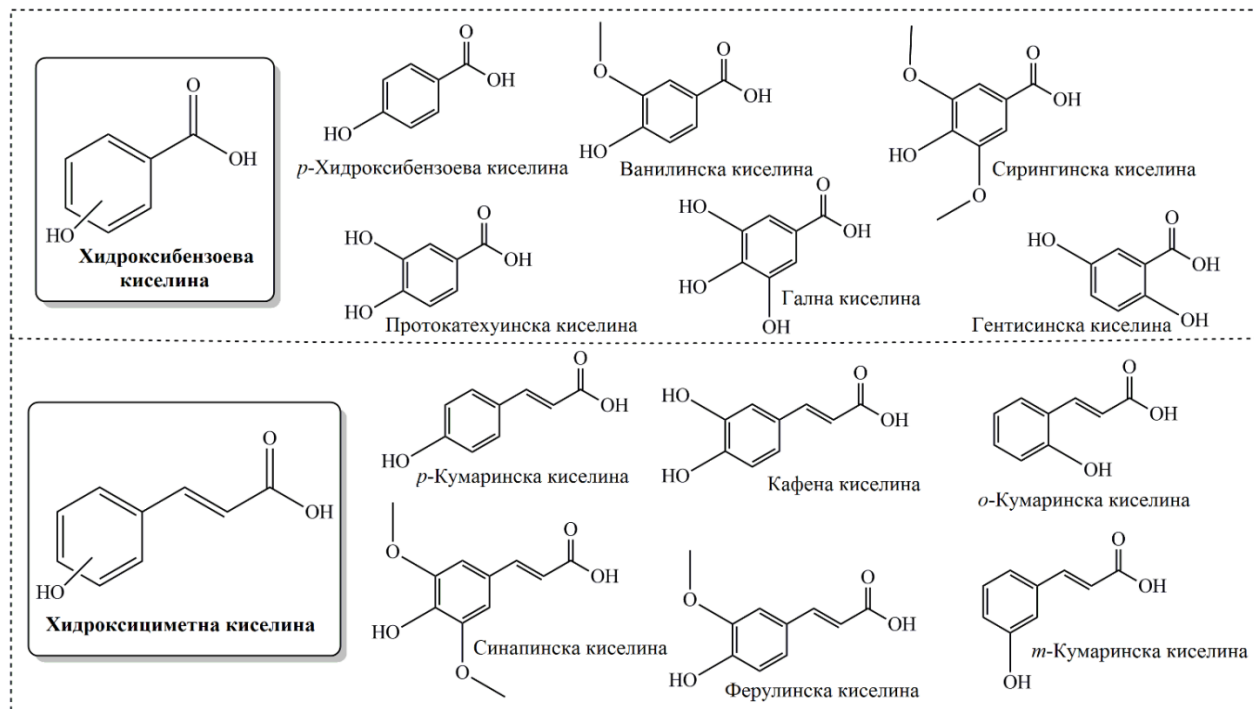
терпеноиди [12, 23]. Неки од највише истражених секундарних метаболита бриофита, који су уједно и носиоци њихове биолошке активности, су фенолна једињења и тритерпеноиди.

1.3.1.1 Фенолна једињења

Велику групу секундарних метаболита биљака чине *фенолна једињења*. Веома су распрострањена у биљном свету где показују огромну структурну разноликост и присутне су у различитим облицима од једноставних фенолних киселина до различитих полимерних структура. Ова једињења садрже један или више ароматичних прстенова повезаних са једном или више хидроксилних група (полифеноли). Подлежу различитим хемијским модификацијама (гликозилација, ацилација, метилација, итд.) којима се мењају њихова физичко-хемијска својства, а тиме и биолошка активност коју испољавају. У биљном свету обично се јављају повезани са моно- и полисахаридима или као естри. Из биљака је изолован велики број различитих фенолних једињења, међу којима су и једињења која показују значајна антиоксидативна, антидијабетична, антитуморска, анти-инфламаторна и друга биолошка својства [32, 33]. Ова група једињења нашла је примену у областима попут медицине и фармације, као и у многим гранама индустрије, као што су козметичка и прехранбена. Фенолна једињења могу се класификовати на основу неколико критеријума: у зависности од броја ароматичних прстенова, хидроксилних група, броја угљеникових атома, растворљивости или заступљености у природи. На основу броја ароматичних прстенова, фенолна једињења се деле на: једињења са једним прстеном (нпр. фенолне киселине и фенолни алдехиди), са два прстена (нпр. флавоноиди, изофлавоноиди и кумарини) и са три или више прстенова (нпр. лигнини и бифлавоноиди) [34].

Фенолне киселине спадају у групу фенолних једињења са једним ароматичним прстеном. У биљкама учествују у различитим процесима као што су усвајање нутријената, синтеза протеина, одбрана од патогена, и други. Могу бити слободне или повезане, обично естарским везама, са другим једињењима (глукоза, органске киселине, флавоноиди). На основу свог угљеничног скелета деле се на деривате хидроксибензоеве и деривате хидроксициметне киселине [32]. Неки од најчешћих деривата хидроксициметне киселине у биљкама су: *p*-кумаринска, синапинска и кофеинска киселина. Са друге стране, најраспрострањенији деривати хидроксибензоеве киселине у биљном свету су: *p*-хидроксибензоева, протокатехуинска, сиригинска, гална и ванилинска киселина (слика

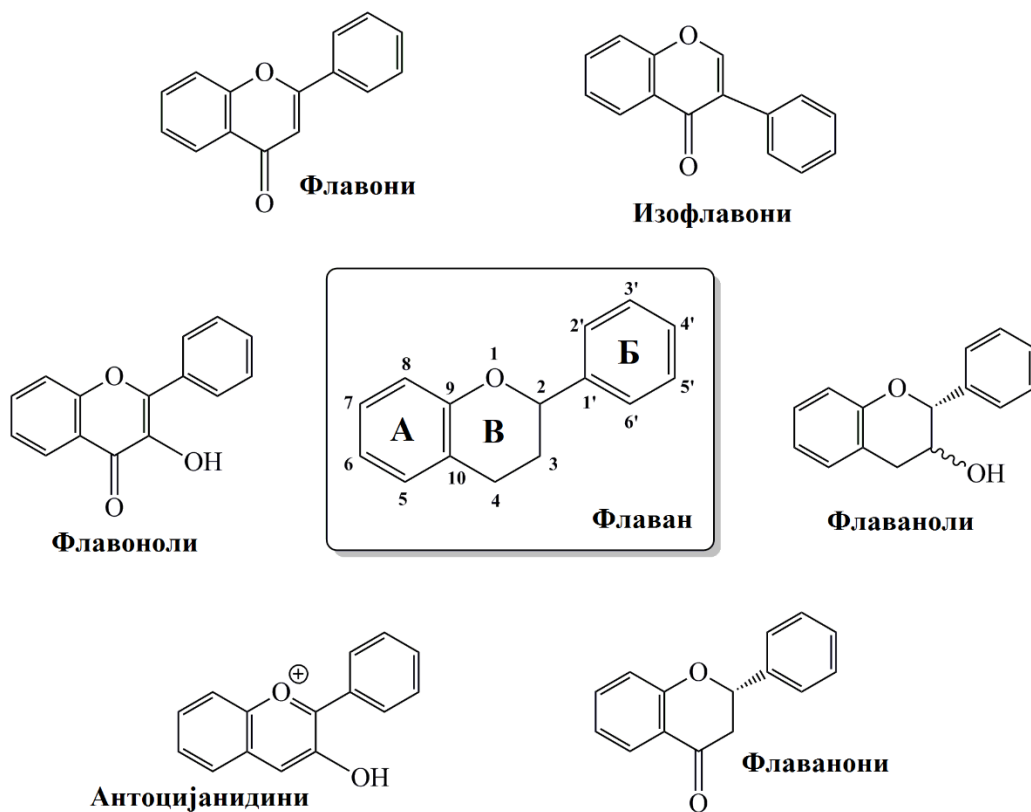
3). Код различитих маховина детектоване су, између осталих, следеће фенолне киселине: кофеинска, гална, ванилинска, хлорогена, *p*-кумаринска, салицилна, *p*-хидроксибензоева и протокатехуинска киселина [11, 13].



Слика 3. Одабрани представници фенолних киселина у биљкама.

Флавоноиди представљају најраспрострањенију групу фенолних једињења у биљкама, где имају различите улоге: привлаче инсекте који учествују у опрашивању, штите биљке од микроорганизама и штетног ултраљубичастог зрачења, а учествују и у фотосинтези. Основно језгро флавоноида назива се флаван [35]. Чини га 15 угљеникових атома међусобно распоређених тако да чине структуру $C_6-C_3-C_6$; односно два ароматична прстена (А и Б) повезана (са три угљеникова атома) тако да граде хетероциклични прстен В (слика 4). Основно језгро флавоноида може имати изузетно велики број супституената, од чије природе зависе општа физичко-хемијска и биолошка својства једињења. На пример, супституенти као што су шећери и хидроксилне групе повећавају хидрофилност флавоноида, док метил групе повећају њихову липофилност. У биљкама се углавном јављају у облику гликозида. Класе флавоноида међусобно се разликују према оксидационом статусу хетероцикличног прстена В као и према позицији везивања Б

прстена [36]. Најзначајније и најзаступљеније класе флавоноида су флавоноли, флаволи, флаваноли, флаванони, антоцијанидини и изофлаволи (слика 4), док су мање заступљене класе: дихидрофлавоноли, флаван-3,4-диоли, халкони, дихидрохалкони и аурони.

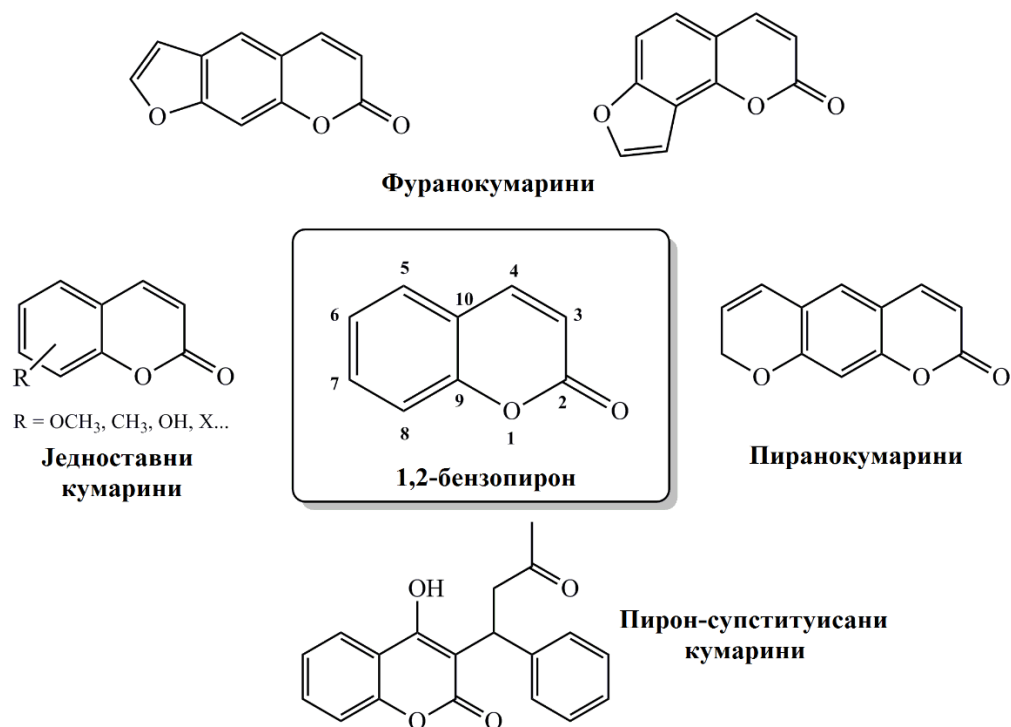


Слика 4. Најзначајније класе флавоноида у биљкама.

Најзаступљенији флавоноиди у маховинама су бифлавоноиди $-(C_6-C_3-C_6)_2$. У маховини *H. cupressiforme* детектован је флавоноид кемпферол, као и пет нових бифлавоноида, који нису били претходно откривени у другим врстама [37]. Сви ови новодетектовани флавоноиди поседују основни молекул аромадендрин са флаволилом или фенил остатком на C_3' атому, а називе су добили управо по маховини *H. cupressiforme* [38]. Поред ових, у екстрактима маховина детектовани су и следећи флавоноиди: кверцетин, ериодиктиол, апигенин, нарингенин, ацацетин и остали [13].

Кумарини су фенолна хетероциклична једињења која припадају породици бензопирона, односно садрже бензенов прстен везан за α -пирон прстен. У биљкама се обично налазе у слободном облику или као гликозиди, где имају улогу у одбрани од

различитих патогена, абиотичког стреса, регулацији оксидативног стреса, као и у регулацији хормона. До сада је идентификовано око 1 300 врста кумарина [39]. На основу хемијске структуре деле се на четири подгрупе: једноставни кумарини, фуранокумарини, пиранокумарини и пирон-супституисани кумарини, где су основној структури кумарина придружене различите групе (слика 5) [40]. Ова једињења испољавају различите биолошке активности међу којима су анти-инфламаторна, антитромботична и вазодилататорна. У маховинама *Atrichum undulatum* и *Polytrichum formosum* детектовани су различити деривати кумарина, од којих су неки и први пут откривени управо у овим врстама [41], а у маховини *Takakia lepidozoides* такође су детектовани кумарини и дихидрокумарини [42].



Слика 5. Најзначајније класе кумарина у биљкама.

1.3.1.2 Терпени и терпеноиди

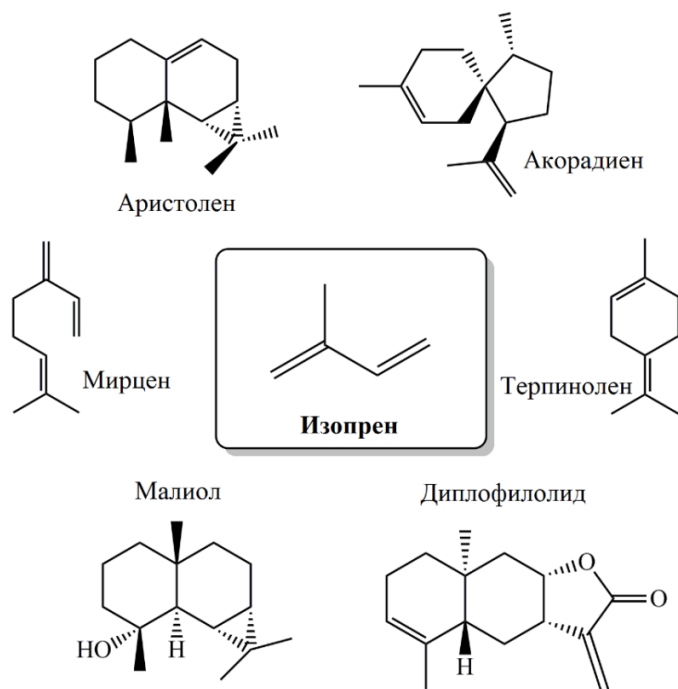
Једињења која као основну структуру садрже изопрен, односно 2-метилбута-1,3-диен (C_5H_8) су *терпени* [43]. Они спадају међу најбројније и структурно најразноврсније секундарне метаболите биљака. У биљкама су често присутни као гликозиди. Терпеноиди су кисеонични деривати терпена, а називају се још и изопреноиди. У зависности од броја

изопренских јединица, терпени и терпеноиди се могу поделити у неколико група, чији су називи приказани у табели 1. Показано је да различити терпени и терпеноиди испољавају значајну антиоксидативну, анти-инфламаторну, антидијабетичну, имуномодулаторну, антитуморску, неуропротективну, антивирусну и антимикробну активност [43, 44]. Имају карактеристичан мирис и највише их има у етарским уљима биљака, али су детектовани и у многим биљним екстрактима [43].

Табела 1. Класификација терпена и терпеноида.

Формула	Назив терпена	Назив терпеноида	Број изопрена	
C_5H_8	хемитерпен	хемитерпеноид	1	хеми=пола
$C_{10}H_{16}$	монотерпен	монотерпеноид	2	моно-
$C_{15}H_{24}$	сесквитерпен	сесквитерпеноид	3	сескви=1,5
$C_{20}H_{32}$	дитерпен	дитерпеноид	4	ди-
$C_{25}H_{40}$	сестерпен	сестерпеноид	5	сестер=2,5
$C_{30}H_{48}$	тритерпен	тритерпеноид	6	три-
$C_{40}H_{64}$	тетратерпен	тетратерпеноид	8	тетра-
$(C_5H_8)_n$	политерпен		n	поли-

Разноврсност терпеноида у бриофитама, а посебно у јетрењачама, је изузетно велика. Више од 1 600 различитих терпеноида је детектовано у овим врстама, при чему су неки од њих јединствени за бриофите (слика 6) [44]. Терпеноиди које производе бриофите имају важне функције у различитим биолошким и еколошким процесима, а посебно као одбрана ових биљака од различитих хербивора, патогена, исушивања и ултраљубичастог зрачења. Када су у питању маховине, иако су количине различитих терпена (моно-, сескви- и дитерпена) детектоване у маховинама генерално мање него код јетрењача, њихова разноврсност је веома велика [44].



Слика 6. Одабрани представници терпена у биљкама и бриофитама.

1.4 Биолошка активност бриофита

Многа једињења која су изолована из бриофита показала су изузетне биолошке активности. Стога су бриофите постале предмет истраживања студија у којима се испитује њихов *имуномодулаторни потенцијал* и могућа употреба за *развој нових лекова* [3, 5-7]. Неке од доказаних активности хемијских конституената бриофита, а које су у оквиру ове докторске дисертације испитиване за екстракте маховине *H. cypressiforme* су антиоксидативна, антитуморска, антидијабетична, анти-инфламаторна, антинеуродегенеративна, неуропротективна, као и активност у зарастању ране (слика 7).



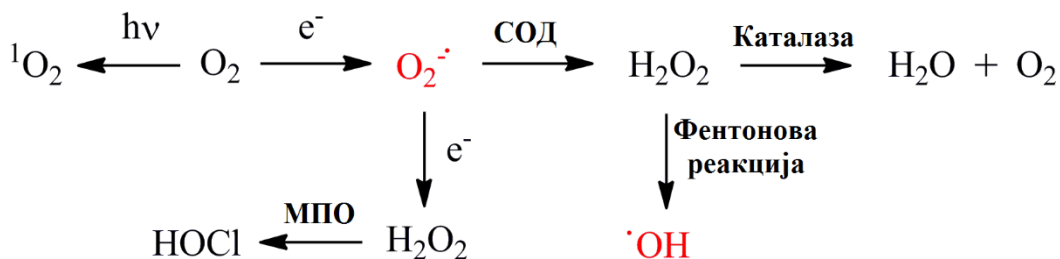
Слика 7. Одабрани секундарни метаболити детектовани у екстрактима бриофита и њихове потенцијалне биолошке активности [9, 18, 24].

1.4.1 Антиоксидативна активност

Молекулски кисеоник (O_2) представља основу правилног функционисања живота на Земљи. Он настаје као производ фотосинтетске активности различитих биљних система, а неопходан је, пре свега, као крајњи прималац електрона у респираторном ланцу у митохондријама. Велики проценат кисеоника у митохондријама пролази кроз потпуну редукцију до два молекула воде. Међутим, непотпуном редукцијом кисеоника долази до настанка врста (молекули, атоми или јони) са једним или више неспарених електрона у валентној орбитали, и овакве производе матаболизма називамо *реактивне врсте кисеоника* (РВК) [45]. У ниским концентрацијама, РВК представљају важне сигналне молекуле који учествују у процесима ћелијске сигнализације, регулацији раста, ћелијског циклуса и програмиране ћелијске смрти. РВК такође настају у ћелијама имунског система,

где као директни микробицидни молекули имају важну улогу у елиминацији патогена [46].

Примери (пато)физиолошки значајних РВК у ћелијама и ткивима човека су супероксид-анјон радикал ($O_2^{\cdot-}$), хидроксил радикал (OH^{\cdot}) и нерадикалске врсте као што је водоник-пероксид (H_2O_2) [47]. Супероксид-анјон радикал у највећој мери настаје непотпуном, једно-електронском редукцијом молекулског кисеоника у митохондријама, али и у различитим (не)ензимским реакцијама, као и под утицајем зрачења и хемијских агенаса. На физиолошком рН $O_2^{\cdot-}$ подлеже реакцији дисмутације, при чему настаје H_2O_2 . Водоник-пероксид може да настане и дво-електронском редукцијом кисеоника, уз каталитичко деловање различитих ензима, а у поређењу са $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 је стабилнији и мање реактиван молекул, који учествује у регулацији различитих сигналних путева, цитокина и фактора раста. Међутим, акумулација H_2O_2 у ћелијама може да буде веома опасна уколико дође до Фентонове реакције. У току ове реакције из водоник-пероксида, у присуству трагова јона гвожђа и бакра, настаје OH^{\cdot} , који представља једну од најреактивнијих РВК (слика 8) [45, 48].



Слика 8. Механизам настајања и реакције одабраних РВК.

СОД – супероксид дисмутаза; МПО – мијелопероксидаза; HOCl – хипохлоритна киселина.

Због своје реактивности, односно тежње да спаре неспарене електроне, РВК могу лако да иницирају пероксидацију мембранских липида, оксидацију протеина, или да изазову мутације и оштећење генетског материјала. Дакле, иако су корисни и неопходни у ниским концентрацијама, настајање и деловање РВК мора да буде под контролом, што је задатак комплексног система антиоксидативне одбране организма. Ћелије сисара су развиле ефикасне заштитне механизме који имају улогу да спрече, ограниче или поправе оштећења настала деловањем РВК. Ови механизми укључују:

- (а) компоненте примарне антиоксидативне заштите (ензимске и неензимске природе) које директно реагују и неутралишу РВК;
- (б) компоненте помоћне антиоксидативне заштите, које служе за синтезу и рециклирање супстрата неопходних за функционисање антиоксидативних ензима;
- (в) протеине који чврсто везују и инактивирају каталитички активне редокс јоне, што смањује стварање хидроксилних радикала.

Оксидативни стрес, односно неравнотежа између производње и уклањања РВК, у основи је многих хроничних патофизиолошких поремећаја у организму човека као што су старење, дијабетес, кардиоваскуларне и неуродегенеративне болести и различити тумори [49]. Оксидативни стрес се јавља углавном као последица:

- (а) смањене концентрације антиоксиданата (на пример, због мутације ензима који учествују у антиоксидативној заштити, или због смањеног уноса егзогенних антиоксиданата);
- (б) повећане продукције РВК (чест случај код многих обољења)

У случајевима када ендогена антиоксидативна одбрана није довољна како би се у потпуности спречила оштећења настала деловањем РВК, од великог значаја су егзогени антиоксиданти који се уносе у организам кроз исхрану или у облику суплемената. То су једињења природног или синтетског порекла, која имају способност модулације оксидативног стреса. Антиоксиданти синтетског порекла, као што су бутиловани хидроксианизол (БХА) и бутиловани хидрокситолуен (БХТ) често се користе у прехранбеној индустрији због своје термичке стабилности и добрих антиоксидативних способности. Међутим, употреба синтетских антиоксиданата се у последње време све више избегава, јер велики број ових једињења показује нежељене ефекте попут изазивања алергија, а неки од њих су повезани и са настанком канцера [50].

1.4.1.1 Антиоксидативна активност бриофита

Новија истраживања повезана са *антиоксидативним активностима* све више се базирају на испитивању антиоксиданата природног порекла, међу којима су посебно

атракативни антиоксиданти из различитих биљака. Биљке садрже велики број једињења која у међусобној комбинацији могу синергистички да „појачају“ свеукупни антиоксидативни ефекат и на тај начин спрече оксидативна оштећења биомакромолекула. С обзиром на то да се оксидативни стрес налази у основи великог броја болести (дијабетес, тумори, неуродегенеративне и друге болести), студије овог типа би биле од огромног значаја за различите типове патолошких стања. Већина истраживања антиоксидативног потенцијала бриофита се фокусира на *in vitro* одређивање активности њихових екстраката и чистих изолованих једињења кроз више различитих хемијских метода као што су: 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (ДППХ) тест, 2,2'-азинобис-3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина (АБТС) тест, одређивање укупног редукционог потенцијала, тест пероксидације липида и β -каротен тест [10, 11, 13] док су у неким студијама испитане активности различитих антиоксидативних ензима у бриофитама у одговору на оксидативни стрес. На пример, екстракт *Plagiochasma appendiculatum* показао је значајну антиоксидативну активност инхибирањем липидне пероксидације и повећањем активности ензима супероксид дисмутазе и каталазе [51]. Истраживањем антиоксидативних ензима у маховини *Brachythecium velutinum* и јетрењачи *Marchantia polymorpha* показана је улога ензима аскорбат пероксидазе у уклањању водоник-пероксида [52], а код јетрењаче *M. polymorpha*, откривен је антиоксидативни ензим пероксидаза за који је утврђено да се разликује од било које већ познате пероксидазе у васкуларним биљкама [53]. Када је у питању маховина *H. cupressiforme*, антиоксидативна активност етанолног екстракта ове маховине испитана је одређивањем способности редукције гвожђа као и на основу способности „хватања“ АБТС и ДППХ радикала [15, 54], док у литератури не постоје подаци о укупном редукционом потенцијалу и активности у β -каротен/линолна киселина тесту за ову врсту.

1.4.2 Антидијабетична активност

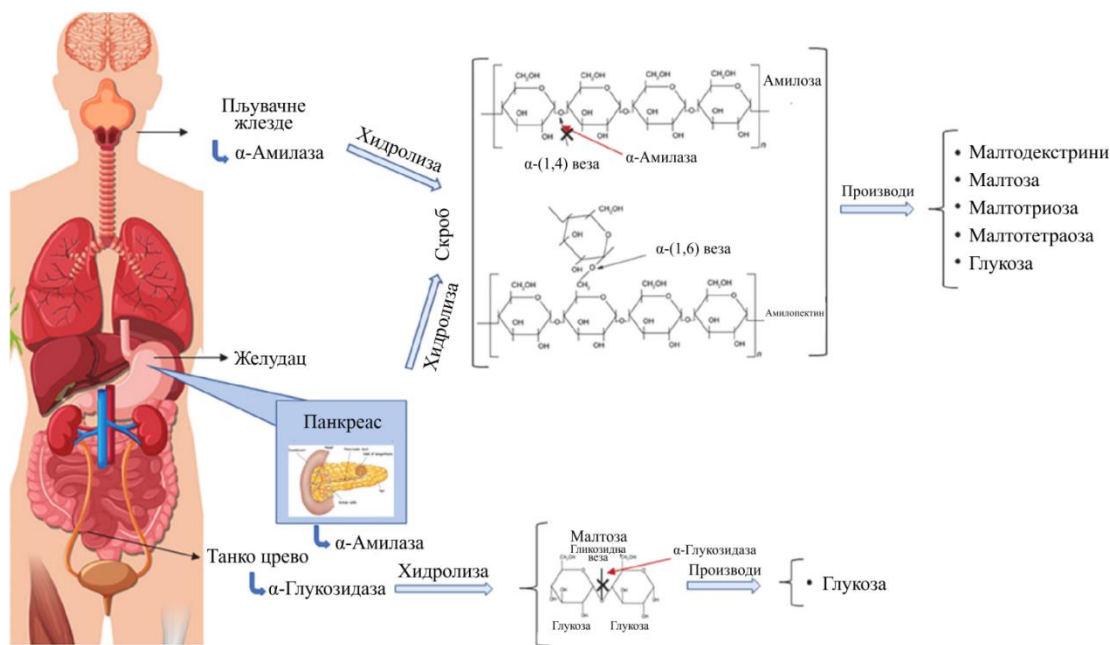
Дијабетес (такође познат као дијабетес мелитус) је једна од најчешћих болести данашњице; 2019. године је око 463 милиона широм света имало дијагнозу дијабетеса, док се процењује да ће до 2045. тај број порасти на око 700 милиона [55]. Дијабетес се дели на тип 1 (отприлике 5-10% пацијената има овај тип) који се сматра аутоимунском болешћу, где имунски систем напада и уништава ћелије панкреаса које услед тога не производе

инсулин, и тип 2 (90-95% пацијената има овај тип) где ћелије показују резистенцију на инсулин, а глукоза се акумулира у крви [55]. Дијабетес типа 2 се сматра болешћу која се може спречити, и стога привлачи више пажње од типа 1. Дијабетес типа 2 може се контролисати променама у исхрани и начину живота, контролисањем нивоа глукозе у крви, што се може постићи:

- (а) стимулисањем секреције инсулина лековима и/или контролом исхране;
- (б) прекидом или успоравањем варења угљених хидрата како би се смањила брзина апсорпције глукозе у крви из танког црева

Један од терапијских приступа у лечењу дијабетеса је инхибиција α -амилазе и α -глукозидазе, два ензима који катализују важне кораке у хидролизи угљених хидрата. На овај начин може се значајно смањити постпрандијална хипергликемија (повећање шећера у крви након оброка) и постићи боље управљање нивоом глукозе у крви код пацијената са дијабетесом типа 2. α -Амилаза је хидролитички ензим ког производе људи, биљке, бактерије, гљиве и животиње [55]. Активност овог ензима зависи од присуства металног кофактора (калцијума). Код људи, α -амилаза се налази у пљувачним жлездама које излучују ензим у уста, и у панкреасу који излучује ензим у танко црево. α -Амилаза катализује хидролизу скроба, и то на ендо позицијама, односно унутрашњости скробних ланаца. Скроб, најзаступљенији полисахарид за складиштење у биљкама, је макромолекул састављен од две врсте олигосахарида, амилозе (линеарне α -(1,4) везе) и амилопектина (линеарне α -(1,4) и разгранате α -(1,6) везе). α -Амилаза хидролизује α -(1,4)-гликозидне везе у молекулу скроба што за производ даје малтозу, малтотриозу, малтотетраозу, малтодекстрин и глукозу (слика 9). Иако се глукоза наводи као главни производ активности α -амилазе, према неким истраживачима примарни производ хидролизе су малтодекстрини, док се глукоза издваја као секундарни производ хидролизе [55].

α -Глукозидаза је кључни ензим који катализује хидролитичку реакцију током које се ослобађа глукоза са нередукуюћих крајева дисахарида или олигосахарида [55, 56]. Код људи, α -глукозидаза се налази у луминалној површини ентероцита одакле се излучује у танко црево (слика 9). Дакле, инхибицијом активности α -глукозидазе може се успорити повећање глукозе у крви након оброка, односно постпрандијална хипергликемија [55].



Слика 9. Улоге и локације ензима α -амилазе и α -глукозидазе.

(Преузето и модификовано из [55])

1.4.2.1 Бриофите као антидијабетични агенси

Иако су синтетски инхибитори ензима за хидролизу угљених хидрата у клиничкој употреби, њихове цене су обично високе, а притом испољавају много нежељених ефеката. Инхибитори изоловани из биљака сматрају се алтернативом синтетских инхибитора због мање нежељених ефеката и велике ефикасности једињења природног порекла [57]. Фенолна једињења, посебно флавоноиди, фенолне киселине и танини, осим што су ефикасни антиоксиданти, описани су и као снажни инхибитори α -глукозидазе и α -амилазе [58]. Нека од једињења за која је раније пријављено да инхибирају α -глукозидазу и α -амилазу су гална, кофеинска и 5-*O*-кафеоилхинска киселина, кемпферол, кверцетин, нарингенин и апигенин [59]. Иако се зна да су маховине и генерално бриофите богате овим секундарним метаболитима, у литератури не постоји много радова о антидијабетичној активности бриофита. Свега неколико истраживања је урађено у овој области, где су екстракти бриофита [13] или појединачне компоненте изоловане из ових врста [9] показале одређену антидијабетичну активност, углавном у инхибицији ензима α -глукозидазе и/или α -амилазе. Међутим, када је у питању маховина *H. cupressiforme*, истраживања на ову тему нису пронађена у литератури.

1.4.3 Антитуморска активност

У организму човека констатно се одржава равнотежа између обнављања и смрти ћелија. Различите врсте ћелија имају ограничен животни век, а када оне умру, нове ћелије настају деобом и диференцијацијом матичних ћелија. На овај начин се, при нормалним околностима, број ћелија одржава константним. Међутим, повремено се јављају ћелије које не реагују на механизме контроле раста и од њих настају клонови који се могу проширити у организму, при чему настају тумори или неоплазме. Тумори који не могу бесконачно да расту и који не улазе у околно здраво ткиво су бенигни тумори, а они који настављају да расту и постају инвазивни су малигни тумори. Осим тога, малигни тумори имају способност метастазе, приликом које се мањи кластери ћелија одвајају од тумора и крвним и лимфним судовима путују до других ткива где такође имају способност пролиферације [60]. Малигни тумори се према ембрионалном пореклу ткива од ког су настали класификују у пет главних група: карциноми, саркоми, лимфоми/мијеломи, леукемије и канцери централног нервног система (податак преузет са званичног сајта Cancer Research UK). Преко 80% малигнух тумора су карциноми – тумори који настају од ендодермалних или ектодермалних ткива као што су кожа или епител унутрашњих органа и жлезда. Међу њима, колоректални тумор и тумор дојке представљају неке од најчешћих типова тумора са лошим прогнозама и великом стопом смртности [61, 62]. Колоректални канцер представља водећи узрок смрти међу туморима у целини, а такође је један од три најчешћа типа тумора у западној хемисфери [61]. Са друге стране, канцер дојке представља други водећи узрок смрти повезаних са тумором код жена широм света, а представља и најчешћи тип тумора код жена [62]. С обзиром на велику распрострањеност као и смртност ових тумора, све је већа потреба за новим терапијским приступима који би показали већу ефикасност против малигнух ћелија, а истовремено и мању цитотоксичност ка здравим, неизмењеним ћелијама.

Иако имунски систем има способност препознавања и уклањања већине туморских ћелија, имунски одговор на туморе често није ефикасан. Постоје различите теорије које повезују настанак тумора са имунским системом. Једна од њих објашњава настанак малигнух тумора као последицу неуспеха у контролисању и елиминацији малигнух ћелија од стране имунског система, односно као последицу неуспеха у имунском надзору [63].

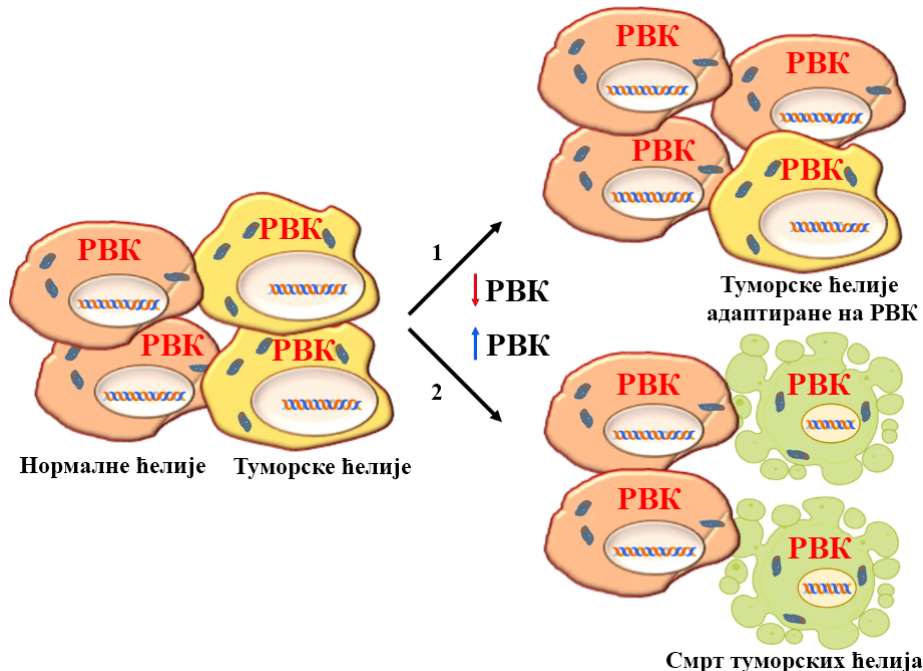
Међутим, постоји и теорија којом се улога имунског система у настанку тумора употпуњује. То је теорија о „промени имуногености тумора“ (енгл. cancer immunoediting) [64]. Наиме, у зависности од врсте ћелије и од њеног окружења, ћелије имунског система могу да убију туморске ћелије, али могу и да подстакну развој тумора. Ова теорија подразумева три фазе у настанку тумора у којима се смањује имуногеност тумора, а повећава се удео имунорегулаторних механизма у туморској микросредини; то су фаза елиминације, фаза еквилибријума и фаза избегавања. Фаза елиминације је слична имунском надзору и подразумева препознавање и уништавање туморских ћелија од стране имунског система. Фаза еквилибријума настаје када су елиминација туморских ћелија и њихов раст у равнотежи, односно елиминација тумора није комплетна, већ неке туморске ћелије подлежу еволутивним променама мутације и селекције којима успевају да спрече уништавање од стране имунског система (енгл. immunoediting). Међутим, још увек нема уочљивог напретка раста тумора у овој фази, пошто је његова прогресија и даље под контролом имунског система. Фаза избегавања имунског одговора (енгл. immune escape) је фаза у којој промењене туморске ћелије потпуно успевају да избегну имунски надзор и почињу да пролиферишу великом брзином, мигрирају и формирају метастазе те долази до клинички уочљивог тумора. Стога, главна стратегија у имунотерапији малигних тумора подразумева стимулацију антитуморског имунског одговора, било директном активацијом имунског система, било инхибицијом имунорегулаторних механизма у туморској микросредини.

1.4.3.1 Улога реактивних врста кисеоника и азот оксида у туморогенези

Како је показано да је оксидативни стрес, између осталог, један од главних окидача за развој тумора, модулација производње РВК може представљати ефикасну стратегију за борбу против различитих врста тумора. РВК индукују туморогенезу разним генетским и епигенетским механизмима, а повишен ниво РВК је откривен у бројним туморима, што доводи до закључка да РВК промовишу раст, прогресију и метастазу тумора, и да би смањењем продукције ових молекула могла да се успори или заустави динамика раста тумора. У том смислу, једна од стратегија које се примењују у терапији тумора је и употреба антиоксиданата који смањују ниво РВК у туморским ћелијама. На пример, у моделу мишјег лимфома показано је да антиоксиданти као што су N-ацетилцистеин и витамин Ц инхибирају туморогенезу тако што доводе до смањења експресије протеина

HIF-1 α (енгл. Hypoxia-inducible factor 1-alpha) који има кључну улогу у туморској ангиогенези и промоцији раста тумора [65]. Међутим, овакве стратегије које укључују смањење нивоа РВК у туморским ћелијама нису увек ефикасне, с обзиром на то да постоје клиничке студије у којима је суплементација антиоксидантима као што су β -каротен, витамин А и витамин Е довела до повећане инциденце настанка и убрзаног развоја тумора [66].

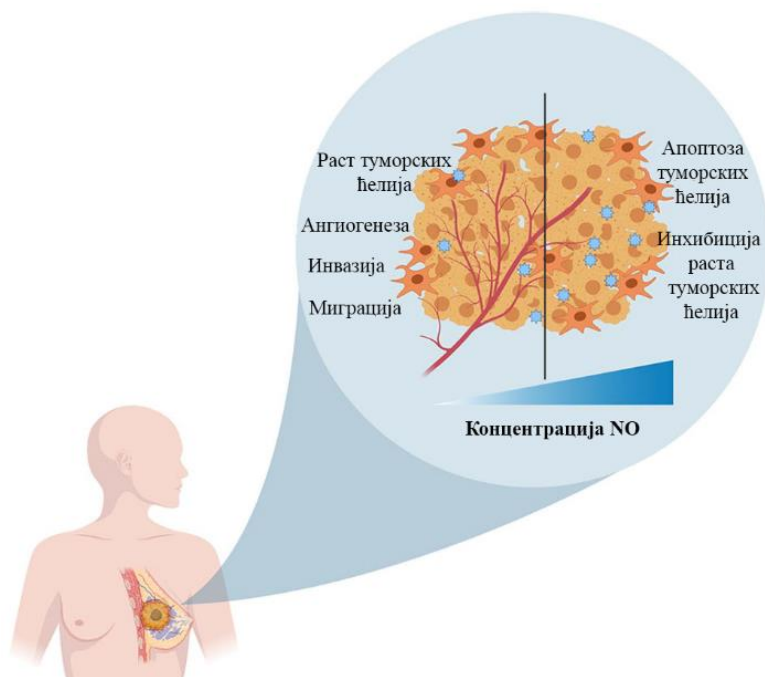
Са друге стране, повећавање продукције РВК је механизам који се налази у основи многих нехируршких терапеутских приступа (хемиотерапија, радиотерапија и фотодинамичка терапија) због улоге РВК у покретању ћелијске смрти. Стога се повећана продукција РВК користи и за убијање туморских ћелија (слика 10). На пример, показано је да витамин Ц у високим концентрацијама делује као прооксидант, који повећавањем продукције РВК доводи до смрти ћелија тумора дебелог црева [66]. Због оваквих ефеката које РВК имају на туморске ћелије, модулација њихове производње (било у правцу смањења или повећања продукције РВК) је једна од главних стратегија за лечење тумора [67].



Слика 10. Утицај модулације РВК у туморском окружењу.

(Преузето и модификовано из [68])

Још један молекул чија је улога у развоју тумора важна, али још увек није у потпуности разјашњена је азот оксид (NO). Антитуморски или протуморски ефекат NO зависи од концентрације NO, времена изложености, типа туморског ткива, као и од комплексних реакција у којима овај наизглед једноставан молекул учествује у организму (слика 11). На пример, прекомерна производња NO, као једна од одлика хроничне инфламације која је карактеристична за туморско окружење, може довести до различитих оштећења ДНК, активације онкогена, инхибиције ензима за поправку ДНК као и гена за супресоре тумора, што све говори у прилог генотоксичног ефекта овог молекула у туморском окружењу. Ипак, чини се да је NO веома битан за антитуморску активност имунског одговора, како је показано да NO продукован од стране макрофага инхибира респирацију у туморским ћелијама [69]. Дакле, фином модулацијом производње РВК и NO у туморском окружењу, може се контролисати раст и прогресија туморских ћелија, што може имати значајан терапеутски потенцијал.



Слика 11. Утицај модулације концентрације NO у туморском окружењу.

(Преузето и модификовано из [70])

1.4.3.2 Бриофите као антитуморски агенси

Имајући у виду чињеницу да различити синтетски лекови који се тренутно користе као антитуморска терапија испољавају озбиљне токсичне ефекте према нормалним ћелијама, у новије време све више истраживања је усмерено ка антитуморским агенсима природног порекла. Приближно 60% лекова који се тренутно користе у терапији различитих тумора изоловано је из природних производа, при чему биљке представљају најзначајнији извор антитуморских једињења [71]. Између осталих биљака, екстракти бриофита привлаче много пажње у последњих неколико деценија, јер постоји све више доказа о њиховом потенцијалу за инхибицију различитих стадијума туморогенезе, као и пратећих инфламаторних процеса [9, 54, 72, 73]. Због разноврсног садржаја секундарних метаболита, маховине у ужем смислу и генерално бриофите представљају одличне кандидате за проналажење нових, мање токсичних и селективнијих терапијских средстава у борби против различитих тумора. Иако механизми антитуморске активности бриофита нису у потпуности разјашњени, установљено је да њихови екстракти могу активирати различите биохемијске путеве и изазвати апоптозу и/или некрозу туморских ћелија [73], а једињења попут фенола и флавоноида, заједно са терпеноидима, представљају неке од главних секундарних метаболита присутних у бриофитама који су одговорни за њихова антипролиферативна/антитуморска својства. Способност фенолних једињења и једињења сличних фенолима да спрече и/или успоре напредовање туморских ћелија остварује се њиховом интеракцијом са основним ћелијским процесима повезаним са пролиферацијом и диференцијацијом ћелија, инфламацијом, апоптозом и ангиогенезом, што је показано у многим студијама [73-76].

Литературни подаци показују да екстракт маховине *H. cupressiforme* испољава антитуморски потенцијал према HeLa туморским ћелијама грлића материце и A549 ћелијама хуманог карцинома плућа [54]. Екстракт маховине *Hedwigia ciliata* испољио је антитуморски потенцијал према MDA-MB-231 ћелијама аденокарцинома дојке [13], док су екстракти маховине *Polytrichum commune* показали антитуморску и проапоптотску активност према L1210 ћелијама лимфоцитне леукемије [77]. Једињење изоловано из *Polytrichum ohioense* испољило је цитотоксичност према ћелијама 9PS мишије леукемије и MCF-7 ћелијама хуманог тумора дојке, а бензонафтоксантенони и деривати циметне киселине изоловани из етанолног екстракта *Polytrichum pallidisetum* значајно су смањили

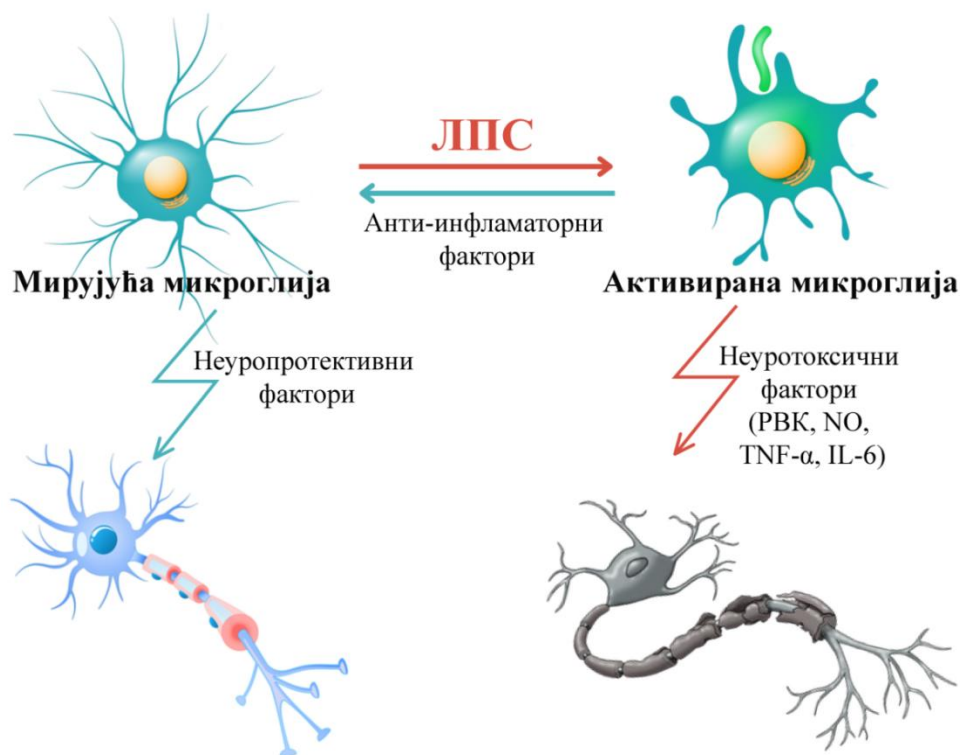
раст RPMI-7951 меланома и U-251 глиобластома [78]. Бибензили маршанцин А изолован из *Marchantia paleacea*, *M. polymorpha*, и *M. tomana*, рикардин изолован из *Riccardia multifida* и перотетин Е изолован из *Radula perrottetii* показали су цитотоксичност према леукемијској KB ћелијској линији [79]. Сесквитерпеноиди изоловани из *Frullania monocera*, *M. polymorpha*, *Porella japonica*, *Wiesnerella denudata*, *Conocephalum supradecompositum* и *Plagiochila semidecurrens* показали су антитуморску активност према карциному назофаринкса код људи [80]. Дакле, сви ови подаци показују да бриофите имају велики потенцијал у борби против различитих врста тумора. Међутим, за маховину *H. cupressiforme* активност је потврђена само за туморске ћелије грлића материце и карцинома плућа, док нпр. за канцер дојке и колоректални канцер не постоје подаци за ову врсту.

1.4.4 Анти-инфламаторна активност

Инфламација (лат. *inflammatio* – „запалити”) је комплексан одговор урођеног имунског система на различите инфекције и трауме у организму, а карактеришу је црвенило, повећана температура, оток и бол на месту повреде [1]. У инфламаторном процесу учествују различите ћелије имунског система као и бројни солубилни медијатори, при чему веома важну улогу има контролисана миграција леукоцита на место инфекције/повреде. Поред леукоцита, кључну улогу у инфламацији имају и ендотелне ћелије венула које се налазе у непосредној близини инфицираног или оштећеног ткива. Ове ћелије производе различите молекуле који додатно поспешују привлачење и регулишу миграцију леукоцита на место инфламације. Захваљујући инфламацији, у оштећеном ткиву се од иницијалних механизма до коначног опоравка одвијају прогресивне промене које за циљ имају контролисање инфекције и елиминацију узрока инфламације из организма, као и поправку оштећеног ткива. Међутим, постоје случајеви када имунски одговор постаје неадекватан и неконтролисан, што доводи до стања хроничне инфламације. Хронична инфламација може трајати недељама и месецима и укључена је у патогенезу различитих болести, укључујући атеросклерозу, туморе, астму и различите неуродегенеративне поремећаје. У таквим случајевима, када имунски одговор постане неадекватан и неконтролисан, користе се анти-инфламаторни или имуносупресивни лекови [1].

1.4.4.1 Неуроинфламација

Када се инфламација одиграва у мозгу и другим деловима нервног система, она се онда означава као неуроинфламација. Кључну улогу у неуроинфламацији имају резидентне имунске ћелије централног нервног система (ЦНС), ћелије микроглије [81]. Ћелије микроглије представљају специјализовану популацију макрофага, које уклањају оштећене неуроне и ћелијски дебрис у ЦНС-у процесом фагоцитозе. На тај начин, у физиолошким условима, микроглија доприноси развоју мозга и игра веома важну улогу у одржавању хомеостазе у ЦНС-у. Међутим, када се ћелије микроглије активирају, у случају оштећења или инфекције у ЦНС-у, оне ослобађају читав низ инфламаторних медијатора, укључујући РВК, NO, проинфламаторне цитокине (интерлеукин-1, IL-1; интерлеукин-6, IL-6; фактор некрозе тумора- α , TNF- α) као и многе друге [82]. Један од најпотентнијих и најчешће коришћених активатора микроглије је липополисахарид (ЛПС), ендотоксин грам-негативних бактерија који се везује за TLR4 рецептор (рецептор сличан Toll-у 4) на површини ћелија микроглије, што на крају резултује активацијом нуклеарног фактора капа Б (енгл. nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells, NF- κ B). Овај транскрипциони фактор затим подстиче продукцију проинфламаторних цитокина, NO и других молекула који учествују у неуроинфламацији. Прекомерна и неконтролисана активација микроглије може да доведе до хроничне неуроинфламације која, између осталог, може да изазове оштећења околног здравог нервног ткива и прогресивни губитак неурона (слика 12). Хронична инфламација се налази у основи многих неуродегенеративних болести, укључујући Алцхајмерову болест и Паркинсонову болест [83].



Слика 12. Приказ утицаја мирујуће и активирание микроглије на неуроне.

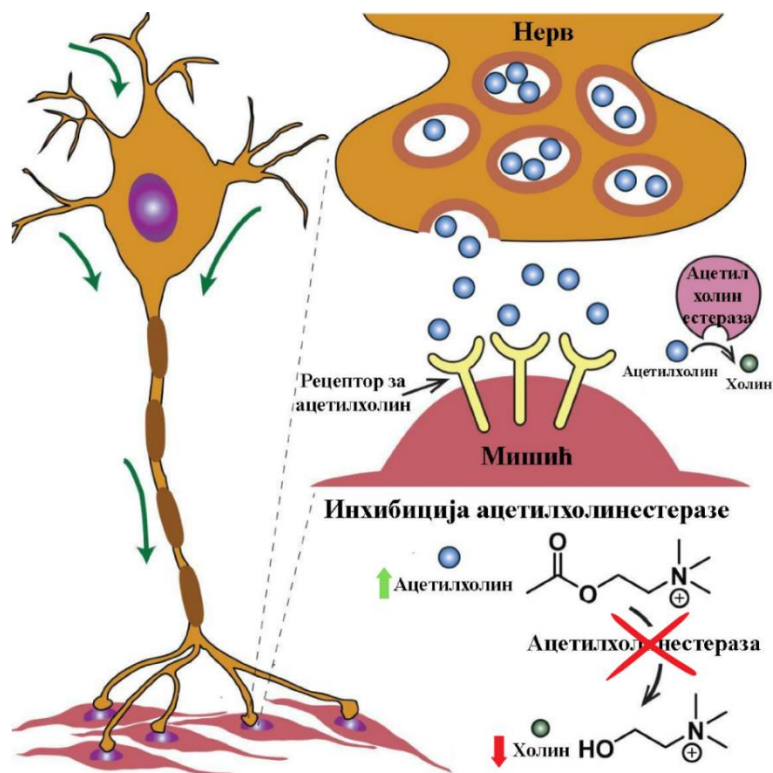
Медијатори (NO, РВК и цитокини) продуковани од стране микроглије играју кључну улогу у оштећењу неурона током неуроинфламације. Повећано ослобађање ових молекула нарушава антиоксидативне системе неурона, што доводи до пероксидације липида и оксидације протеина, а коначно и до смрти ћелије [84]. Иако NO као сигнални молекул игра важну улогу у ћелији, продужено ослобађање овог молекула од стране ћелија микроглије може бити штетно, јер су NO и продукти његови разградње веома реактивни и могу да узрокују смрт неурона. Велике количине NO се производе уз помоћ ензима индуцибилне NO синтазе (енгл. inducible nitric oxide synthase, iNOS) након стимулације ћелија [84].

Цитокини су мали, солубилни протеини који имају улогу медијатора у различитим имунским реакцијама, међу којима је и инфламација. Ослобађају их ћелије имунског система као и ендотелне ћелије у одговору на различите стимулусе из спољашње средине, а своје ефекте цитокини остварују везивањем за цитокинске рецепторе на ћелијама на које делују. Цитокини обављају разноврсне функције у организму, а према томе како делују на

инфламацију, могу се поделити на проинфламаторне цитокине који промовишу инфламацију и анти-инфламаторне цитокине који је супримирају. Најзначајнији проинфламаторни цитокини су IL-1, IL-6 и TNF- α [85]. Ћелије микроглије производе ове цитокине у одговору на различите инфламаторне стимулусе. Иако је њихова примарна сврха спречавање даљег оштећења ткива ЦНС-а, ови цитокини често доприносе неуроинфламацији, а за неуроне и друге глијалне ћелије могу бити веома токсични. IL-1, IL-6 и TNF- α инхибирају процес неурогенезе (настанак нервних ћелија), а могу и да доведу до апоптозе нервних ћелија. Ови цитокини такође утичу на интегритет крвно-мождане баријере, тако што повећавају њену пропустљивост за леукоците, који на тај начин доспевају до ЦНС-а. Поред локалних, проинфламаторни цитокини показују и различите системске ефекте, попут повећања телесне температуре, повећане производње леукоцита и синтезе протеина акутне фазе. Повећана продукција проинфламаторних цитокина примећена је и у анималним моделима Алцхајмерове и Паркинсонове болести, иако се не зна тачан механизам којим доприносе прогресији ових неуродегенеративних обољења [85]. Имајући у виду описану централну улогу микроглије у неуроинфламацији, контрола активације ћелија микроглије може послужити као потенцијални механизам за лечење различитих неуродегенеративних болести. Поред неуроинфламације, у основи неуродегенеративних болести као што су Алцхајмерова и Паркинсонова болест је и повећана активност различитих ензима.

У 2020. години, процењено је да је више од 50 милиона људи широм света болује од деменције, при чему је око 60% свих случајева било повезано са Алцхајмеровом болешћу [86, 87]. Алцхајмерова болест је неуродегенеративно обољење које карактеришу прогресивни губитак когнитивних способности као и губитак памћења. Комплетан механизам патогенезе још увек није потпуно разјашњен, а према „холинергичкој хипотези“, сматра се да је прогресивна дегенерација холинергичких неурона главни фактор који доприноси настанку болести [88]. Смањење концентрације ацетилхолина у мозгу пацијената са Алцхајмеровом болешћу настаје услед повећане активности ацетилхолинестеразе у неуронима. То је ензим који катализује разградњу ацетилхолина на ацетил и холин, чиме регулише његов ниво у синапсама [89]. Како је једна од главних карактеристика Алцхајмерове болести губитак памћења узрокован смањеним нивоом ацетилхолина, инхибицијом ацетилхолинестеразе могла би да се спречи деградација

ацетилхолина и повећа ниво овог неуротрансмitera у мозгу, што заузврат побољшава памћење и когнитивне функције пацијената (слика 13). Многи инхибитори ацетилхолинестеразе су развијени у претходних 20 година. Иако су углавном коришћени за лечење деменције узроковане Алцхајмеровом болешћу, ови инхибитори су се такође показали ефикасним у лечењу глаукома, мијастеније гравис као и хроничних психијатријских болести попут шизофреније. Донепезил, галантамин и ривастигмин су међу најчешће коришћеним комерцијалним инхибиторима ацетилхолинестеразе, међутим њихова употреба је ограничена услед нежељених ефеката које показују [90].



Слика 13. Улога и локација ацетилхолинестеразе.

(Преузето и модификовано са <https://sites.usc.edu/mousavi/research/neural-probes-for-acetylcholine/>)

Са друге стране, тирозиназа је ензим чија је кључна улога у организму производња меланина у кожи и коси. Такође, утврђено је да тирозиназа оксидује допамин у мозгу и на тај начин доприноси формирању неуромеланина у ЦНС-у [91, 92]. Код људи, неуромеланин се акумулира са годинама, а производња и акумулација неуромеланина и последично оштећење неурона које се јавља услед ове акумулације, повезани су са

Паркинсоновом болешћу. Наиме, код Паркинсонове болести долази до селективне дегенерације неурона који садрже неуромеланин, тамно-браон цитоплазматски пигмент, а посебно су погођени допаминергички неурони у *substantia nigra* [91]. С обзиром на то да тирозиназа доприноси формирању неуромеланина у ЦНС-у, и да је укључена у патогенезу Паркинсонове и сличних неуродегенеративних болести, инхибиција овог ензима постала је један од главних циљева у развоју лекова и третману различитих обољења. Због високих цена и веома честих нежељених ефеката тренутних лекова против различитих неуродегенеративних болести, постоји огромна потреба за развојем нових терапеутских стратегија које ће бити ефикасније и безбедније за употребу код људи.

1.4.4.2 Бриофите као анти-инфламаторни агенси

Како се од давнина знало за њихов анти-инфламаторни потенцијал, многе бриофите су недавно постале предмет истраживања у којима је откривен механизам њиховог деловања. Истраживања су потврдила да бриофите имају способност инхибиције различитих ензима повезаних са инфламаторним процесима: циклооксигеназа, 5-липоксигеназа, хијалуронидаза, iNOS, ацетилхолинестераза, тирозиназа [13, 93]. Различита фенолна једињења која се налазе у бриофитама показала су значајну инхибицију циклооксигеназне и липоксигеназне активности у *in vitro* условима, док је за одређене секундарне метаболите јетрењача детектована снажна антихијалуронидазна активност. Бриофите као што су *Plagiochila fruticosa*, *Plagiochila ovalifolia*, *Plagiochila yokogurensis*, *Jungermannia infusca*, *Porella elegantula* и *Conocephalum conicum* доводе до инхибиције ослобађања супероксид-анјон радикала у перитонеалним макрофагима, што је показано на различитим анималним моделима (заморцу, зецу), указујући на тај начин на анти-инфламаторни и антиоксидативни потенцијал [93]. На моделу перитонеалних макрофага (RAW 264.7 ћелије) показано је и да одређени секундарни метаболити, претежно макроциклични бибензили изоловани из јетрењача, доводе до инхибиције производње NO од стране ЛПС-ом активираних ћелија, док је у ћелијама микроглије (BV2 ћелије) примећено смањење производње NO од стране ЛПС-ом активираних микроглије након третмана екстрактима маховине *Hedwigia ciliata* [13, 93]. Такође, екстракти исте ове маховине су показали снажан потенцијал ка инхибицији ензима ацетилхолинестеразе и тирозиназе [13], док за екстракте маховине *H. cupressiforme* не постоје подаци у

литератури о њиховом деловању на микроглију, неуроне, као ни на ензиме ацетилхолинестеразу и тирозиназу.

1.4.5 Зарастање ране

Зарастање ране је сложен процес у који су укључени различити типови ћелија, сигнални молекули као и компоненте ванћелијског матрикса, које раде заједно како би дошло до резолуције инфламације и формирања фиброзног ожиљка [94]. Читав процес зарастања ране је веома тешко експериментално испратити, па се углавном прате појединачни кораци који се дешавају у току зарастања. Један од најбитнијих корака у зарастању ране јесте миграција ћелија, која се јавља у готово свим фазама зарастања, како на почетку тако и на крају инфламаторног процеса, заједно са коагулацијом крви и агрегацијом тромбоцита на месту повреде. Ови догађаји спречавају прекомерни губитак крви, стварањем привремене блокаде и попуњавањем повређених подручја без ткива. Тромбоцити у циркулацији продукују и ослобађају вазоактивне медијаторе и хемотактичке факторе, који заједно доводе до миграције леукоцита у рањено ткиво ради започињања процеса репарације. Реепителизација се дешава у року од неколико сати од повреде ткива и подразумева покривање повређеног места кроз активност и миграцију епителних кератиноцита. На овај начин се спречава контаминација и/или инвазија страних честица на место повреде. Ово су само неке од многих функција које су повезане са миграцијом ћелија у процесу зарастања ране [94]. Миграција ћелија током зарастања ране се у *in vitro* условима прати на помоћу „wound healing“ или „scratch“ теста, мерењем затварања прореза, односно огреботине направљене у монослоју ћелија.

1.4.5.1 Бриофите као модулатори зарастања ране

Бриофите су се традиционално користиле у Кини, Европи и Северној Америци за лечење посекотина, модрица, опекотина, спољашњих рана и генерално повреда коже. Етанолни екстракт *Brachytenium exile* показао је добар потенцијал у зарастању ране у *in vitro* условима [95], док су екстракти маховина *Tortula muralis* и *Grimmia pulvinata* испитани у *in vitro* условима на хуманим фибробластима (HFF-1 ћелијска линија) довели до повећаног затварања ране [15]. Екстракти јетрењача *Reboulia hemisphaerica*, *Plagiochasma rupestre* и *Targionia hypophylla* су такође испољили добар потенцијал у

побољшању зарастања ране [14]. Екстракти маховине *H. cupressiforme* до сада нису испитани као модулатори зарастања ране.

1.5 Молекулски докинг

Молекулски докинг представља стандардну и често коришћену методу за одређивање начина укотвљавања, односно везивања испитиваног једињења (лиганда) за макромолекул од интереса (рецептор) [96]. На овај начин може да се предвиди јачина/афинитет везивања лиганда за макромолекул, као и потенцијална биолошка активност једињења. Рецептор је протеин или нуклеинска киселина, док лиганди могу бити различити биоактивни молекули, као и други мањи протеини. Дакле, основни циљ молекулског докинга јесте предвиђање структуре комплекса лиганд-рецептор и дефинисање стабилности насталог комплекса предвиђањем константе дисоцијације. На овај начин може се са великом прецизношћу одредити конформација малих молекула (лиганада) у активном месту макромолекула од интереса.

Први алгоритам молекулског докинга развијен је још 80-их година прошлог века, и од тада ова метода представља једну од основних корака у дизајнирању и откривању нових лекова [97]. У савременој научној литератури може се пронаћи велики број радова о примени молекулског докинга у различитим гранама биологије, хемије, медицине и фармакологије. Посебно је значајан број радова посвећен докингу секундарних метаболита идентификованих у екстрактима биљака за различите протеине од интереса [92, 98-100]. На пример, молекулским докингом је утврђено да су једињења идентификована помоћу гасне хроматографије спрегнуте са масеном спектрометријом у екстрактима биљке *Dracaena reflexa* ефикасни инхибитори ензима тирозиназе, ацетилхолинестеразе и бутирилхолинестеразе [101]. На овај начин су додатно објашњене активности према овим ензимима добијене у *in vitro* условима. Све већи број оваквих радова потврђује значај молекулског докинга у испитивању биолошких активности биљних екстраката, али и истичу потенцијал ове методе у откривању могућих механизма њиховог деловања.

Један од главних предуслова за успешно извођење молекулског докинга јесте да је тродимензионална структура макромолекула од интереса позната, по могућству експериментално одређена (било дифракцијом X-зрака или помоћу нуклеарне магнетне резонанце). Структуре протеина (као једног од типова рецептора) су бесплатно доступне академској заједници и налазе се ускладиштене у бази протеина познате структуре (енгл. Protein Data Bank, PDB). У случајевима када тродимензионална структура протеина није експериментално одређена, а за протеин постоји примарна аминокиселинска секвенца, приступа се хомоложном моделовању [97]. Хомологим моделовањем се, на основу примарне секвенце протеина од интереса и експериментално одређене тродимензионалне структуре протеина који се користи као шаблон и чија структура има највећу сличност у секвенци са протеином од интереса, приступа моделовању, након кога се добијају подаци о предвиђеној тродимензионалној структури протеина од интереса. У крајњем случају може да се приступи и *ab initio*, односно *de novo* моделовању на основу примарне аминокиселинске секвенце. Процедура молекулског докинга обухвата два међусобно повезана корака:

- (а) предвиђање конформације и оријентације лиганда унутар предложеног везивног места у протеину
- (б) предвиђање афинитета везивања, односно енергије интеракције са сваком од предвиђених конформација лиганда

Конформације лиганда, односно његова акомодација у активно место протеина, могу се генерисати коришћењем различитих алгоритама: Монте Карло метода, генетски алгоритам, фрагмент метода, систематско претраживање, молекулска динамика и остале [102]. Када су у питању флексибилност протеина и лиганда, постоје три начина извођења молекулског докинга [97]. Први начин при везивању третира и протеин и лиганде као ригидне структуре, а најчешће се користи за брзо скенирање везивања лиганда, без промене његове конформације. Овакав приступ је познат и под називом ригидни докинг. Други начин при везивању третира везивно место протеина као ригидно, док је лиганд флексибилан и његове конформације се мењају у покушају да се добије што стабилнији комплекс. Овакав приступ молекулском докингу се назива флексибилни докинг. Трећи начин при везивању третира обе структуре (и атоме лиганда и атоме везивног места на

протеину) као флексибилне, а познат је и под називом индуковано уклапање (енгл. induced fit). Иако даје најбоље резултате, ова метода је временски и компјутерски доста захтевна. Приликом ригидног и флексибилног докинга, након избора места на протеину за које се везује лиганд, генерише се и мрежа правилно распоређених тачака у простору, односно такозвани „grid box“. Центар масе лиганда се потом помера по свакој тачки „grid box-a“ при чему се мењају оријентације и конформације лиганда и одређује се енергетски биланс сваке позе у потрази за најстабилнијом конформацијом, односно најповољнијом енергијом.

Докинг се врши са великим бројем понављања како би се добиле што тачније вредности енергија везивања, изражене у kcal/mol. Обично се генерише неколико најповољнијих конформација за лиганд, а затим се конформација лиганда са најнижом енергијом везивања користи за анализу интеракција испитиваног једињења са активним местом протеина од интереса. Пре извођења докинг процедуре са лигандима које испитујемо, неопходно је урадити валидацију докинг протокола, односно ре-докинг лиганда који се налази у склопу саме кристалне структуре протеина од интереса. На овај начин се проверава да ли протокол који се користи може да предвиди конформацију и оријентацију лиганда приближну оној која се налази у кристалној структури, а у те сврхе се израчунава RMSD вредност (енгл. Root Mean Square Deviation), према следећој формули:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [(X_{x,i} - X_{p,i})^2 + (Y_{x,i} - Y_{p,i})^2 + (Z_{x,i} - Z_{p,i})^2]}{N}}$$

где су X_x , Y_x и Z_x експериментално одређене атомске координате лиганда, а X_p , Y_p и Z_p су атомске координате за позицију лиганда генерисану докингом; N је број атома који нису водоник у структури лиганда. Идеална RMSD вредност би била 0, међутим, свака вредност испод 2 Å се сматра прихватљивом [103].

2 ЦИЉЕВИ

Упркос распрострањености и познатој традиционалној употреби маховине *H. cupressiforme*, студије о хемијском саставу и биолошкој активности ове врсте су ретке и обично укључују анализу антиоксидативног, антимикробног или антитуморског потенцијала њених екстраката. Литературни подаци су показали да екстракти маховине *H. cupressiforme* имају потенцијал да се користе као имуномодулаторна средства у превенцији и третману различитих патолошких стања код човека, због чега је управо ова маховина изабрана за истраживање у оквиру ове докторске дисертације.

На основу података из литературе постављена је радна хипотеза да: Различити екстракти маховине *H. cupressiforme* садрже биолошки активна једињења која испољавају имуномодулаторни ефекат и стога екстракти ове маховине могу имати потенцијалну примену у терапији различитих болести.

На основу радне хипотезе постављен је основни циљ истраживања:

Извршити хемијску карактеризацију различитих екстраката маховине *H. cupressiforme* и испитати њихов имуномодулаторни утицај применом (1) *in vitro* и (2) *in silico* истраживања.

У складу са основним циљем истраживања дефинисани су следећи истраживачки задаци:

1. Екстракција – Припремити екстракте маховине *H. cupressiforme* употребом различитих растварача.
2. Хемијска карактеризација – Извршити хемијску карактеризацију добијених екстраката маховине.
3. Биохемијска активност – Одредити антиоксидативну, антидијабетичну и антинеуродегенеративну активност екстраката.
4. Биолошка активност – Испитати утицај и механизме деловања екстраката на метаболичку активност ћелија (како нормалних тако и туморских); испитати утицај на продукцију РВК, NO и цитокина од стране испитиваних ћелија; испитати утицај екстраката на зарастање повреде у монослоју ћелијске културе.
5. Селекција растварача за екстракцију – Дефинисати најпотентнији/оптимални екстракт на основу испитаног хемијског састава и испољене биохемијске и биолошке активности свих испитиваних екстраката.

6. Сезонске варијације – Утврдити сезонске варијације током вегетационог периода, односно периода активности маховине (пролеће, лето, јесен) у саставу секундарних метаболита, биохемијској и биолошкој активности екстраката добијених одабраним растварачем за екстракцију.
7. *In silico* истраживања – Испитати интеракције секундарних метаболита идентификованих у екстрактима маховине са протеинима од интереса и утврдити начин везивања као и корелацију између везивања и испољеног биохемијског/биолошког ефекта.

3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 Хемикалије и реагенси

Ацетилхолинестераза из *Electrophorus electricus* Linnaeus, 1766, ацетилхолин јодид, акарбоза, алуминијум нитрат нонахидрат ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$), апигенин, аскорбинска киселина, ацацетин, БХА (2-терц-бутил-4-хидроксианизол), БХТ (3,5-ди-терц-бутил-4-хидрокситолуен), ванилин, дибазни натријум фосфат (Na_2HPO_4), ДМСО (диметил сулфоксид), ДППХ (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил), ДТНБ (5,5'-дитиобис-(2-нитробензоева киселина)), галантамин, гална киселина, гвожђе(II) сулфат хептахидрат ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), гвожђе(III) хлорид (FeCl_3), ериодиктиол, изорхамнетин-3-*O*-глукозид, кофеинска киселина, калијум дихидроген фосфат (KH_2PO_4), калијум ацетат (CH_3COOK), калијум хлорид (KCl), калијум персулфат ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), кемпферол, кверцетин, кверцетин 3-*O*-глукозид, кверцетин 3-*O*-рутинозид, којична киселина, кумарин, линолна киселина, липополисахарид (ЛПС), Луголов раствор, L-DOPA (3,4-дихидрокси-L-фенилаланин), монобазни натријум фосфат (NaH_2PO_4), МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид), магнезијум сулфат (MgSO_4), *N*-1-нафтилетилендиаминдихидрохлорид, натријум ацетат (CH_3COONa), натријум бикарбонат (NaHCO_3), натријум хлорид (NaCl), натријум карбонат (Na_2CO_3), натријум нитрит (NaNO_2), *p*-кумаринска киселина, *p*-хидроксибензоева киселина, *p*NPG (*p*-нитрофенил- β -D-глукопиранозид), протокатехуинска киселина, RPMI 1640 (енгл. Roswell Park Memorial Institute), СДС (натријум додецил сулфат), сулфаниламид, тирозиназа из *Agaricus bisporus*, Тризма база, Тритон X-100, Tween 40, урсолна киселина, Folin-Ciocalteu реагенс, 5-*O*-кафеоилхинска киселина, α -амилаза, α -глукозидаза тип I из *Saccharomyces cerevisiae* и β -каротен су купљени од Sigma-Aldrich, САД.

Глацијална сирћетна киселина (CH_3COOH), глицерол, етил-ацетат, хлороформ, хлороводонична киселина (HCl) и метанол (CH_3OH) набављени су од Zorka Pharma, Србија. Водоник-пероксид (H_2O_2) је набављен од Фарманеа Галенске Лабораторије, Србија, а натријум хидроксид (NaOH), олово ацетат трихидрат ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \times 3(\text{H}_2\text{O})$), калијум ферицијанид ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) и трихлорсирћетна киселина (CCl_3COOH) од Superlab, Србија. DMEM 5523 (енгл. Dulbecco's Modified Eagle Medium), FBS (енгл. Fetal Bovine Serum) и PBS (енгл. Phosphate-Buffered Saline) су набављени од Gibco, Invitrogen, САД. Дикалијум фосфат (K_2HPO_4), динатријум фосфат додекахидрат

($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), динатријум фосфат дихидрат ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) и перхлорна киселина (HClO_4) су набављени од VWR, САД. Фосфорна киселина (H_3PO_4) је набављена од Honeywell, САД. Пеницилин/стрептомицин је купљен од PAA Laboratories GmbH, Аустрија. Раствор скроба (1%) је набављен од Karl Roth-а, Немачка, NBT (енгл. Nitro Blue Tetrazolium) од Serva Electrophoresis GmbH, Немачка, а ацетонитрил (CH_3CN) и мравља киселина (HCOOH) су набављени од Merck, Немачка. Раствор трипсина (0,5%) је купљен од Capricorn Scientific GmbH, Немачка.

3.2 Раствори

Табела 2. Састав коришћених раствора, пуфера и медијума.

Раствори/пуфери/медијуми	Састав
1. Натријум фосфатни пуфер (0,2 М, рН 6,6)	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$2,51 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$1,40 g Дестилована вода.....до 100 mL
2. Емулзија за β -каротен/линолна киселина тест	β -каротен у хлороформу (1 mg/mL).....125 μL Линолна киселина..... 6,25 μL Tween 40.....50 mg Хлороформ.....125 mL Упарити на 40 °C помоћу вакуум упаривача, а суви остатак растворити у 25 mL дестиловане воде
3. Натријум фосфатни пуфер (0,1 М, рН 6,8 са 6 mM NaCl)	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$1,12 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$1,00 g NaCl.....35,0 mg Дестилована вода.....до 100 mL
4. Натријум фосфатни пуфер (0,1 М, рН 7)	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$0,96 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$1,36 g Дестилована вода.....до 100 mL
5. Калијум фосфатни пуфер (0,1 М, рН 6,8)	K_2HPO_40,86 g KH_2PO_40,68 g Дестилована вода.....до 100 mL
6. Трис-НСl (20 mM, рН 7,5)	Тризма база.....0,24 g Дестилована вода.....до 100 mL
7. α -амилаза (0,5 mg/mL)	α -амилаза.....1 mg Натријум фосфатни пуфер (број 3).....2 mL
8. α -глукозидаза (0,5 јединица/mL)	α -глукозидаза.....1 mg Калијум фосфатни пуфер (број 5).....37,04 mL

9. Ацетилхолинестераза (5 јединица/mL)	Ацетилхолинестераза.....1 mg Трис-НСl пуфер (број 6).....11,765 mL
10. Тирозиназа (46 јединица/mL)	Тирозиназа.....1 mg Натријум фосфатни пуфер (број 4).....21,74 mL
11. Скроб (0,2%)	1% skrob.....1 mL Натријум фосфатни пуфер (број 3).....4 mL
12. pNPG (5 mM)	pNPG.....15 mg Калијум фосфатни пуфер (број 5).....10 mL
13. DTNB (0,01 M)	DTNB.....7,92 mg NaHCO ₃3 mg Натријум фосфатни пуфер (број 4).....2 mL
14. Ацетилхолин јодид (0,075M)	Ацетилхолин јодид.....21,67 mg Натријум фосфатни пуфер (број 4).....1 mL
15. L-DOPA (2,5 M)	L-DOPA.....1,96 mg Натријум фосфатни пуфер (број 4).....4 mL
16. DMEM 5523 медијум	DMEM 5523.....1 паковање NaHCO ₃3,7 g Дејонизована вода.....до 1000 mL pH је подешена на 7,1-7,4 помоћу HCl осмолалност медијума око 300 mmol/kg
17. DMEM 5523 комплетни медијум	DMEM 5523 медијум (раствор 16).....88 mL FBS.....10 mL 1,95 M глукоза.....1 mL Антибиотик (пеницилин/стрептомицин).....1 mL
18. RPMI 1640 медијум	RPMI 1640.....1 паковање NaHCO ₃2 g Дејонизована вода.....до 1000 mL pH је подешена на 7,1-7,4 помоћу HCl осмолалност медијума око 300 mmol/kg
19. RPMI 1640 комплетни медијум	RPMI 1640 медијум (раствор 18).....88 mL FBS.....10 mL 1,95 M глукоза.....712 µL Антибиотик (пеницилин/стрептомицин).....1 mL
20. Слани раствор фосфатног пуфера (PBS, pH 7,4, 270-280 mOsm/L)	NaCl.....4 g KCl.....0,1 g Na ₂ HPO ₄0,57 g KH ₂ PO ₄0,1 g Дестилована вода.....до 500 mL
21. Трипан плаво	Трипан плаво.....4 mg PBS пуфер (број 20).....1 mL

Табела 3. Називи и произвођачи коришћених ELISA комплеката.

Назив	Произвођач
1. Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit	R&D systems
2. Mouse TNF-alpha Quantikine ELISA Kit	R&D systems

3.3 Биљни материјал

Узорци маховине *H. cupressiforme* (пролећни, летњи и јесењи аспект) сакупљени су на Вршачким планинама, и то на истом месту:

Србија, Вршац, Вршачке планине, недалеко од Вршачке куле (N 45°07', 26,5", E 21°19'40,1", 370 m надморске висине)

Ваучери за све прикупљене узорке су депоновани у хербару BEOU (leg./det. M. S. Sabovljevic and A. D. Sabovljevic, vouchers BEOU bryo collection s/n), а тачни датуми прикупљања за испитиване сезоне су следећи: пролеће (11.05.2019.), лето (20.08.2020.) и јесен (01.12.2020.). Маховине су узорковане са силикатних стена, из исте популације током различитих годишњих доба. Дозволу за сакупљање биљног материјала дало је Министарство за Заштиту животне средине Србије (број дозволе: 353-01-798/2020-04).

3.4 Припрема екстраката

Прикупљене маховине су стављене у папирне кесе и осушене на собној температури у ексикатору. Узорци маховине (5 g суве тежине) су уситњени, а потом екстраховани у Сокслет апаратури у трајању од 10 h, употребом 100 mL следећих растварача:

Пролећни аспект маховине

1. Вода (**П-1**)
2. 96% етанол (**П-2**)
3. Смеша вода:етанол у запреминском односу 1:1 (**П-3**)
4. Етил-ацетат (**П-4**)

Летњи аспект маховине

1. Етил-ацетат (Л-4)

Јесењи аспект маховине

1. Етил-ацетат (Ј-4)

Оптимално време екстракције је утврђено праћењем промене максимума апсорбанце етанолног екстракта маховине сакупљене у пролеће (таласна дужина 673 nm) током екстракције у Сокслет апаратури на свака 2 h помоћу UV (енгл. ultraviolet) спектрофотометра (UV–Vis 1700, Shimadzu, Јапан). Вредност апсорбанце достигла је максимум након 10 сати, због чега је овај период коришћен као оптимално трајање екстракције. Након екстракције, добијени екстракти су упарени под сниженим притиском, уз помоћ Buchi R-210 Rotavapor System вакуум упаривача (Marshall Scientific) на 40 °C и чувани у мраку на 4 °C до употребе.

3.5 Принос екстракције

За сваки узорак измерена је маса сувог екстракта помоћу аналитичке ваге (Radwag wagi elektroniczne, Пољска), а принос екстракције је одређен на основу следеће једначине и представљен у процентима:

$$\text{Принос (\%)} = [m_1/m_2] \times 100$$

где m_1 представља масу сувог екстракта, а m_2 масу суве маховине коришћене за екстракцију.

3.6 Хемијска карактеризација екстраката

Екстракти маховине *H. cupressiforme* сакупљене током пролећа, лета и јесени су хемијски окарактерисани спектрофотометријским техникама: одређивањем укупног садржаја фенола, фенолних киселина, флавоноида, флавонола, тритерпеноида и кумарина. Хемијска карактеризација екстраката маховине сакупљене током лета извршена је и

помоћу течне хроматографије спрегнуте са масеном спектрометријом (енгл. Liquid chromatography–mass spectrometry, LC-MS).

3.6.1 Одређивање укупног садржаја фенола

Укупан садржај фенолних једињења у испитиваним екстрактима одређен је према претходно утврђеној методи [104] описаној у наставку. У сваки бунарић на микротитарској плочи додато је по 20 μL екстраката концентрације 1 mg/mL и 100 μL 10% раствора Folin–Ciocalteu реагенса. Након инкубације од 6 минута на собној температури, 80 μL 7,5% раствора натријум карбоната (Na_2CO_3) додато је у бунариће. Након тога, инкубација је трајала још 120 минута у мраку, на собној температури. Слепа проба је припремљена тако да садржи све набројане компоненте, а уместо узорка дестиловану воду. За конструисање калибрационе криве уместо екстракта коришћена је гална киселина растворена у дестилованој води у концентрацијама 0,005-0,200 mg/mL. Сва мерења су поновљена четири пута.

Апсорбанца је очитана на 740 nm помоћу читача микротитарских плоча Multiscan Sky Thermo Scientific, Финска. Укупан садржај фенола у узорцима израчунат је из једначине калибрационе криве и представљен је у еквивалентима галне киселине (ЕГК) као mg ЕГК/g сувог екстракта.

3.6.2 Одређивање укупног садржаја фенолних киселина

Укупан садржај фенолних киселина у испитиваним екстрактима одређен је према претходно утврђеној методи [105] са одређеним модификацијама описаним у наставку. У сваки бунарић микротитарске плоче додато је 10 μL екстраката концентрације 1 mg/mL, 20 μL Арновог реагенса (10% w/v натријум-молибдат и 10% w/v натријум-нитрит), 20 μL 0,1 М хлороводоничне киселине, 20 μL 1 М натријум хидроксида и 100 μL дестиловане воде. Слепа проба је припремљена тако да садржи све набројане компоненте, а уместо узорка је додата иста запремина 50% етанола. За конструисање калибрационе криве уместо екстракта коришћена је кофеинска киселина растворена у 50% етанолу у концентрацијама од 0,0078-1 mg/mL. Сва мерења су поновљена четири пута.

Апсорбанца је очитана на 490 nm одмах након додавања свих компоненти, помоћу читача микротитарских плоча Multiscan Sky Thermo Scientific, Финска. Укупан садржај

фенолних киселина у узорцима израчунат је из једначине калибрационе криве и представљен у еквивалентима кофеинске киселине (ЕКК) као mg ЕКК/g сувог екстракта.

3.6.3 Одређивање укупног садржаја флавоноида

Укупан садржај флавоноида у испитиваним екстрактима одређен је према процедури описаној у тексту [106]. У сваки бунарић микротитарске плоче додато је 50 μL екстракта концентрације 1 mg/mL, 205 μL 80% етанола, 5 μL 10% алуминијум нитрата нонахидрата, и 5 μL 1 М раствора калијум ацетата, а инкубација на собној температури је трајала 40 минута. Слепа проба је припремљена тако да садржи све набројане компоненте, а уместо узорка је додата иста запремина 96% етанола. За конструисање калибрационе криве уместо екстракта је коришћен кверцетин растворен у 96% етанолу у концентрацијама 0,005-0,200 mg/mL. Сва мерења су поновљена четири пута.

Апсорбанца је очитана на 415 nm помоћу читача микротитарских плоча Multiscan Sky Thermo Scientific, Финска. Садржај флавоноида се израчунава из једначине калибрационе криве и изражава се у еквивалентима кверцетина (ЕК) као mg ЕК/g сувог екстракта.

3.6.4 Одређивање укупног садржаја флавонола

Укупан садржај флавонола у испитиваним екстрактима одређен је према методи описаној у даљем тексту са одређеним модификацијама [105]. У сваки бунарић микротитарске плоче додато је 40 μL екстракта концентрације 1 mg/mL растворених у 100% метанолу, 40 μL метанолног раствора алуминијум хлорида (20 mg/mL) и 120 μL метанолног раствора натријум ацетата (50 mg/mL), а инкубација ових компоненти на собној температури је трајала 150 минута. Слепа проба је припремљена тако да садржи све набројане компоненте, а уместо узорка је додата иста запремина 100% метанола. За конструисање калибрационе криве уместо екстракта коришћен је кверцетин растворен у 100% метанолу у концентрацијама од 0,0078-1 mg/mL. Сва мерења су поновљена четири пута.

Апсорбанца је очитана на 440 nm помоћу читача микротитарских плоча Multiscan Sky Thermo Scientific, Финска. Укупан садржај флавонола у узорцима израчунат је из

једначине калибрационе криве и представљен у еквивалентима кверцетина (ЕК) као mg ЕК/g сувог екстракта.

3.6.5 Одређивање укупног садржаја тритерпеноида

Укупан садржај тритерпеноида у испитиваним екстрактима одређен је према методи описаној у даљем тексту [107]. У сваки бунарић микротитарске плоче додато је 10 μL екстракта концентрације 1 mg/mL растворених у 100% метанолу, 15 μL раствора ванилин-глицеролне киселине (5% w/v) и 50 μL раствора перхлорне киселине. Микротитарска плоча је затим загрејана на 60 °C у трајању од 45 минута, па охлађена на леду до собне температуре. Пре мерења апсорбанце, у сваки бунарић је додато 225 μL глицеролне киселине. Слепа проба је припремљена тако да садржи све набројане компоненте, а уместо узорка је додата иста запремина 100% метанола. За конструисање калибрационе криве уместо екстракта коришћена је урсолна киселина растворена у 100% метанолу у концентрацијама од 0,0078-1 mg/mL. Сва мерења су поновљена три пута.

Апсорбанца је мерена на 548 nm, коришћењем читача микротитарских плоча Multiscan Sky Thermo Scientific, Финска. Укупан садржај тритерпеноида у узорцима израчунат је из једначине калибрационе криве и представљен је у еквивалентима урсолне киселине (ЕУК) као mg ЕУК/g сувог екстракта.

3.6.6 Одређивање укупног садржаја кумарина

Метода за одређивање укупног садржаја кумарина је рађена према претходно описаној процедури, са одређеним модификацијама [108]. У сваки бунарић микротитарске плоче додато је 2 μL екстракта концентрације 1 mg/mL растворених у 80% метанолу, 8 μL дестиловане воде, 2 μL раствора олово ацетата (5% w/v), 28 μL дестиловане воде и 160 μL 0,1 М хлороводоничне киселине. Инкубација реакционе смеше је трајала 30 минута на собној температури, након чега су измерене апсорбанце. Слепа проба је припремљена тако да садржи све набројане компоненте, а уместо узорка је додата иста запремина 80% метанола. За конструисање калибрационе криве уместо екстракта коришћен је кумарин у концентрацијама од 0,005-1 mg/mL растворен у 80% метанолу. Сва мерења су поновљена три пута.

Апсорбанца је мерена на 320 nm, коришћењем читача микротитарских плоча Multiscan Sky Thermo Scientific, Финска. Укупан садржај кумарина у узорцима израчунат је из једначине калибрационе криве и представљен је у еквивалентима кумарина (ЕКм) као mg ЕКм/g сувог екстракта.

3.6.7 Течна хроматографија-масена спектрометрија

Раздвајање једињења од интереса извршено је уз помоћ Dionex Ultimate 3000 UHPLC (енгл. Ultra-High-Performance Liquid Chromatography) система опремљеног детектором диодног низа, који је повезан на TSQ Quantum Access Max троструки квадруполни масени спектрометар опремљен загрејаном електроспреј јонизационом сондом (HESI-II, ThermoFisher Scientific, Бремен, Немачка) у режиму негативне јонизације.

Synpronis C18 колона (100 × 2,1 mm, величина честица 1,7 μm, 40 °C) је коришћена за раздвајање једињења: брзина протока је подешена на 0,3 mL по минути, а мобилна фаза се састојала од (А) воде и 0,1% мравље киселине и (Б) ацетонитрила. Програм линеарног градијента је коришћен на следећи начин; 0,0-1,0 минута 5% Б, 1,0-14,0 минута од 5% до 95% (Б), 14,0-14,1 минута од 95% до 5% (Б) и 5% (Б) током 6 минута.

Параметри извора јона и други подаци неопходни за квантификацију били су као што је претходно описано у литератури [109]. За контролу инструмента као и за прикупљање и анализу података коришћен је софтвер ThermoFisher Scientific Xcalibur софтвер (верзија 2.1).

3.7 Одређивање антиоксидативне активности екстракта

Антиоксидативна активност одређена је применом 3 теста: ДППХ тест, одређивање укупног редукционог потенцијала и инхибиција обезбојавања β-каротена. Ови *in vitro* антиоксидативни тестови су засновани на различитим хемијским принципима и пружају веома корисне информације о интеракцијама РВК са узорком. Принципи на којима се заснивају ови тестови су испитивање „хватачке“ активности узорка према (релативно) стабилном извору слободних радикала, затим способност узорка да редукује јоне метала, или да од оксидације заштити циљни (макро)молекул изложен оксидативном стресу.

3.7.1 ДППХ тест

У ДППХ тесту прати се капацитет антиоксиданата да редукују стабилни ДППХ радикал до дифенилпикрил хидразина. Ова реакција се прати колориметријски, променом боје ДППХ раствора од тамно љубичасте (ДППХ радикал) до жуте (редуковани ДППХ), при чему је редукциона способност испитиване супстанце већа што је већи степен обезбојавања раствора [110]. Овај тест се често користи за процену антиоксидативног капацитета, односно способности уклањања слободних радикала од стране различитих биљних екстраката.

Тест се изводи према раније описаној процедури са одређеним модификацијама [111]. У сваки бунарић микротитарске плоче додаје се по 20 μL екстракта одговарајуће концентрације (1000, 500, 100, 50 и 10 $\mu\text{g/mL}$) и 180 μL раствора ДППХ концентрације 40 $\mu\text{g/mL}$, свеже припремљеног непосредно пре експеримента. За слепу пробу се уместо узорка користи иста запремина 100% метанола, а као позитивне контроле, односно стандардне супстанце користе се БХА, БХТ и аскорбинска киселина у истим концентрацијама као узорци. Слепа проба, узорци и стандарди су тестирани у трипликату. Апсорбанца је измерена на 517 nm након 30 минута инкубације на собној температури у мраку. За читавање апсорбанци коришћен је читач микротитарских плоча Multiscan Sky Thermo Scientific, Финска, а инхибиција ДППХ радикала у присуству тестираних екстраката је израчуната коришћењем следеће формуле и изражена у процентима:

$$\text{Инхибиција ДППХ радикала (\%)} = [\text{Асп} - \text{Ауз}/\text{Асп}] \times 100$$

где је Асп – апсорбанца слепе пробе (која не садржи узорак), Ауз је апсорбанца узорака различитих концентрација. Резултати су представљени као средња вредност процента инхибиције ДППХ радикала \pm стандардна грешка.

3.7.2 Укупни редукциони потенцијал

У овом тесту прати се редукциона моћ испитиваног узорка, на основу његове способности да редукује жути Fe^{3+} /ферицијанид (фери) комплекс у Fe^{2+} (феро) облик. Жута боја раствора у присуству антиоксиданата мења се у различите нијансе зелене или

плаве, у зависности од редукционе моћи супстанце која се истражује, а интензитет настале плаво-зелене боје мери се спектрофотометријски.

Укупни редукциони потенцијал екстраката одређен је према претходно развијеној методи [112, 113] са одређеним модификацијама. У сваки бунарић микротитарске плоче додаје се по 20 μL екстракта одговарајуће концентрације (1000, 500, 100, 50 и 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 40 μL натријум фосфатног пуфера (0,2 М, рН 6,6) и 40 μL 1% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Смеша је инкубирана 20 мин на 45 $^\circ\text{C}$, након чега се додаје 40 μL трихлорсирћетне киселине (10%, w/v), 40 μL дестиловане воде и 8 μL 0,1% гвожђе(III) хлорида. Као слепа проба користи се одговарајући растварач уместо узорка, а као позитивне контроле БХА, БХТ и аскорбинска киселина у истим концентрацијама као узорци. Слепа проба, узорци и стандарди су тестирани у трипликату. Након инкубације од 10 минута на собној температури, апсорбанца је мерена на 700 nm, уз помоћ читача микротитарских плоча Multiscan Sky Thermo Scientific, Финска. Укупни редукциони потенцијал узорака је израчунат помоћу калибрационе криве аскорбинске киселине (0-1 mg/L) и изражен као μmol еквивалената аскорбинске киселине (ЕАК) по граму сувог екстракта (μmol ЕАК/g сувог екстракта). Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна грешка.

3.7.3 Инхибиција обезбојавања β -каротена

Принцип овог теста заснива се на одређивању способности антиоксиданата да инхибирају обезбојавање раствора β -каротена продуктима који настају током оксидације линолне киселине [114]. Наиме, повећањем температуре у реакционој смеси долази до формирања радикала линолне киселине који могу да прекину π -коњуговане двоструке везе β -каротена, што доводи до његовог обезбојавања. Међутим, када се у смешу дода узорак који испитујемо, и уколико узорак има антиоксидативни потенцијал, доћи ће до спречавања, односно успоравања обезбојавања β -каротена.

Тест инхибиције обезбојавања β -каротена изведен је према модификованој процедури [115]. Емулзија је припремљена додавањем линолне киселине (6,25 μL) и Tween-а 40 (50 mg) у раствор β -каротена у хлороформу (125 μL , 4 mg/mL). Затим је у припремљену емулзију додато још 125 μL хлороформа. Хлороформ је уклоњен помоћу вакуум упаривача (Buchi rotavapor R-114, Marshall Scientific, САД) на 40 $^\circ\text{C}$, након чега је

додато 25 mL дестиловане воде, уз снажно мућкање. Раствори екстраката маховине (концентрације 1000, 500, 100, 50 и 10 $\mu\text{g/mL}$) и стандарда аскорбинске киселине у истим концентрацијама припремљени су у одговарајућим растварачима. У сваком бунарићу микротитарске плоче помешано је 200 μL емулзије и 28 μL испитиване супстанце (екстракти, стандарди или 100% метанол – као слепа проба). Слепа проба, узорци и стандард су тестирани у трипликату. Апсорбанца је измерена одмах (0 минута) и након 2 h инкубације (120 минута) на 490 nm, уз помоћ читача микротитарских плоча Multiscan Sky Thermo Scientific, Финска. Антиоксидативна активност узорака је процењена на основу инхибиције обезбојавања β -каротена коришћењем следеће једначине:

$$\text{Инхибиција обезбојавања } \beta\text{-каротена (\%)} = [(A_{uz120} - A_{sp120}) / (A_{sp0} - A_{sp120})] \times 100$$

где A_{uz120} и A_{sp120} представљају апсорбанце измерене после 120 минута за екстракте (A_{uz}) и слепу пробу (A_{sp}), док A_{sp0} представља апсорбанцу слепе пробе одмах након додавања свих реакционих компоненти (0 минута). Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна грешка.

3.8 Одређивање антидијабетичне активности екстраката

У склопу антидијабетичне активности одређена је инхибиторна активност екстраката према ензимима који хидролизују угљене хидрате, α -амилази и α -глукозидази. Инхибирањем ових ензима смањује се постпрандијална хипергликемија и контролише ниво шећера у крви.

3.8.1 Инхибиција α -амилазе

У тесту инхибиције ензима α -амилазе, уколико испитивани узорци поседују инхибиторну активност према ензиму, долази до заустављања хидролизе скроба до малтозе од стране α -амилазе, а све то се може пратити колориметријски. Наиме, у реакциону смешу се, поред ензима и супстрата, као индикатор додаје Луголов раствор (јод/калијум јодид) који са скробом гради комплекс тамноплаве боје. Дакле, што је јача инхибиција ензима од стране узорка, настала реакциона смеша ће имати тамнију боју, док

ће реакциона смеша која садржи узорак са слабијом способности бити слабије обојена након додавања Луголовог раствора.

Инхибиција α -амилазе одређена је уз помоћ модификоване методе описане у наставку [116]. Укратко, 25 μL одговарајућих разблажења екстраката (концентрације 1000, 500, 100, 50 и 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) помешано је са 50 μL раствора ензима α -амилазе концентрације 0,5 mg/mL . Раствори екстраката и ензима су припремљени у натријум фосфатном пуферу (0,1 М, рН 6,8 са 6 mM натријум хлоридом). После 10 минута пре-инкубације на 37 $^{\circ}\text{C}$, додато је 50 μL 0,2% скроба раствореног у фосфатном пуферу, а инкубација је настављена још 10 минута на 37 $^{\circ}\text{C}$. Након тога, додато је 25 μL 1 М хлороводоничне киселине да би се реакција прекинула, а за визуализацију је додато 100 μL Луголовог раствора. Акарбоза је коришћена као позитивна контрола (стандард). Контрола обојености узорака (Б) је садржала пуфер уместо ензима, скроба и Луголовог раствора. Апсорбанца је мерена на 630 nm , уз помоћ читача микротитарских плоча Multiscan Sky Thermo Scientific, Финска. Процент инхибиције активности ензима α -амилазе је израчунат према следећој једначини:

$$\text{Инхибиција } \alpha\text{-амилазе (\%)} = [(A_{\text{уз}} - B) - A_{\text{к1}}]/A_{\text{к2}} \times 100$$

где $A_{\text{уз}}$ представља апсорбанцу реакционе смеше са узорцима – екстрактима, B представља контролу обојености узорака, $A_{\text{к1}}$ је апсорбанца контроле ензима (садржи пуфер уместо узорка), а $A_{\text{к2}}$ је апсорбанца контроле супстрата (садржи пуфер уместо ензима). Резултати су представљени као средња вредност процента инхибиције \pm стандардна грешка.

3.8.2 Инхибиција α -глукозидазе

У тесту инхибиције α -глукозидазе, уколико испитивани узорци поседују инхибиторну активност према ензиму, долази до заустављања хидролизе супстрата $p\text{NPG}$ (p -нитрофенил- β -D-глукопиранозид) до β -D-глукопиранозида и p -нитрофенола. Један од производа хидролизе супстрата, p -нитрофенол, је жуте боје и његова апсорбанца се мери спектрофотометријски. Дакле, што је активност узорака већа, мање ће да настаје p -нитрофенола, боја раствора ће да буде блеђа, а апсорбанца мања. Са друге стране, уколико

узорци имају слабу активност, више ће да настаје *p*-нитрофенола, раствор ће бити жуто обојен, а апсорбанца раствора већа.

Одређивање инхибиције α -глукозидазе је урађено према претходно разрађеној методи [117]. У сваки бунарић на микротитарској плочи додато је 120 μL екстраката (концентрације 1000, 500, 100, 50 и 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) и 20 μL раствора α -глукозидазе (0,5 IU/mL) у калијум фосфатном пуферу (0,1 М, рН 6,8) и све инкубирано 5 минута на 37 °С. Затим је у смешу додато 20 μL 5 mM *p*NPG као супстрата и инкубација је настављена још 20 минута на 37 °С. Реакција је заустављена додавањем 80 μL 0,2 М натријум карбоната раствореног у пуферу, након чега је апсорбанца измерена на 405 nm, уз помоћ читача микротитарских плоча Multiscan Sky Thermo Scientific, Финска. Контрола обојености узорака (Б) садржала је све компоненте осим ензима, уместо кога је додат пуфер. Акарбоза је коришћена као позитивна контрола (стандард). Процент инхибиције активности ензима α -глукозидазе израчунат је према следећој једначини:

$$\text{Инхибиција } \alpha\text{-глукозидазе (\%)} = [\text{Ак} - (\text{Ауз} - \text{Б})] / \text{Ак} \times 100$$

где Ак представља апсорбанцу негативне контроле (садржи пуфер уместо узорка), Ауз представља апсорбанцу реакционе смеше са узорцима – екстрактима, док Б представља контролу обојености узорака. Резултати су представљени као средња вредност процента инхибиције \pm стандардна грешка.

3.9 Одређивање биолошке активности екстраката

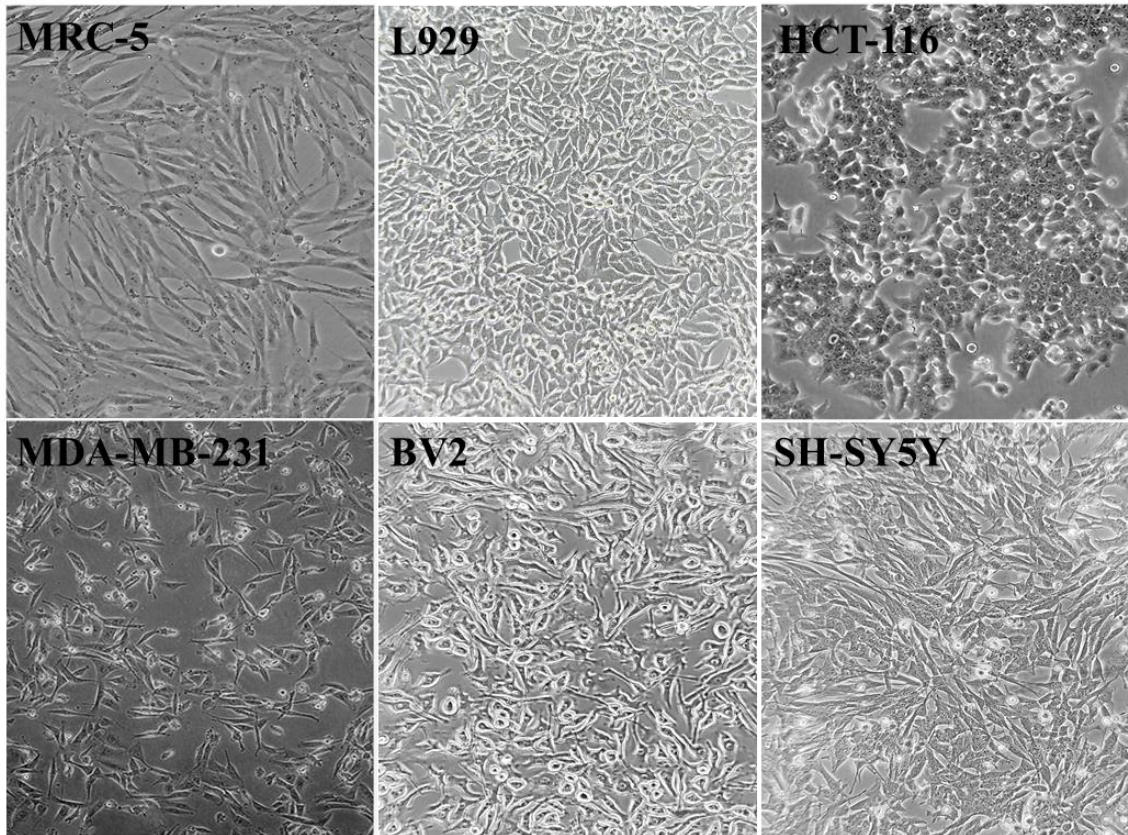
Биолошка активност екстраката маховине *H. cupressiforme* одређена је испитивањем њиховог деловања на метаболичку активност и ефекторске функције (продукција РВК, NO и проинфламаторних цитокина) различитих ћелијских линија. Пре свега, цитокомпатибилност екстраката одређена је користећи MRC-5 ћелије, нормалне фибробласте плућа човека. Даље, антитуморски потенцијал екстраката је испитан на туморским ћелијским линијама НСТ-116 (ћелијска линија хуманог колоректалног карцинома) и MDA-MB-231 (ћелијска линија хуманог аденокарцинома дојке). За испитивање антинеуроинфламаторног потенцијала екстраката коришћене су липополисахаридом или водоник-пероксидом активирани мишје BV2 ћелије микроглије,

као ћелијски модел инфламације, а за одређивање неуропротективног потенцијала SH-SY5Y неурони човека. Метаболичка активност ћелија процењена је МТТ тестом. Продукција РВК одређена је применом NBT теста, а продукција NO индиректно, мерењем нивоа нитрита у супернатантима, Griess-овим тестом. Продукција проинфламаторних цитокина од стране BV2 мишје микроглије измерена је у супернатантима ELISA (енгл. Enzyme-linked immunosorbent assay) тестом, а потенцијал екстраката за побољшање зарастања ране праћен је помоћу такозваног „scratch“ теста.

- MRC-5 ћелијска линија потиче од фибробласта плућа мушког фетуса гестационе доби од 14 недеља. Ове диплоидне ћелије у великој мери се користе у производњи вирусних вакцина, али и у многим другим истраживањима [118].
- L929 ћелијска линија је линија мишјих фибробласта које воде порекло из поткожног везивног ткива миша. Ћелије су адхерентне и имају епителну морфологију [119].
- MDA-MB-231 је ћелијска линија људског аденокарцинома дојке. Једна је од најчешће коришћених ћелијских линија у лабораторијама које се баве истраживањем карцинома дојке. Ћелије су адхерентне и имају епителну морфологију [120].
- HCT-116 је ћелијска линија људског колоректалног карцинома. Ћелије су адхерентне и имају епителну морфологију. Користе се у различитим биомедицинским истраживањима за испитивање пролиферације колоректалног канцера [121].
- BV2 је ћелијска линија пореклом од мишје микроглије, имортализована рекомбинантним ретровирусом. Ћелије су адхерентне и имају епителну морфологију. Ова имортализована ћелијска линија има иста својства као и ткивни макрофаги (профил антигена, фагоцитни капацитет, антимикробна активност) [122].
- SH-SY5Y ћелијска линија је изведена из ћелијске линије SK-N-SH неуробластома [123]. Ћелије ове линије се могу трансформисати у различите типове функционалних неурона, а примену су нашле у разним експерименталним студијама: користе се за испитивање неуродегенеративних поремећаја, за анализу

диференцијације и метаболизма неурона, као и за анализу неуротоксичних и неуропротективних активности различитих једињења.

На слици 14 представљена је морфологија свих ћелија коришћених у овој дисертацији.



Слика 14. Морфологија ћелија коришћених у докторској дисертацији.

(Извор: <https://www.atcc.org/products/ccl-171>, MRC-5; <https://www.atcc.org/products/ccl-247> HCT-116; <https://www.atcc.org/products/htb-26> MDA-MB-231; остале, Тања Лунић)

3.9.1 Култивација ћелија

За истраживања су коришћене ћелијске линије из америчке колекције култура (енгл. American Tissue Culture Collection, ATCC) које су чуване на -80°C . Ћелије се одмрзавају темперирањем у воденом купатилу на 37°C . Након одмрзавања, ћелије се пажљиво ресуспендују у 10 mL хранљивог медијума и преносе у тубице за центрифугирање. Ћелије се центрифугирају 5 минута на 1640 обртаја по минути, како би се уклонили сви трагови криопротектанта (ДМСО, диметил сулфоксид). Добијен ћелијски

талог се ресуспендује у комплетном медијуму и пребацује у флашкове. На веће флашкове (T75, 75 cm²) засејава се $1-5 \times 10^6$ ћелија у 10 mL медијума, док се на мање флашкове (T25, 25 cm²) засејава око $6,5 \times 10^5$ ћелија у 5 mL медијума.

Ћелије су гајене у RPMI-1640 (енгл. Roswell Park Memorial Institute) или DMEM 5523 (енгл. Dulbecco's Modified Eagle's Medium) медијуму са 10% FBS (енгл. Fetal Bovine Serum), 1% антибиотика (пеницилин и стрептомицин) и 1% глукозе – што све заједно представља комплетан медијум. Ћелије су инкубирани у флашковима на 37 °C у влажној атмосфери са 5% CO₂ до достизања конфлуентног монослоја (80-90% површине флашка). Након формирања конфлуентног монослоја, ћелије су трипсинизоване и пасажирани поступком описаним у наставку.

3.9.2 Пасажирање ћелија

Ћелије се пасажирани онда када достигну одређену конфлуентност и када покривају одређену површину флашка (око 80-90%). Поступак се ради тако што се из флашка у коме су ћелије узгајане уклони медијум, након чега се додаје PBS (5 mL за T25 флашк, 10 mL за T75 флашк) како би се уклониле мртве ћелије и спречила инхибиција трипсина серумом. Поступак испирања PBS-ом се понавља два пута, након чега се додаје раствор трипсина у PBS-у (2 mL за T25 флашк, 4 mL за T75 флашк) са којим се ћелије инкубирају око 3 минута у инкубатору на 37 °C. Под микроскопом се проверава да ли су се ћелије одлепиле са дна флашка, а уколико нису, инкубација са трипсином се наставља. Након одвајања највећег броја ћелија од дна флашка, додаје се двоструко већа запремина комплетног хранљивог медијума (4 mL за T25 флашк, 8 mL за T75 флашк) како би се трипсин инактивирао. Садржај се пребацује у тубице и центрифугира 5 минута на 1800 обртаја у минути. Супернатант се уклања, а ћелијски талог ресуспендује у 2 mL хранљивог медијума, узастопним увлачењем и избацивањем садржаја пипетом, након чега се узима аликвот за одређивање броја живих ћелија.

3.9.3 Бројање ћелија

Како би се знао тачан број ћелија коришћених у експерименту, ћелије се боје трипан плаво бојом, а потом пребројавају на хемоцитометру, односно комори за бројање ћелија. С обзиром на то да боја трипан плаво не може да прође кроз ћелијску мембрану

ћелије очуваног интегритета, плаво ће бити обојене ћелије које нису живе, док се живе ћелије под микроскопом виде као светли, жућкасти кружићи. Аликвот ћелијске суспензије се разблажује 10 пута бојом трипан плаво (10 μL ћелијске суспензије + 90 μL раствора боје) и око 20 μL ове смеше се наноси на плочицу за бројање ћелија. Под светлосним микроскопом се пребројавају ћелије у 4 квадранта, а број ћелија по милилитру суспензије се израчунава према следећој формули:

$$\text{Број ћелија у 1 mL} = n \times 10^4 \times P$$

где n представља средњу вредност броја ћелија у квадрантима, а P представља разблажење у раствору боје.

У зависности од броја ћелија по mL , праве се одговарајућа разблажења за даље потребе експеримента. Неопходно је споменути и да су, у циљу праћења општег изгледа културе, морфолошких карактеристика ћелија као и потенцијалног присуства бактеријске/гљивичне контаминације, ћелијске културе редовно контролисане на светлосном микроскопу.

3.9.4 Третман ћелија

Одговарајући број конфлуентних ћелија (1×10^4 ћелија по бунарићу за MRC-5, L929, MDA-MB-231 и BV2 ћелије; 2×10^4 за SH-SY5Y неуроне и 5×10^4 ћелија по бунарићу за НСТ-116 ћелије) се поставља у микротитарске плоче са 96 бунарића у 100 μL комплетног медијума. Ћелије се инкубирају током 24 h, након чега се у бунариће са узорцима додаје:

- 50 μL медијума и 50 μL одговарајућег екстракта финалне концентрације 10 $\mu\text{g/mL}$ културе – за MRC-5, L929, MDA-MB-231 и НСТ-116 ћелије
- 50 μL ЛПС-а финалне концентрације 10 $\mu\text{g/mL}$ културе/50 μL H_2O_2 финалне концентрације 30 μM и 50 μL одговарајућег екстракта финалне концентрације 10 $\mu\text{g/mL}$ културе – за BV2 ћелије
- 100 μL одговарајућег супернатанта BV2 ћелија – за SH-SY5Y неуроне

Као контрола се користе ћелије у које се додаје 100 μL медијума по бунарићу (без екстраката или ЛПС-а) и оне се означавају као нетретиране (контролне) ћелије. У

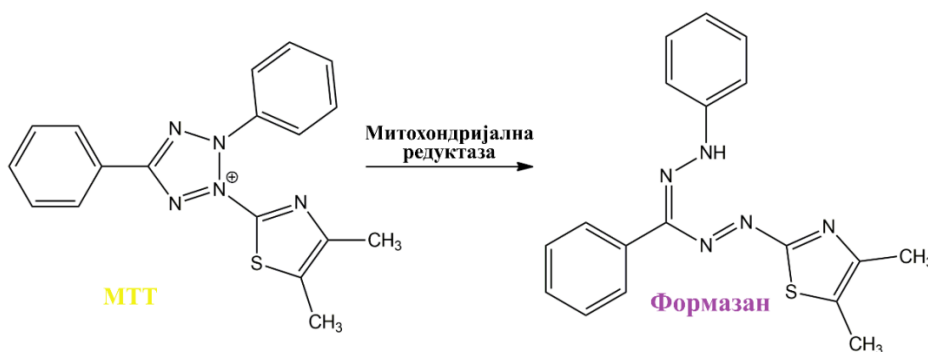
експерименту са BV2 и SH-SY5Y ћелијама постоје и бунарићи са ћелијама у које се додаје 50 μL медијума и 50 μL ЛПС-а финалне концентрације 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ културе, и они служе као контрола ћелијама које су стимулисане ЛПС-ом и третиране екстрактима. Сви експерименти са ћелијама су рађени у кватрипликату, у минимум три понављања, односно три независна експеримента.

3.9.5 Модел трансфера супернатаната BV2 ћелија микроглије на SH-SY5Y неуроне

Како би се тестирали ефекти које солубилни производи ЛПС-ом активирани и екстрактима третиране микроглије имају на SH-SY5Y неуроне коришћен је модел трансфера супернатаната BV2 ћелија. У микротитарске плоче са 96 бунара постављени су SH-SY5Y неурони (2×10^4 ћелија по бунарићу) у комплетном медијуму. Након 24 h инкубације неуронима је додато 100 μL супернатаната ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија третираних екстрактима маховине, а инкубација је настављена још 24 h. Метаболичка активност SH-SY5Y ћелија је затим измерена уз помоћ МТТ теста.

3.9.6 Одређивање метаболичке активности ћелија МТТ тестом

МТТ колориметријски тест се користи за одређивање укупне митохондријске активности, којом се може проценити метаболичка активност ћелија. Принцип на коме овај тест функционише је да се МТТ, жута тетразолијумова со, уз помоћ ензима митохондријалне редуктазе редукује у једињење љубичасте боје – формазан (слика 15). Како се овај ензим налази само у живим ћелијама, количина добијеног формазана, односно интензитет боје, одраз је метаболичке активности живих ћелија и одговара броју живих ћелија [124].

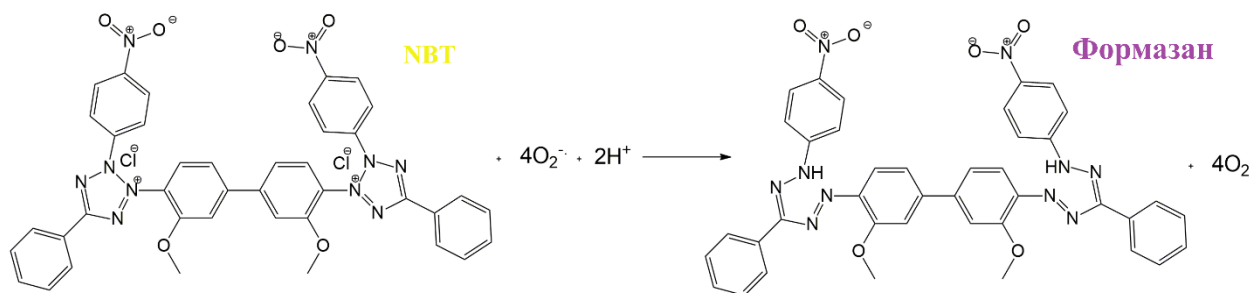


Слика 15. Ензимска редукција МТТ до формазана.

Након завршене инкубације ћелија са екстрактима, 100 μL медијума се одлива, а у сваки бунарић се додаје по 10 μL раствора МТТ концентрације 5 mg/mL . Плоче се затим инкубирају на 37 $^{\circ}\text{C}$ током 3 h, након чега се у сваки бунарић додаје 100 μL 10% СДС-а у 0,1% 1 М НСl како би се растворили настали кристали формазана. Редукција МТТ до формазана, коју врше само метаболички активне ћелије, прати се спектрофотометријски, мерењем апсорбанце раствора на таласној дужини од 540 nm. За мерење је коришћен аутоматски читач апсорбанци за микротитарске плоче (LKB 5060-006, LKB Instruments, Аустрија). Резултати су приказани као проценат метаболички активних ћелија у односу на нетретиране (контролне) ћелије, којима је дата вредност од 100%.

3.9.7 Одређивање продукције реактивних врста кисеоника NBT тестом

NBT тест се користи за одређивање продукције РВК као што су супероксид-анјон радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), хидроксил радикал (HO^{\cdot}) и водоник-пероксид (H_2O_2) од стране ћелија. РВК настају у митохондријама као међупроизвод нормалног метаболизма кисеоника, веома су нестабилне и реактивне. Принцип овог теста је да се жуто обојена со NBT редукује од стране РВК до формазана који је љубичасте боје (слика 16). Количина добијеног формазана, односно интензитет боје, одговара количини произведених РВК од стране ћелија [125].



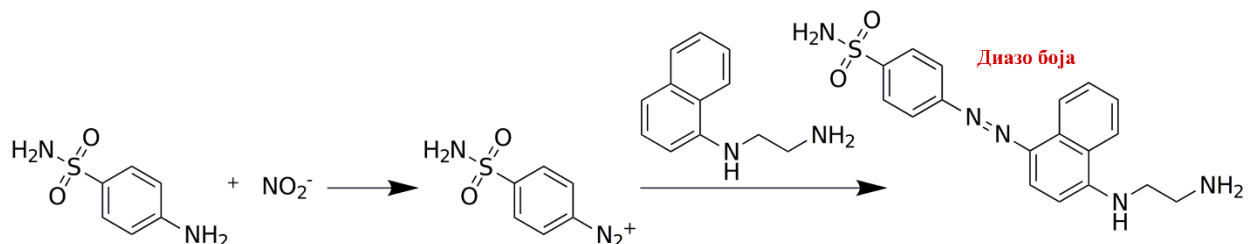
Слика 16. Редукција NBT до формазана.

Након завршене инкубације ћелија са екстрактима, 100 μL медијума се одлива, а у сваки бунарић се додаје по 10 μL раствора NBT концентрације 5 mg/mL . Плоче се затим инкубирају на 37 $^{\circ}\text{C}$ током 3 h, након чега се у сваки бунарић додаје 100 μL 10% СДС-а у 0,1% 1 М НСl како би се растворили настали кристали формазана. Редукција NBT до

формаза, коју врше РВК, прати се спектрофотометријски, мерењем апсорбанце раствора на таласној дужини од 540 nm. За мерење је коришћен аутоматски читач апсорбанци за микротитарске плоче (LKB 5060-006, LKB Instruments, Аустрија). Резултати су приказани као индекс NBT у односу на нетретиране (контролне) ћелије, којима је вредност индекса једнака 1.

3.9.8 Одређивање продукције нитрита Griess-овим тестом

Један од најважнијих сигналних молекула у организму, NO, има кључну улогу у многим физиолошким и патолошким процесима, међу којима је и инфламација. У овом тесту примењује се Griess-ова реакција која се заснива на мерењу неорганског нитрита, као крајњег продукта оксидације краткоживећег NO. Компоненте Griess-овог реагенса су *N*-1-нафтилетилендиамин-дихидрохлорид растворен у води (реагенс А) и сулфаниламид растворен у 5% фосфорној киселини (реагенс Б). Реагенси А и Б се мешају у односу 1:1 непосредно пре додавања у плочу. Након додавања реагенса у бунариће микротитарске плоче са медијумом у коме су ћелије култивисане долази до формирања диазонијум соли (диазо боје) ако у узорку има нитритног јона (слика 17). Интензитет добијене црвене боје је сразмеран концентрацији нитрита у узорку, а индиректно концентрацији NO продукованог од стране испитиваних ћелија [126].



Слика 17. Принцип Griess-ове реакције.

Након завршене инкубације ћелија са екстрактима, 50 μ L медијума у коме су ћелије култивисане се пребацује у нову микротитарску плочу, а затим се у сваки бунарић додаје 50 μ L свеже припремљеног Griess-овог реагенса. Компоненте се инкубирају у мраку 10 минута на собној температури, након чега се мери интензитет растворене боје на таласној дужини од 540 nm. За мерење је коришћен аутоматски читач апсорбанци за микротитарске

плоче (LKB 5060-006, LKB Instruments, Аустрија). Уз помоћ претходно конструисане стандардне праве (опсег концентрација нитрита 1,56-100 μM) израчунава се концентрација NO, на основу једначине праве. Као контрола се користе ћелије које нису третиране екстрактима. Добијена концентрација NO се изражава у μM .

3.9.9 Одређивање продукције цитокина TNF- α и IL-6 ELISA тестом

Концентрација антигена од интереса у узорку (медијуму или ћелијском лизату) може да се одреди и помоћу ензимског имуносорбентног теста (ELISA). У овом тесту, антиген се детектује применом два антитела која су специфична за различите епитопе истог антигена. Помоћу једног антитела облажу се бунарићи микротитарске плоче, који везују антиген од интереса. Ово антитело означава се као хватајуће антитело. Друго антитело које се везује за исти циљни антиген (али други епитоп), коњуговано је са ензимом који омогућава детекцију уз помоћ ензимске реакције и означено је као детектујуће антитело. Концентрације антитела и супстрата за ензимску реакцију, као и време инкубације су одређени оптимизацијом протокола, на узорцима припремљеним за тестирање опсега детекције овом методом [127].

Уз помоћ ELISA теста одређени су нивои цитокина TNF- α и IL-6 ослобођених из ЛПС-ом стимулираних и екстрактима третираних BV2 ћелија микроглије. Бунарићи микротитарске плоче су обложени хватајућим антителима (100 μL по бунару) разблаженим у односу 1:125 у PBS-у и инкубирани преко ноћи на +4 $^{\circ}\text{C}$. Након облагања, бунари су испрани 3 пута пуфером за испирање (200 μL 0,05% Tween 20/PBS). Неспецифична места везивања блокирана су додавањем 200 μL раствора за засићење (1% BSA/PBS), а инкубација на собној температури је трајала 1 h. Бунари су поново испрани пуфером за испирање три пута, након чега је нането 100 μL узорака или стандарда по бунару. Као негативна контрола коришћен је медијум у коме су ћелије гајене (RPMI-1640). Стандард за TNF- α је тестиран прављењем серијских разблажења у опсегу 31,3-2000 pg/mL , док је за IL-6 стандард био у опсегу 15,6-1000 pg/mL . Инкубација узорака и стандарда је трајала 2 h на собној температури након чега су бунари три пута испрани. Након тога се додаје 100 μL антитела коњугованог са биотином (разблаженог у односу 1:60) у 1% BSA/PBS и инкубира 2 h на собној температури. По завршетку инкубације,

бунари су поново испрани три пута, и у сваки бунар је додато по 100 μL СтрептАвидин- HRP (разблаженог у односу 1:40) у 1% BSA/PBS , који има висок афинитет везивања за биотин. Након 20 минута инкубације на собној температури, вишак невезаног авидина уклоњен је испирањем. Ензимска реакција започиње додавањем 100 μL плаво обојеног раствора ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) по бунару, а инкубација се врши у мраку док се не развије боја (10-20 минута). У реакцији настаје плаво обојени производ, а реакција се прекида додавањем 50 μL 1 М H_2SO_4 по бунару. По прекиду реакције боја прелази из плаве у жуту, а апсорбанца се мери на таласној дужини од 450 nm на спектрофотометру (LKB 5060-006, LKB Instruments, Аустрија). Добијене концентрације цитокина се изражавају у pg/mL .

3.10 Одређивање антинеуродегенеративне активности екстраката

У склопу антинеуродегенеративне активности одређена је инхибиторна активност екстраката према ензимима ацетилхолинестерази и тирозинази. Повећана активност ових ензима је повезана са развојем и прогресијом великог броја неуродегенеративних обољења као што су Паркинсонова и Алцхајмерова болест. Стога, њихова инхибиција представља један од терапеутских приступа на којима се заснивају многи актуелни комерцијални лекови. Међу осталима, екстракти биљака привлаче велику пажњу као природни и нетоксични извори селективних инхибитора ацетилхолинестеразе и тирозиназе.

3.10.1 Инхибиција ацетилхолинестеразе

Ацетилхолинестераза је ензим који катализује хидролизу неуротрансмитера ацетилхолина у ацетат и холин. Иако је неопходан за правилно функционисање нервног система, повећана активност овог ензима може довести до проблема у развоју нервног система, а повезана је и са губитком памћења које је једно од главних обележја Алцхајмерове болести [128]. Тест инхибиције ензима ацетилхолинестеразе заснива се на колориметријској реакцији у којој ензим хидролизује супстрат ацетилхолин јодид, при чему настаје холин. Холин затим реагује са другом компонентом која се додаје у реакциону смешу (ДТНБ), при чему настаје жуто обојени 5-тио-2-нитробензоат. Дакле, што је већа активност ензима (што је ензим мање инхибиран), настала жута боја

реакционе смеше ће бити интензивнија. Са друге стране, већа инхибиција ензима од стране узорака, довешће до настанка слабије обојеног раствора.

Испитивање инхибиције ацетилхолинестеразе урађено је према модификованој процедури [129] описаној у наставку. У сваки бунарић микротитарске плоче додато је 140 μL натријум фосфатног пуфера (0,1 М, рН 7,0), 20 μL ДТНБ-а, 20 μL екстраката растворених у пуферу који садржи 5% ДМСО (концентрације 1000, 500, 100, 50 и 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) и 20 μL раствора ацетилхолинестеразе (5 IU/mL) у Трис-НСI пуферу (20 mM, рН 7,5). Негативна контрола уместо узорка садржала је натријум фосфатни пуфер, а контрола обојености узорака (Б) садржала је све компоненте осим ензима, уместо кога је додат пуфер. Након инкубације од 15 минута на 25 °С, колориметријска реакција је започета додавањем 10 μL ацетилхолин јодида. Апсорбанца је измерена на таласној дужини од 412 nm, уз помоћ читача микротитарских плоча Multiscan Sky Thermo Scientific, Финска. Галантамин је коришћен као позитивна контрола (стандард). Процент инхибиције ензима ацетилхолинестеразе одређен је помоћу следеће формуле:

$$\text{Инхибиција ацетилхолинестеразе (\%)} = [\text{Ак} - (\text{Ауз} - \text{Б})/\text{Ак}] \times 100$$

где Ак представља апсорбанцу негативне контроле, док Ауз представља апсорбанцу реакционе смеше са узорцима – екстрактима. Резултати су представљени као средња вредност процента инхибиције \pm стандардна грешка.

3.10.2 Инхибиција тирозиназе

Тирозиназа је ензим који је, између осталог, укључен у формирање неуромеланина у ЦНС-у, а како је акумулација неуромеланина повезана са оштећењем неурона уоченим код Паркинсонове болести, инхибиција ензима је од великог значаја у терапији ове болести. Тест инхибиције тирозиназе заснива се на колориметријској реакцији у којој ензим, захваљујући својој дифенолазној активности, оксидује супстрат L-DOPA, при чему настаје L-допакинон, који након циклизације прелази у L-допахром, а овај метаболит полако, кроз серију неензимских реакција прелази у меланин, односно неуромеланин [130]. Настајање L-допахрома прати се спектрофотометријски, при чему долази до повећања апсорбанце на 475 nm. Дакле, што је ензим активнији, односно што је мање инхибиран, већа ће бити апсорбанца раствора на праћеној таласној дужини. Са друге

стране, већа инхибиција ензима од стране узорака, довешће до настанка слабије обојеног раствора.

Испитивање инхибиције тирозиназе урађено је према модификованој процедури [131] описаној у наставку. У сваки бунарић микротитарске плоче додато је 80 μL натријум фосфатног пуфера (0,1 М, рН 7), 40 μL раствора тирозиназе (46 IU/L) и 40 μL екстраката (концентрације 1000, 500, 100, 50 и 10 $\mu\text{g/mL}$). После додавања 40 μL L-DOPA у пуферу и инкубације (30 минута, 25 $^{\circ}\text{C}$), апсорбанце су мерене на 475 nm, уз помоћ читача микротитарских плоча Multiscan Sky Thermo Scientific, Финска. Негативна контрола уместо узорка садржала је натријум фосфатни пуфер, а контрола обојености узорака (Б) садржала је све компоненте осим ензима, уместо кога је додат пуфер. Којична киселина је коришћена као позитивна контрола (стандард). Процент инхибиције активности тирозиназе је одређен коришћењем следеће формуле:

$$\text{Инхибиција тирозиназе (\%)} = [\text{Ак} - (\text{Ауз} - \text{Б})/\text{Ак}] \times 100$$

где Ак представља апсорбанцу негативне контроле, Ауз представља апсорбанцу реакционе смеше са узорцима – екстрактима, док Б представља контролу обојености узорака. Резултати су представљени као средња вредност процента инхибиције \pm стандардна грешка.

3.11 Зарастање повреде у једнослоју ћелијске културе

Утицај екстраката маховине *H. cypressiforme* на миграцију мишијих фибробласта L929 анализирана је након навођења огреботине у монослоју ћелија (енгл. scratch assay). Овакав експеримент представља модел за праћење „зарастања ране“ у конфлуентном ћелијском монослоју. Ова метода омогућава анализу покретљивости ћелија у различитим експерименталним условима, као што је третирање различитим једињењима. Огреботина се наноси повлачењем стерилног наставка пипете по дну посуде, на чијој путањи остаје празнина, а зарастање посматра под микроскопом [132]. Анализа огреботина се често користи за тестирање миграције ћелија јер је метода јефтина и једноставна за извођење на адхерентним ћелијама као што су фибробласти, ендотелне и епителне ћелије.

У микротитарске плоче са 24 бунарића додато је 500 μL L929 ћелија у хранљивом медијуму (2×10^5 ћелија по бунарићу). Плоче су инкубиране на 37 °C до формирања конфлуентног монослоја ћелија. Након формирања монослоја, из плоча је уклоњен хранљиви медијум, а сваки бунарић је испран PBS-ом. На монослој ћелија је додато 200 μL хранљивог медијума, а затим су врхом стерилног наставка за микропипету (жути наставак од 200 μL) повучене три праве линије под уравнотеженим нагибом, притиском на подлогу и једнаком брзином повлачења, како би огреботине биле приближно истих димензија, а ивице око огреботине равне. Овако су у бунарићима формиране празне зоне константне ширине које представљају огреботине, а које су овичене конфлуентним ћелијским монослојем. Огреботине су благо испране медијумом (500 μL по бунарићу), након чега је ћелијама додато 500 μL свежег хранљивог медијума без FBS-а, и ти бунарићи су представљали контролне ћелије (К). Екстракти маховине *H. cupressiforme* сакупљене током лета (Л-4) и јесени (Ј-4) су припремљени у хранљивом медијуму без FBS-а, у концентрацији 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (500 μL по бунарићу). Непосредно након формирања огреботине у ћелијском монослоју (0. сат), након 24 h (24. сат) и 48 h (48. сат), ћелије су праћене помоћу светлосног микроскопа (Zeiss, Немачка), на увећању 10 \times , а кадрови су фотографисани помоћу камере Redmi note 10 pro. Истоветност кадрова за снимање у различитим временским тачкама осигурана је обележавањем места на ком је направљена огреботина маркером са доње стране микротитарске плоче. Испитивање је изведено у кватрипликату, а у сваком експерименту процењена је миграција ћелија у три видна поља. Затим се помоћу ImageJ софтвера [133] утврђује просечна ширина повреде (μm) да би се коначно прерачунала стопа миграције ћелија израђена у % [134], према следећој формули:

$$\text{Стопа миграције ћелија (\%)} = [(Л1 - Л2)/Л1] \times 100$$

где је Л1 просечна ширина повреде у нултом сату од nanoшења огреботине, а Л2 просечна ширина повреде у циљаном сату од nanoшења огреботине. Вредности су приказане као средње вредности \pm стандардне грешке у односу на контролне, нетретирание ћелије.

3.12 Докинг секундарних метаболита идентификованих у екстрактима на ацетилхолинестеразу и тирозиназу гљиве и човека

Симулације молекулског докинга секундарних метаболита идентификованих у екстрактима маховине *H. cupressiforme* помоћу LS-MS анализе изведене су на ацетилхолинестерази и тирозинази (из гљиве и човека) како би се открили начин и енергије везивања секундарних метаболита за ове ензиме, чиме би се расветлили потенцијални механизми деловања и боље објасниле активности екстраката добијене у *in vitro* тестовима.

3.12.1 Креирање тродимензионалног модела тирозиназе човека

Тродимензионална (3D) структура тирозиназе човека предвиђена је на основу аминокиселинске секвенце која се налази на UniProt серверу (P14679). Хомологно моделовање је изведено коришћењем SWISS-MODEL сервера, а због највеће идентичности са секвенцом тирозиназе човека (43,32%), као шаблон за конструкцију модела је коришћена кристална структура протеина 1 повезаног са хуманом тирозиназом (PDB ID: 5M8L). Јони цинка су задржани у конструисаном моделу тирозиназе човека. Квалитет добијеног хомологног модела додатно је потврђен испитивањем геометрије протеина. За визуелну анализу торзионих углова конструисан је Рамачандранов дијаграм уз помоћ програма PROCHECK [135]. На дијаграму се посматра проценат аминокиселина у највише фаворизованом региону (A, B, L), додатно дозвољеном региону (a, b, l, p), генерички дозвољеном региону (~a,~b,~l,~p) и недозвољеном региону.

3.12.2 Припрема протеина и лиганата

Структуре протеина су преузете у pdb формату из базе података биолошких макромолекула RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org), а када одговарајућа кристална структура није била доступна (тирозидаза човека), конструисан је хомологни модел протеина. Ацетилхолинестераза рибе *Torpedo californica* изабрана је за докинг студију због претходно потврђене хомологије са ацетилхолинестеразом рибе *Electrophorus electricus* [136] која је коришћена у *in vitro* тесту, као и боље резолуције ензима из *T. californica*. Тродимензионална кристална структура ацетилхолинестеразе из *T. californica*

у комплексу са бис(7)-такрином (PDB ID: 2СКМ) је преузета са резолуцијом од 2,15 Å. Кристална структура тирозиназе из гљиве *Agaricus bisporus* у комплексу са инхибитором трополоном (PDB ID: 2Y9X) је преузета са резолуцијом од 2,78 Å, а поступком описаним у претходном поглављу моделована је 3D структура тирозиназе човека. Протеини су припремљени за молекулски докинг уклањањем кокристализованих лиганада, молекула воде и кофактора [137]. За додавање поларних водоника, прилагођавање протонације хистидина (у складу са рН експеримента) и додавање Kollman-ових наелектрисања протеинима коришћен је графички интерфејс ADT (енгл. AutoDockTools) [138].

Структуре секундарних метаболита детектованих у екстрактима (потенцијални лиганди) су преузете из базе података PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) у sdf форматима, а њихове енергије су минимизоване коришћењем UFF (енгл. Universal Force Field) имплементираног у софтверу Авогадро [139]. Gasteiger-ова наелектрисања су додата лигандима уз помоћ ADT графичког интерфејса. Такође, урађен је ре-докинг, односно поновно укотвљавање лиганада из кристалне структуре ацетилхолинестеразе (бис(7)-такрин) и тирозиназе гљиве (трополон), у циљу провере прецизности протокола коришћеног за докинг.

3.12.3 Докинг процедура

Докинг студија рађена је у софтверу AutoDock (верзија 4.2.6) [138] који је опремљен ADT графичким интерфејсом. У оквиру докинг симулације, средиште „box-a“ одређено је координатама аминокиселина у активним местима ензима. За ацетилхолинестеразу ове координате су биле $X = 11,513$, $Y = 67,693$, $Z = 62,518$, за тирозиназу гљиве $X = -10,044$, $Y = -28,706$, $Z = -43,443$, а за тирозиназу човека координате су биле следеће: $X = 36,339$, $Y = 140,689$, $Z = 215,645$. У случају свих ензима коришћен је „box“ величине $60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA}$, у x, y и z правцима, при чему су се тачке налазиле на удаљености од $0,375 \text{ \AA}$. Разматрана је флексибилност лиганада, док је протеин задржао ригидну структуру. Да би се генерисала оријентација лиганада унутар активног места коришћен је LGA (енгл. Lamarckian genetic algorithm), а докинг сваког лиганда према протеину извршен је са 200 итерација. Све добијене конформације су ручно проверене и оне са најнижим енергијама у најбројнијем кластеру (где је то било могуће) су одабране за даљу анализу и представљање у резултатима. Визуализација и анализа резултата докинга

урађене су помоћу ADT и BIOVIA Discovery Studio 2021. У резултатима су представљене вредности Гибсове слободне енергије везивања лиганда (ΔG), константа инхибиције (K_i) као и ефикасност лиганда. Ефикасност лиганда представља меру енергије везивања по атому лиганда, а рачуна се као однос Гибсове слободне енергије везивања и броја „тешких“ атома (који нису водоник) једињења.

Пре докинга секундарних метаболита од интереса, протокол је валидиран поновним укотвљавањем лиганда из кристалних структура ацетилхолинестеразе и тирозиназе гљиве, помоћу претходно описаног протокола. Израчуната је вредност корена средњег квадрата одступања – RMSD свих тешких атома између кристалне и добијене конформације лиганда.

3.13 Обрада и приказ података

Статистичка анализа резултата урађена је у SPSS (engl. Statistical Package for the Social Sciences) програму коришћењем Т-теста. Сва мерења су обављена најмање у три понављања по експерименту (три независна експеримента), а резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна грешка. Минимална вредност вероватноће узета као статистички значајна је $p < 0,05$.

4 РЕЗУЛТАТИ

У овој докторској дисертацији извршена је хемијска карактеризација различитих екстраката маховине *H. cupressiforme* сакупљене током пролећа (П), лета (Л) и јесени (Ј), па је потом испитан и њихов имуномодулаторни потенцијал. Применом различитих *in vitro* метода одређене су антиоксидативна, антидијабетична, антитуморска, антинеуроинфламаторна, антинеуродегенеративна и неуропротективна активност екстраката, као и њихов утицај на миграцију ћелија у моделу зарастања рана. На основу хемијског састава и испољених биолошких активности екстраката, дефинисан је најпотентнији растварач за екстракцију маховине *H. cupressiforme*, као и најбоља варијација међу екстрактима у зависности од годишњег доба. Применом *in silico* анализа испитане су интеракције и одређен начин везивања секундарних метаболита идентификованих у екстрактима испитиваних маховина са протеинима од интереса, чиме су детаљније испитани испољени ефекти.

4.1 Екстракција маховине

Екстракција је урађена употребом Сокслет апаратуре. Како би се одредило оптимално време екстракције, апсорбанца етанолног екстракта маховине сакупљене на пролеће је током екстракције у Сокслет апаратури мерена на свака 2 h помоћу UV-Vis спектрофотометра. Максимална апсорбанца је измерена након 10 h екстракције, стога је ово време постављено као оптимално за екстракцију и коришћено је за све примењене раствараче и годишња доба у којима су маховине сакупљене (пролеће, лето и јесен). За маховину сакупљену током пролећа коришћена су четири растварача, а за маховине сакупљене током лета и јесени коришћен је растварач који је претходно код пролећног аспекта дефинисан као оптималан на основу хемијских и биолошких испитивања. Након упаравања раствора на вакуум растварачу, принос екстракције је израчунат на основу формуле:

$$\text{Принос (\%)} = [m_1/m_2] \times 100\%$$

где m_1 представља масу сувог екстракта, а m_2 масу суве маховине коришћене за екстракцију.

4.1.1 Пролећни аспект маховине

У табели 4 дате су ознаке екстраката као и приноси добијени након екстракције маховине *H. cupressiforme* сакупљене у пролеће (П) применом различитих растварача. Екстракти маховине сакупљене током пролећа су припремљени употребом растварача различитих поларности, и означени одговарајућим ознакама: вода (П-1), 96% етанол (П-2), смеша вода:етанол (П-3) и етил-ацетат (П-4). Из резултата приказаних у табели 4 може се приметити да је принос екстраката варирао од 0,6% до 26,3% у односу на растварач коришћен за екстракцију. Највећи принос добијен је после екстракције у води (26,3%), затим мешавини воде и етанола (8,0%), етанолу (4,2%) а најмањи принос је добијен када је екстракција рађена коришћењем етил-ацетата као растварача (0,6%).

Табела 4. Ознаке и приноси екстракције за пролећни аспект маховине *H. cupressiforme*.

Ознака	Растварач	Маса суве маховине (g)	Маса сувог екстракта (g)	Принос (%)
П-1	Вода	7,6	2,00	26,3
П-2	Етанол (96%)	10	0,42	4,2
П-3	Смеша вода:етанол (1:1)	10	0,80	8,0
П-4	Етил-ацетат	10	0,06	0,6

4.1.2 Летњи и јесењи аспекти маховине

У табели 5 дате су ознаке екстраката као и приноси добијени након екстракције летњег (Л) и јесењег (Ј) аспекта маховине *H. cupressiforme* етил-ацетатом.

Табела 5. Принос екстракције за летњи и јесењи аспект маховине *H. cupressiforme*.

Ознака	Растварач	Маса суве маховине (g)	Маса сувог екстракта (g)	Принос (%)
Л-4	Етил-ацетат	10	0,12	1,2
Ј-4	Етил-ацетат	10	0,21	2,1

Екстракти маховине сакупљене током лета и јесени су припремљени употребом етил-ацетата као растварача, и означени одговарајућим ознакама: лето (Л-4) и јесен (Ј-4). Из резултата приказаних у табели 4 и 5 може се приметити да је принос екстраката варирао од 0,6% до 2,1% у односу на годишње доба током ког је маховина сакупљена. Највећи принос је добијен након екстракције етил-ацетатом јесењег аспекта (2,1%) у односу на летњи (1,2%) и пролећни (0,6%) аспект маховине *H. cupressiforme*.

4.2 Хемијска карактеризација екстраката

У овој докторској дисертацији испитан је садржај укупних фенола, фенолних киселина, флавоноида, флавонола, тритерпеноида и кумарина у екстрактима концентрације 1 mg/mL. Спектрофотометријско одређивање укупног садржаја одређених класа једињења је извршено у свим испитиваним екстрактима маховине (пролеће, лето и јесен). Такође, у екстрактима маховине сакупљене током пролећа квантификована су различита фенолна једињења уз помоћ LC-MS технике.

4.2.1 Пролећни аспект маховине

У табели 6 приказани су резултати спектрофотометријског одређивања укупног садржаја одређених класа једињења, и то укупног садржаја фенолних једињења (УСФЈ), фенолних киселина (УСФК), флавоноида (УСФ), флавонола (УСФЛ), тритерпеноида (УСТ) и укупног садржаја кумарина (УСК) у испитиваним екстрактима пролећног аспекта маховине *H. cupressiforme*.

Табела 6. Укупни садржај различитих класа секундарних метаболита у екстрактима пролећног аспекта маховине *H. cupressiforme*.

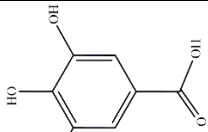
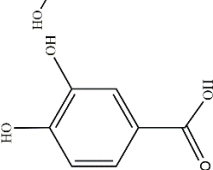
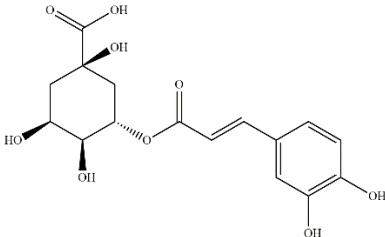
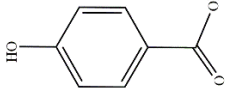
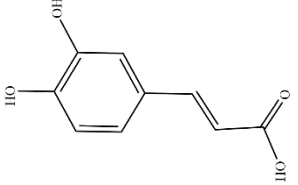
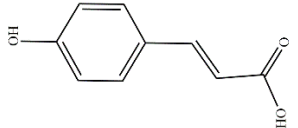
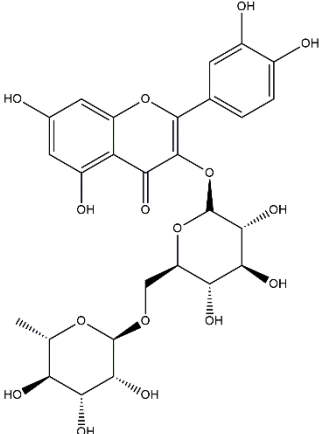
Узорци	УСФЈ (mg ЕГК/g екстракта)	УСФК (mg ЕКК/g екстракта)	УСФ (mg ЕК/g екстракта)	УСФЛ (mg ЕК/g екстракта)	УСТ (mg ЕУК/g екстракта)	УСК (mg ЕКМ/g екстракта)
П-1	18,21 ± 0,73	8,31 ± 3,48	2,04 ± 0,29	нд	43,33 ± 0,86	нд
П-2	6,25 ± 0,48	67,41 ± 6,97	35,00 ± 1,34	нд	88,37 ± 1,55	нд
П-3	7,38 ± 0,34	7,08 ± 2,36	12,43 ± 0,49	нд	75,93 ± 2,97	нд
П-4	15,33 ± 0,95	339,93 ± 14,03	58,86 ± 2,82	14,11 ± 1,33	235,95 ± 4,09	нд

ЕГК – еквиваленти галне киселине; ЕК – еквиваленти кверцетина; ЕКК – еквиваленти кофеинске киселине; ЕКм – еквиваленти кумарина; ЕУК – еквиваленти урсолне киселине; нд – није детектовано; УСК – укупан садржај кумарина; УСТ – укупан садржај тритерпеноида; УСФ – укупан садржај флавоноида; УСФЈ – укупан садржај фенолних једињења; УСФК – укупан садржај фенолних киселина; УСФЛ – укупан садржај флавонола.

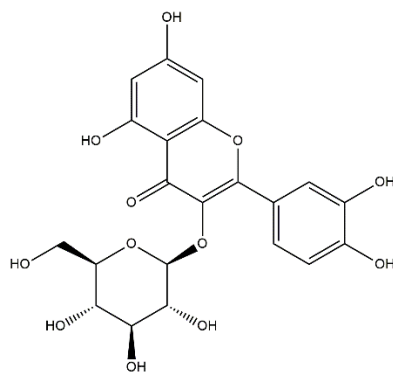
Из табеле 6 може се уочити да је у пролећном екстракту маховине *H. cupressiforme* добијеном уз помоћ етил-ацетата као растварача детектовано највише укупних фенолних киселина (339,93 mg ЕКК/g), флавоноида (58,86 mg ЕК/g), флавонола (14,11 mg ЕК/g), као и тритерпеноида (235,95 mg ЕУК/g) у односу на остале употребљене раствараче и њихове смеше. Једини изузетак представљају укупна фенолна једињења, која су детектована у највећој количини у воденом екстракту маховине (18,21 mg ЕГК/g), а потом у етил-ацетатном екстракту (15,33 mg ЕГК/g). Када су у питању кумарини, из приказаних резултата се може видети да ни у једном екстракту маховине из пролећа није детектована ова класа једињења. На основу резултата спектрофотометријског одређивања различитих класа секундарних метаболита може се закључити да се као најуспешнији растварач за екстракцију кључних биоактивних компоненти показао етил-ацетат, у чијим екстрактима је детектована највећа количина готово свих испитиваних једињења, иако је принос екстракције овим растварачем био најмањи (табела 4).

Поред спектрофотометријског одређивања укупног садржаја различитих класа једињења, пролећни екстракти маховине *H. cupressiforme* добијени употребом различитих растварача и њихових смеша, хемијски су окарактерисани и употребом LC-MS технике. Овом анализом квантификовано је укупно 14 фенолних и флавоноидних једињења у екстрактима маховине, и то шест фенолних киселина: гална киселина, протокатеуинска киселина, 5-*O*-кафеоилхинска киселина, *p*-хидроксибензоева киселина, кофеинска киселина и *p*-кумаринска киселина, и осам флавоноида: кверцетин 3-*O*-рутинозид, кверцетин 3-*O*-глукозид, изорхамнетин 3-*O*-глукозид, ериодиктиол, апигенин, нарингенин, кемпферол и ацететин. Резултати LC-MS анализе пролећног аспекта маховине *H. cupressiforme* приказани су у табели 7.

Табела 7. Фенолне киселине и флавоноиди (mg/100 g екстракта) детектовани LC-MS анализом у екстрактима пролећног аспекта маховине *H. cupressiforme*.

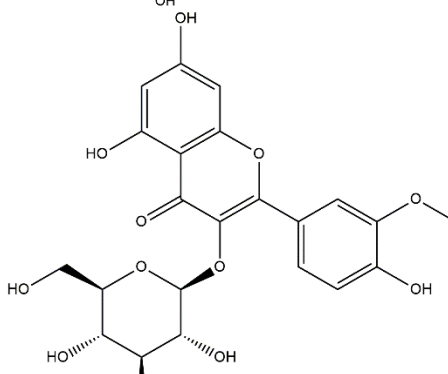
Назив једињења	Структура једињења	П-1	П-2	П-3	П-4
Гална киселина		1,21	0,62	0,70	0,50
Протокатеуинска киселина		3,91	3,75	2,89	2,39
5-О-Кафеоилхинска киселина		0,04	0,14	0,07	0,02
<i>p</i> -Хидроксibenзоева киселина		4,62	4,56	3,17	5,78
Кофеинска киселина		1,10	0,65	0,42	0,13
<i>p</i> -Кумаринска киселина		4,40	2,60	2,33	0,46
Кверцетин 3-О-рутинозид		0,03	0,09	0,06	0,01

Кверцетин 3-*O*-глюкозид



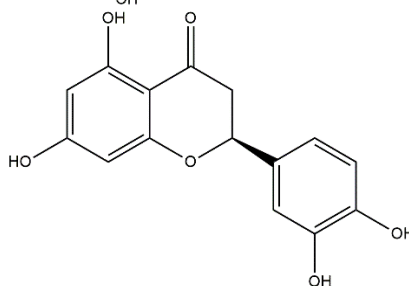
0,04 0,27 0,21 0,02

Изорхамнетин 3-*O*-глюкозид



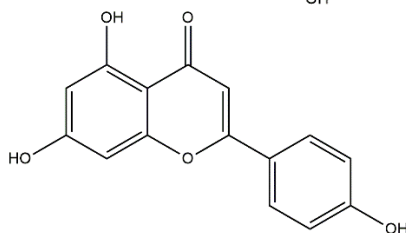
0,04 0,12 0,06 0,02

Ериодиктиол



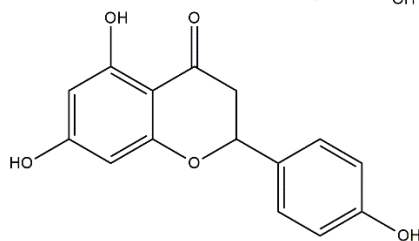
0,07 0,13 0,11 0,05

Апигенин



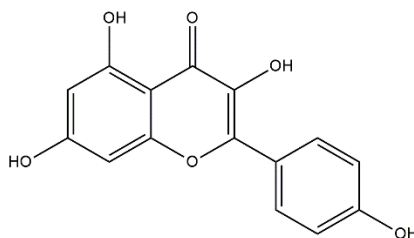
0,11 0,51 0,47 0,11

Нарингенин



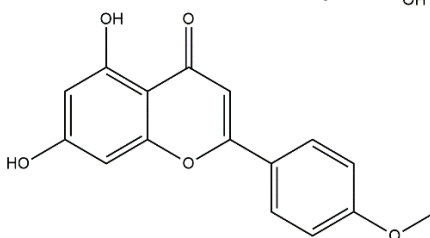
0,08 0,57 0,62 0,12

Кемпферол



0,47 7,35 6,60 0,21

Ацететин



0,02 0,21 0,15 0,09

Резултати из табеле 7 показују да су најзаступљенија једињења у воденом екстракту пролећног аспекта маховине фенолне киселине *p*-хидроксибензоева (4,62 mg/100 g екстракта) и *p*-кумаринска (4,40 mg/100 g екстракта), а затим протокатехуинска (3,91 mg/100 g екстракта), гална (1,21 mg/100 g екстракта) и кофеинска киселина (1,10 mg/100 g екстракта). Хемијски профили етанолног и водено-етанолног екстракта маховине сакупљене у пролеће веома су слични, а највише је било кемпферола, *p*-хидроксибензоеве, протокатехуинске и *p*-кумаринске киселине, и њихова концентрација је била нешто нижа у водено-етанолном екстракту у односу на етанолни екстракт. У етил-ацетатном екстракту највише су биле заступљене *p*-хидроксибензоева (5,78 mg/100 g екстракта) и протокатехуинска киселина (2,39 mg/100 g екстракта), док су гална (0,50 mg/100 g екстракта) и *p*-кумаринска киселина (0,46 mg/100 g екстракта) детектоване у нижим концентрацијама.

На основу резултата из табеле 7 може се закључити да је најзаступљенија фенолна киселина у испитиваним екстрактима *p*-хидроксибензоева киселина које је највише било у етил-ацетатном екстракту, а најмање у водено-етанолном екстракту. Поред *p*-хидроксибензоеве киселине, у екстрактима су највише детектоване протокатехуинска и *p*-кумаринска киселина, и то у највећим концентрацијама у воденом екстракту, а у најнижим концентрацијама у етил-ацетатном екстракту маховине. Испитивани флавоноиди су били мање заступљени у екстрактима у односу на фенолне киселине, и њихове концентрације су генерално биле ниске, са изузетком кемпферола, који је

детектован у вишим концентрацијама у етанолном (7,35 mg/100 g екстракта) и водено-етанолном (6,60 mg/100 g екстракта) екстракту маховине.

4.2.2 Летњи и јесењи аспекти маховине

Резултати спектрофотометријског одређивања укупног садржаја различитих класа једињења за етил-ацетатне екстракте летњег и јесењег аспекта маховине *H. cupressiforme* приказани су у табели 8.

Табела 8. Спектрофотометријско одређивање укупног садржаја различитих класа једињења у етил-ацетатним екстрактима летњег и јесењег аспекта маховине *H. cupressiforme*.

	УСФЈ (mg ЕГК/g екстракта)	УСФК (mg ЕКК/g екстракта)	УСФ (mg ЕК/g екстракта)	УСФЛ (mg ЕК/g екстракта)	УСТ (mg ЕУК/g екстракта)	УСК (mg ЕКм/g екстракта)
Л-4	21,87 ± 1,13	661,70 ± 17,14	108,21 ± 5,04	53,56 ± 3,51	256,44 ± 6,88	нд
Ј-4	15,12 ± 0,85	357,99 ± 7,52	80,39 ± 4,56	37,86 ± 1,24	144,79 ± 1,23	19,05 ± 2,72

ЕГК – еквиваленти галне киселине; ЕК – еквиваленти кверцетина; ЕКК – еквиваленти кофеинске киселине; ЕКм – еквиваленти кумарина; ЕУК – еквиваленти урсолне киселине; нд – није детектовано; УСК – укупан садржај кумарина; УСТ – укупан садржај тритерпеноида; УСФ – укупан садржај флавоноида; УСФЈ – укупан садржај фенолних једињења; УСФК – укупан садржај фенолних киселина; УСФЛ – укупан садржај флавонола.

Из резултата приказаних у табели 8 може се закључити да летњи аспект маховине *H. cupressiforme* добијен употребом етил-ацетата као растварача садржи већу количину свих испитиваних класа једињења у односу на јесењи аспект маховине. Једини изузетак су кумарини, који су у екстракту маховине сакупљене током јесени детектовани (19,05 mg/g екстракта), док у екстракту маховине сакупљене током лета није детектована ова класа једињења.

4.2.3 Утицај годишњег доба на укупни садржај различитих класа једињења

У табели 9 приказано је поређење укупног садржаја различитих класа једињења у етил-ацетатним екстрактима маховине *H. cupressiforme* из различитих годишњих доба (пролеће, лето и јесен).

Табела 9. Поређење укупног садржаја различитих класа једињења у етил-ацетатним екстрактима пролећног, летњег и јесењег аспекта маховине *H. cupressiforme*.

	УСФЈ (mg ЕГК/g екстракта)	УСФК (mg ЕКК/g екстракта)	УСФ (mg ЕК/g екстракта)	УСФЛ (mg ЕК/g екстракта)	УСТ (mg ЕУК/g екстракта)	УСК (mg ЕКм/g екстракта)
П-4	15,33 ± 0,95	339,93 ± 14,03	58,86 ± 2,82	14,11 ± 1,33	235,95 ± 4,09 ^б	нд
Л-4	21,87 ± 1,13 ^{аб}	661,70 ± 17,14 ^{аб}	108,21 ± 5,04 ^{аб}	53,56 ± 3,51 ^{аб}	256,44 ± 6,88 ^б	нд
Ј-4	15,12 ± 0,85	357,99 ± 7,52	80,39 ± 4,56 ^а	37,86 ± 1,24 ^а	144,79 ± 1,23	19,05 ± 2,72 ^{аб}

^аp<0,05 vs. пролеће, ^бp<0,05 vs. лето и ^вp<0,05 vs. јесен; ЕГК – еквиваленти галне киселине; ЕК – еквиваленти кверцетина; ЕКК – еквиваленти кофеинске киселине; ЕКм – еквиваленти кумарина; ЕУК – еквиваленти урсолне киселине; нд – није детектовано; УСК – укупан садржај кумарина; УСТ – укупан садржај тритерпеноида; УСФ – укупан садржај флавоноида; УСФЈ – укупан садржај фенолних једињења; УСФК – укупан садржај фенолних киселина; УСФЛ – укупан садржај флавонола.

Поређењем укупног садржаја различитих класа једињења у етил-ацетатним екстрактима маховине из различитих годишњих доба може се приметити да су највеће концентрације свих испитиваних једињења (феноли, фенолне киселине, флавоноиди, флавоноли и тритерпеноиди) детектовани у екстракту маховине из летње сезоне, при чему су концентрације ових једињења углавном биле статистички значајно више у односу на екстракте маховина из пролећне и јесење сезоне (табела 9). Једини изузеци су били УСК, где су кумарини детектовани само у екстракту маховине из јесени, и УСТ, где је укупан садржај тритерпеноида детектован у екстракту маховине из летње сезоне маховине био статистички значајно већи само у односу на јесењи аспект маховине, али не и пролећни. Поређењем пролећног и јесењег аспекта међу собом, може се закључити да је у екстрактима маховине из пролећне сезоне било статистички значајно више тритерпеноида у односу на јесењи аспект, док је у екстрактима маховине прикупљене у јесен било значајно више флавоноида, флавонола и кумарина у поређењу са маховином из пролећа.

4.3 Антиоксидативна активност

За испитивање антиоксидативне активности екстраката маховине *H. cupressiforme* примењена су три теста која се заснивају на различитим реакционим механизмима: ДППХ тест, укупни редукујући потенцијал и β-каротен/линолна киселина тест, односно тест инхибиције избељивања β-каротена. Антиоксидативна активност испитана је у пет различитих концентрација екстраката: 1000, 500, 100, 50 и 10 μg/mL. Као супстанце са већ дефинисаном антиоксидативном активношћу коришћена су два синтетска антиоксиданта – бутиловани хидрокси-анизол (БХА) и бутиловани хидрокси-толуен (БХТ), и један антиоксидант природног порекла – аскорбинска киселина (АК). Резултати теста инхибиције ДППХ радикала свим испитиваним екстрактима маховине *H. cupressiforme* приказани су у табели 10.

Табела 10. Инхибиција ДППХ радикала екстрактима маховине *H. cupressiforme*.

Узорци	Инхибиција ДППХ радикала (%)				
	1000 μg/mL	500 μg/mL	100 μg/mL	50 μg/mL	10 μg/mL
П-1	19,22 ± 0,85	нд	нд	нд	нд
П-2	нд	нд	нд	нд	нд
П-3	6,08 ± 0,41	нд	нд	нд	нд
П-4	22,80 ± 1,10	4,15 ± 2,02	нд	нд	нд
Л-4	10,45 ± 0,50	3,76 ± 0,61	нд	нд	нд
Ј-4	10,39 ± 0,51	5,63 ± 0,51	нд	нд	нд
АК	88,11 ± 0,06	88,26 ± 0,10	87,91 ± 0,06	87,65 ± 0,15	7,83 ± 0,06
БХА	85,16 ± 0,63	80,03 ± 0,71	29,88 ± 1,27	14,53 ± 0,48	нд
БХТ	84,10 ± 0,15	71,70 ± 0,29	26,42 ± 0,91	12,91 ± 0,65	нд

АК – аскорбинска киселина; БХА – бутиловани хидрокси-анизол; БХТ – бутиловани хидрокси-толуен; нд – није детектовано;

На основу резултата приказаних у табели 10, може се закључити да у тесту инхибиције ДППХ радикала, испитивани екстракти маховине *H. cupressiforme* нису показали значајну активност у поређењу са стандардним антиоксидантима АК, БХА и

БХТ. Екстракти су довели до инхибиције ДППХ радикала само на највишим концентрацијама (1000 и 500 $\mu\text{g/mL}$), а најактивнији је био етил-ацетатни екстракт маховине из пролећне сезоне **П-4** (23% инхибиције) при концентрацији од 1000 $\mu\text{g/mL}$. На истој концентрацији стандарди АК, БХА и БХТ су показали активности од 88, 85 и 84% инхибиције. Антиоксидативна активност екстраката је процењена и на основу њиховог укупног редукционог потенцијала (УРП), а резултати ове анализе су представљени у табели 11.

Табела 11. Укупни редукциони потенцијал (УРП) екстраката маховине *H. cupressiforme*.

Узорци	УРП (μmol ЕАК/g сувог екстракта)				
	1000 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$
П-1	10,48 \pm 1,09	нд	нд	нд	нд
П-2	нд	нд	нд	нд	нд
П-3	нд	нд	нд	нд	нд
П-4	13,24 \pm 1,87	6,90 \pm 0,66	нд	нд	нд
Л-4	29,00 \pm 2,21	5,38 \pm 1,61	нд	нд	нд
Ј-4	34,10 \pm 1,26	15,19 \pm 0,76	нд	нд	нд
АК	129,71 \pm 1,51	129,05 \pm 2,95	81,00 \pm 2,94	58,95 \pm 2,25	нд
БХА	118,81 \pm 9,57	121,38 \pm 10,07	50,00 \pm 2,50	26,86 \pm 1,98	5,48 \pm 0,74
БХТ	138,86 \pm 1,51	123,24 \pm 1,03	58,05 \pm 1,63	30,10 \pm 1,17	9,90 \pm 1,48

АК – аскорбинска киселина; БХА – бутиловани хидрокси-анизол; БХТ – бутиловани хидрокси-толуен; ЕАК – еквиваленти аскорбинске киселине; нд – није детектовано; УРП – укупни редукциони потенцијал

Резултати приказани у табели 11 показују да су, у односу на стандардне антиоксидативне супстанце АК, БХА и БХТ, испитивани екстракти маховине *H. cupressiforme* показали слабу до умерену активност. Најбоље су се показали етил-ацетатни екстракти маховине при највишим концентрацијама (1000 и 500 $\mu\text{g/mL}$), а највећа активност је детектована у екстракту маховине прикупљене у јесен **Ј-4** (34 μmol ЕАК/g) при концентрацији од 1000 $\mu\text{g/mL}$. На истој концентрацији стандарди АК, БХА и БХТ су показали активности од 130, 119 и 139 μmol ЕАК/g сувог екстракта. Тест инхибиције

избељивања β -каротена је такође коришћен за одређивање антиоксидативне активности екстраката, а резултати овог теста су приказани на графику 1.

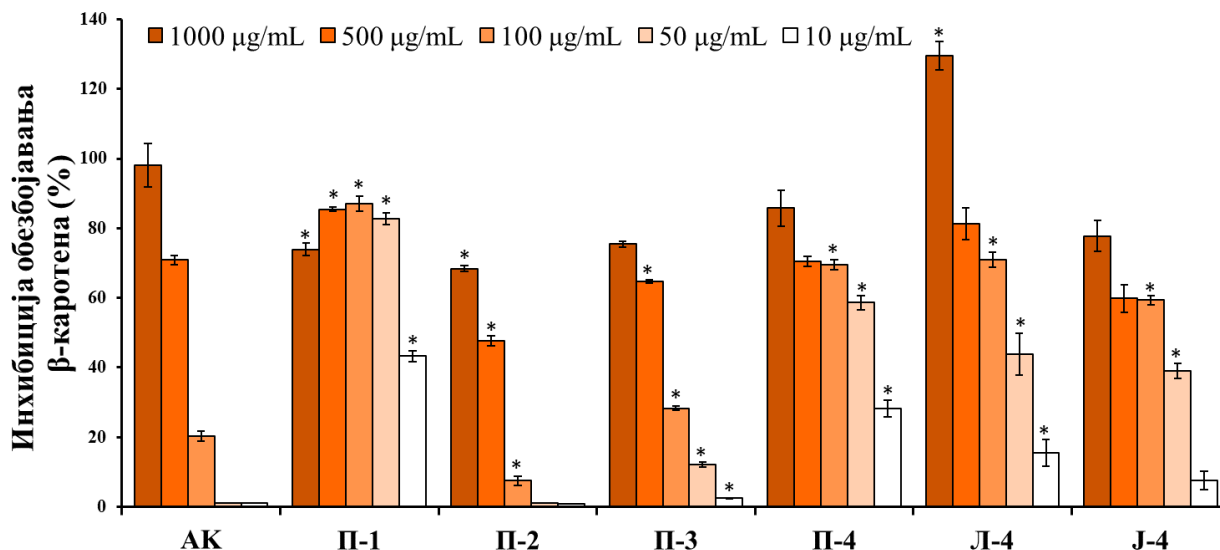


График 1. Инхибиција обезбојавања β -каротена различитим екстрактима маховине *H. cypressiforme* сакупљене током пролећа (П), лета (Л) и јесени (Ј).

Резултати су приказани као проценти инхибиције \pm стандардна грешка. Аскорбинска киселина (АК) је коришћена као позитивна контрола. * $p < 0,05$ узорак vs. АК

На основу резултата приказаних на графику 1, може се приметити да су екстракти маховине из пролећног аспекта **П-1** и **П-4** у концентрацијама од 100, 50 и 10 $\mu\text{g/mL}$ показали значајну инхибиторну активност у поређењу са истим концентрацијама стандардне супстанце АК. Процент инхибиције избељивања β -каротена од стране ових екстраката био је приближно четири пута већи у односу на стандард. Активност истих екстраката на вишим концентрацијама (1000 и 500 $\mu\text{g/mL}$) била је веома слична као активност аскорбинске киселине на истим концентрацијама. Стога, екстракти **П-1** и **П-4** су показали висок проценат инхибиције избељивања β -каротена у поређењу са аскорбинском киселином. Екстракти **П-2** и **П-3** из пролећне сезоне су показали ниску до умерену инхибиторну активност у поређењу са стандардом АК.

Етил-ацетатни екстракти маховине из летње и јесење сезоне **Л-4** и **Ј-4** при нижим тестираним концентрацијама (100 и 50 $\mu\text{g/mL}$), а летњи аспект маховине и на најнижој тестираној концентрацији од 10 $\mu\text{g/mL}$ показали су статистички значајно већу активност

од стандардног природног антиоксиданта – АК. Такође, при највишој тестираној концентрацији (1000 $\mu\text{g/mL}$), екстракт маховине сакупљене током лета је показао значајно виши проценат инхибиције (130%) у поређењу са истом концентрацијом стандардне супстанце АК (98%).

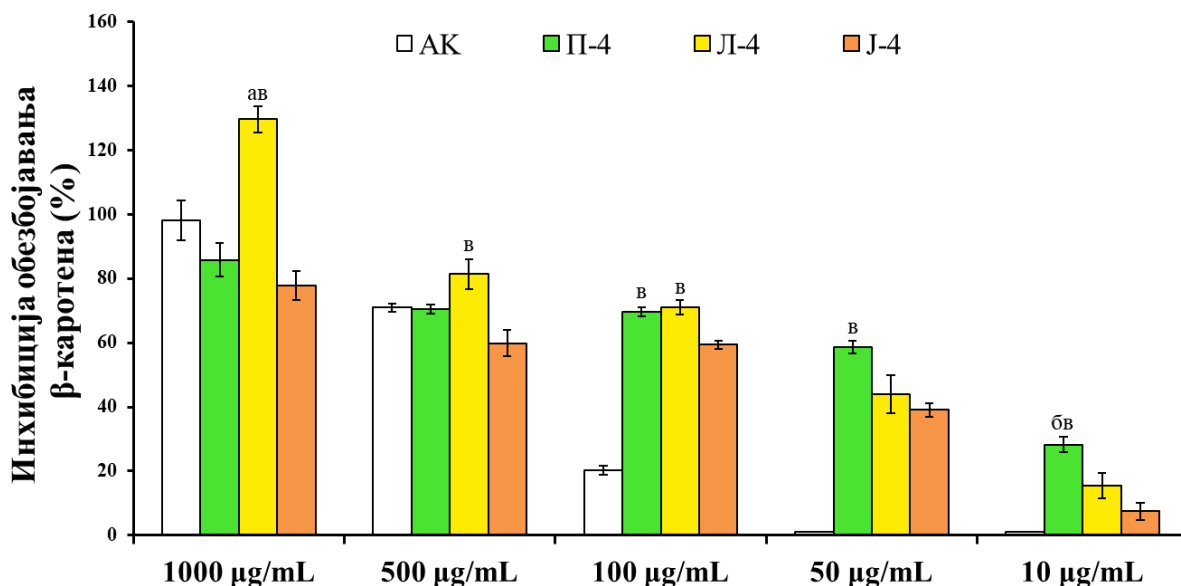


График 2. Поређење инхибиције обезбојавања β -каротена етил-ацетатним екстрактима маховине *H. cypressiforme* сакупљене током пролећа (П-4), лета (Л-4) и јесени (Ј-4).

Резултати су приказани као проценти инхибиције \pm стандардна грешка. Аскорбинска киселина (АК) је коришћена као позитивна контрола. ^a $p < 0,05$ vs. П-4, ^b $p < 0,05$ vs. Л-4 и ^B $p < 0,05$ vs. Ј-4

Када се упореде активности етил-ацетатног екстракта из сва три годишња доба, може се закључити да је у тесту инхибиције обезбојавања β -каротена на највишој испитиваној концентрацији (1000 $\mu\text{g/mL}$) значајно већу активност показао екстракт маховине сакупљене током лета, у односу на екстракт маховине сакупљене током пролећа и јесени. Са смањењем концентрације екстракта, екстракт маховине из пролећа показивао је све бољу активност, па је на најнижој тестираној концентрацији (10 $\mu\text{g/mL}$) овај екстракт значајно више инхибирао обезбојавање β -каротена у односу на летње и јесење узорке. Између летњег и јесењег аспекта маховине статистички значајне разлике се могу уочити за више концентрације екстракта (1000, 500 и 100 $\mu\text{g/mL}$) при чему је бољу активност имао екстракт маховине сакупљене током лета.

4.4 Антидијабетична активност

Антидијабетични потенцијал екстраката маховине *H. cupressiforme* је одређен тако што је тестирана њихова способност да инхибирају активност ензима који имају кључну улогу у разградњи угљених хидрата, α -амилазе и α -глукозидазе. Антидијабетична активност испитана је у пет различитих концентрација екстраката: 1000, 500, 100, 50 и 10 $\mu\text{g/mL}$, а као позитивна контрола, односно стандард за инхибицију ова два ензима коришћена је акарбоза у истим концентрацијама као екстракти. Ефекти испитиваних екстраката на активност ензима α -амилазе су приказани у табели 12.

Табела 12. Инхибиција активности ензима α -амилазе екстрактима маховине *H. cupressiforme*.

Инхибиција α -амилазе (%)					
	1000 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$
П-1	нд	нд	нд	нд	нд
П-2	нд	нд	нд	нд	нд
П-3	нд	нд	нд	нд	нд
П-4	8,76 \pm 0,35	5,68 \pm 0,15	1,42 \pm 0,26	нд	нд
Л-4	13,55 \pm 0,32	9,39 \pm 0,10	2,55 \pm 0,25	0,92 \pm 0,20	нд
Ј-4	14,39 \pm 0,63	7,89 \pm 0,10	1,37 \pm 0,71	1,03 \pm 0,16	нд
Акарбоза	82,99 \pm 1,18	80,15 \pm 1,02	53,65 \pm 0,42	47,16 \pm 1,25	3,36 \pm 0,09

нд – није детектовано

На основу добијених резултата (табела 12) може се приметити да су екстракти довели до слабе инхибиције активности ензима у поређењу са позитивном контролом. Активност је примећена само у етил-ацетатним екстрактима маховине из пролећа, лета и јесени, док у екстрактима припремљеним употребом осталих растварача није детектована активност у овом тесту. Међу етил-ацетатним екстрактима, највиши проценат инхибиције α -амилазе показао је екстракт маховине из јесење сезоне (**Ј-4**) концентрације 1000 $\mu\text{g/mL}$ – 14,39%, док је позитивна контрола, акарбоза, тестирана при истој концентрацији инхибирала 82,99% активности ензима. Други тест на основу ког је процењена

антидијабетична активност испитиваних екстраката је био тест инхибиције α -глукозидазе, а резултати су приказани на графику 3.

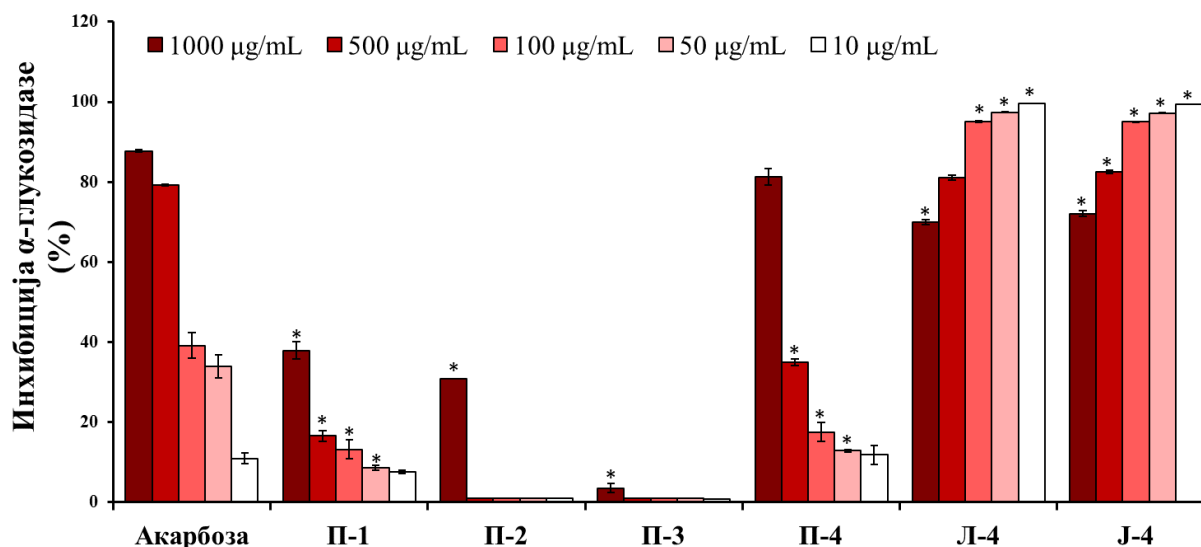


График 3. Инхибиција α -глукозидазе различитим екстрактима маховине *H. supressiforme* сакупљене током пролећа (П), лета (Л) и јесени (J).

Резултати су приказани као проценти инхибиције \pm стандардна грешка. Акарбоза је коришћена као позитивна контрола. * $p < 0,05$ узорак vs. акарбоза

Резултати инхибиције α -глукозидазе (график 3), показали су да неки од испитиваних екстраката маховине *H. supressiforme* поседују значајан инхибиторни потенцијал према овом ензиму. Међу екстрактима маховине сакупљене у пролеће најактивнији је био етил-ацетатни екстракт (П-4), а затим водени екстракт (П-1). Оба екстракта су показала сличан проценат инхибиције у односу на стандард акарбозу при концентрацији од 10 $\mu\text{g/mL}$. Екстракти П-2 и П-3 из пролећне сезоне су показали ниску активност у поређењу са акарбозом као стандардном супстанцом у овом тесту.

Етил-ацетатни екстракти маховине из летње и јесење сезоне Л-4 и J-4 при нижим тестираним концентрацијама (100, 50 и 10 $\mu\text{g/mL}$), показали су статистички значајно већу активност од стандардне супстанце акарбозе. Активност ових екстраката на нижим концентрацијама била је неколико пута већа од активности стандарда (~10 пута већа активност на најнижој тестираној концентрацији од 10 $\mu\text{g/mL}$). На вишим концентрацијама (1000 и 500 $\mu\text{g/mL}$) Л-4 и J-4 су испољили сличну или нешто нижу активност у поређењу са истим концентрацијама акарбозе.

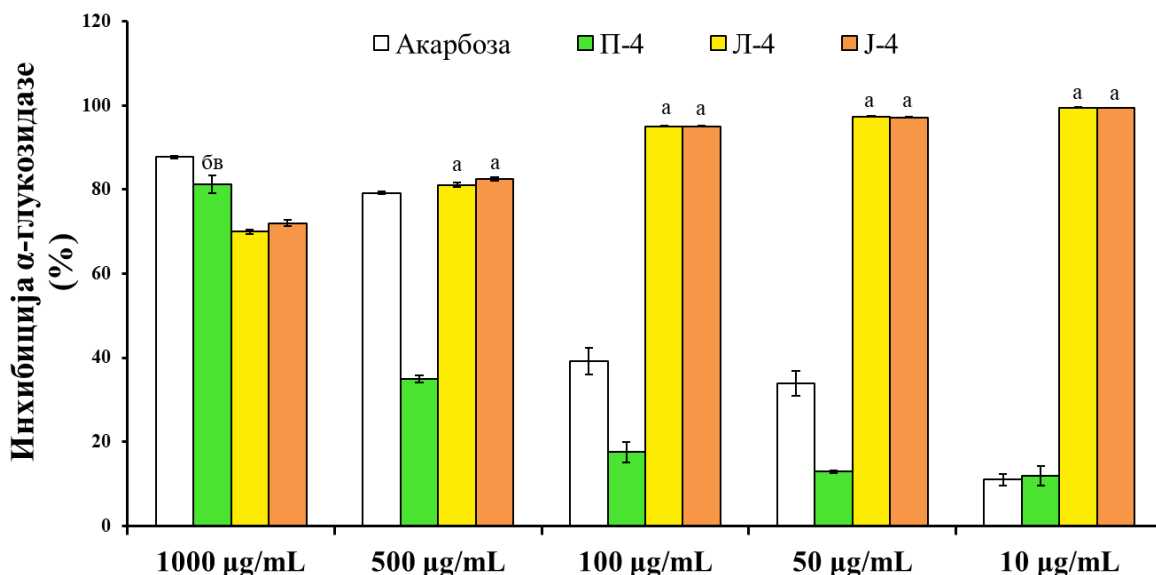


График 4. Поређење инхибиције α -глукозидазе етил-ацетатним екстрактима маховине *H. cypressiforme* сакупљене током пролећа (II-4), лета (J-4) и јесени (J-4).

Резултати су приказани као проценти инхибиције \pm стандардна грешка. Акарбоза је коришћена као позитивна контрола. ^а $p < 0,05$ vs. II-4, ^б $p < 0,05$ vs. J-4 и ^в $p < 0,05$ vs. J-4

Када се упореде активности етил-ацетатног екстракта маховине из сва три годишња доба (график 4), може се приметити да на готово свим испитиваним концентрацијама (изузев највише концентрације) значајно већи потенцијал за инхибицију α -глукозидазе поседују екстракти маховине из летње и јесење сезоне, у односу на пролећну сезону. Једино пролећни екстракт у највишој концентрацији од 1000 µg/mL је значајно више инхибирао ензим у односу на друга два екстракта. Летњи и јесењи аспекти маховине су показали веома сличан тренд када је у питању инхибиција α -глукозидазе и између њих није било статистички значајне разлике.

4.5 Антитуморска активност

Антитуморска активност испитиваних екстраката маховине *H. cypressiforme* је одређена коришћењем две туморске ћелијске линије: ћелијска линија тумора дојке човека, MDA-MB-231 и ћелијска линија тумора дебелог црева човека, HCT-116. Пре одређивања антитуморске активности, испитана је цитокомпатибилност екстраката према MRC-5

ћелијској линији фибробласта плућа човека. Антитуморска активност је одређена само за екстракте маховине *H. cupressiforme* сакупљене током пролећа.

4.5.1 Цитокомпатибилност

Пре испитивања антитуморске активности, цитокомпатибилност различитих екстраката маховине сакупљене током пролећа при концентрацији од 10 µg/mL је тестирана на нормалним фибробластима човека, MRC-5 ћелијама. Цитокомпатибилност је испитана одређивањем метаболичке активности ћелија уз помоћ МТТ теста, а одређен је и ефекат екстраката на продукцију РВК и NO од стране MRC-5 ћелија. Резултати ове анализе приказани су у табели 13.

Табела 13. Цитокомпатибилност и ефекат различитих екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 µg/mL) сакупљене током пролећа на продукцију РВК и NO од стране MRC-5 ћелија.

	Метаболичка активност (%)	Продукција РВК (индекс NBT)	Нитрити (µM)
Контрола	100,00 ± 2,09	1,00 ± 0,04	54,77 ± 1,99
П-1	105,83 ± 1,79	0,94 ± 0,02	62,91 ± 9,97
П-2	94,02 ± 1,24*	1,17 ± 0,09	59,04 ± 5,72
П-3	86,86 ± 0,46*	0,97 ± 0,03	61,82 ± 2,14*
П-4	87,96 ± 1,67*	1,00 ± 0,03	54,58 ± 4,13

РВК – реактивне врсте кисеоника; резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка репрезентативног експеримента изведеног у кватрипликату (*p<0,05 екстрактима третиране ћелије vs. нетретиране (контролне) ћелије)

Укупна метаболичка активност MRC-5 ћелија након третмана била је већа од 85% за све испитиване екстракте маховине у односу на нетретиране ћелије (контроле) чији је ниво метаболичке активности дефинисан као 100%. Ови резултати показују да тестирани екстракти маховине *H. cupressiforme* из пролећне сезоне, у дози од 10 µg/mL, не испољавају токсични ефекат према нормалним ћелијама фибробласта човека, чија је метаболичка активност након третмана била већа од 85%. Ово омогућава даље тестирање екстраката на туморским ћелијама и њихову потенцијалну примену као антитуморских агенаса. Такође, мерењем продукције РВК и NO од стране MRC-5 ћелија након њиховог

третирања екстрактима маховине из пролећне сезоне, утврђено је да екстракти не утичу значајно на продукцију ових молекула, односно да немају модулаторни ефекат на нормалне хумане ћелије фибробласта при примењеној концентрацији. Једини изузетак је био екстракт **П-3** који је довео до значајног повећања продукције NO.

4.5.2 Антитуморска активност екстраката према MDA-MB-231 ћелијама

Ефекат испитиваних екстраката маховине сакупљене током пролећа на метаболичку активност и продукцију РВК и NO од стране ћелијске линије тумора дојке, MDA-MB-231, приказани су на графицима 5 (метаболичка активност), 6 (продукција РВК) и 7 (продукција NO).

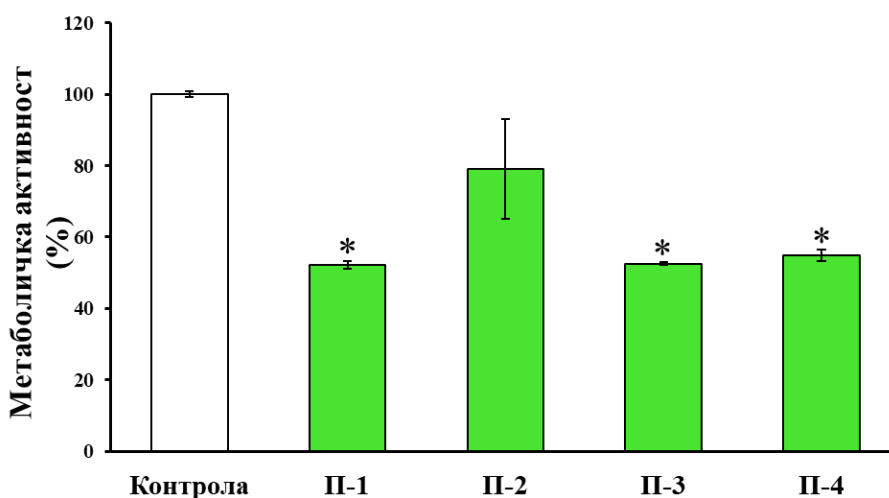


График 5. Утицај испитиваних екстраката маховине *H. cypressiforme* (10 µg/mL) сакупљене током пролећа на метаболичку активност MDA-MB-231 ћелија.

Резултати су приказани као средња вредност процента метаболичке активности ± стандардна грешка репрезентативног експеримента изведеног у кватрипликату (* $p < 0,05$ екстрактима третиране ћелије vs. нетретиране (контролне) ћелије (100%))

Екстракти **П-1**, **П-3** и **П-4** из пролећне сезоне (график 5) су довели до значајног смањења метаболичке активности MDA-MB-231 ћелија у поређењу са нетретираним контролним ћелијама. Такође, иако није показао значајан ефекат, екстракт **П-2** је ипак смањив метаболичку активност MDA-MB-231 ћелија на 79%, док је до највећег смањења довео екстракт **П-1** (52%), чиме је показао и најјачи ефекат међу испитиваним узорцима маховине из пролећне сезоне. Утицај испитиваних екстраката маховине *H. cypressiforme*

из пролећне сезоне на продукцију РВК, односно супероксид-анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$), од стране MDA-MB-231 ћелија су приказани на графику 6.

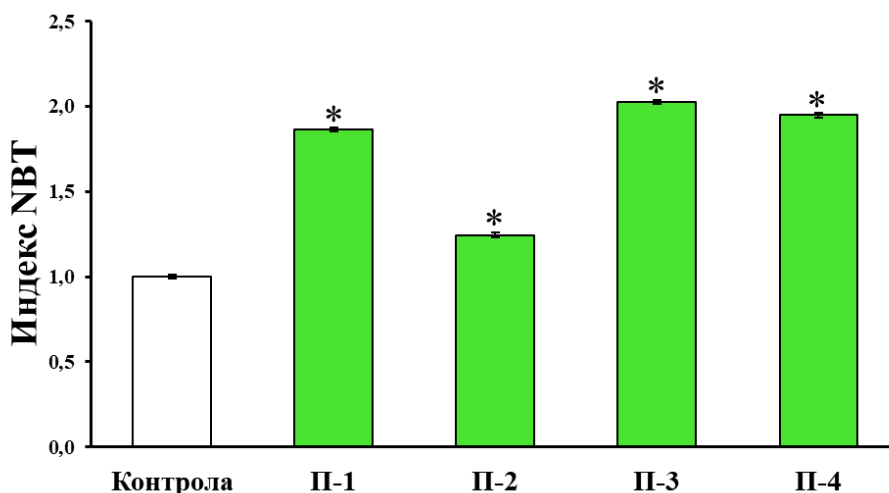


График 6. Утицај испитиваних екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 $\mu\text{g/mL}$) сакупљене током пролећа на продукцију супероксид-анјон радикала од стране MDA-MB-231 ћелија.

Резултати су приказани као средња вредност индекса NBT \pm стандардна грешка репрезентативног експеримента изведеног у кватрипликату (* $p < 0,05$ екстрактима третиране ћелије vs. нетретиране (контролне) ћелије (индекс 1))

Добијени резултати показују да третман испитиваним екстрактима доводи до значајног повећања продукције $O_2^{\cdot-}$ од стране MDA-MB-231 ћелија у поређењу са продукцијом од стране нетретираних контролних ћелија. Повећана продукција супероксид-анјон радикала након третмана може бити механизам уз помоћ ког екстракти доводе до смањења метаболичке активности ћелија, претходно измерено МТТ тестом (график 5). Највећи ефекат међу екстрактима из пролећне сезоне је остварен након третмана MDA-MB-231 ћелија екстрактом **II-3**, где је дошло до повећања NBT индекса са 1 (контролне ћелије) на 2,02. На графику 7 представљена је концентрација нитрита (као индиректног показатеља продукције NO) у супернатантима MDA-MB-231 ћелија третираних испитиваним екстрактима маховине *H. cupressiforme* из пролећне сезоне.

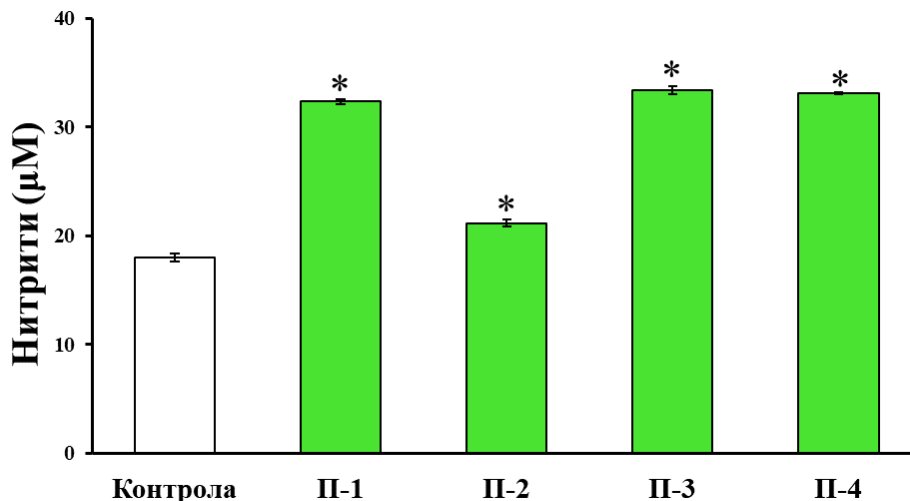


График 7. Утицај испитиваних екстраката маховине *H. cypressiforme* (10 µg/mL) сакупљене током пролећа на продукцију NO (процењено на основу концентрације нитрита) од стране MDA-MB-231 ћелија.

Резултати су приказани као средња вредност концентрације NO ± стандардна грешка репрезентативног експеримента изведеног у кватрипликату (*p<0,05 екстрактима третиране ћелије vs. нетретиране (контролне) ћелије)

Третман свим испитиваним екстрактима маховине из пролећне сезоне довео је до значајног повећања производње NO од стране MDA-MB-231 ћелија, у односу на његову продукцију од стране контролних нетретираних ћелија (график 7). Најјачи ефекат показао је екстракт **П-3**, који је скоро двоструко повећао продукцију NO у односу на контролне ћелије (са 17,99 µM на 33,37 µM). Повећање продукције NO, уз повећање продукције супероксид-анјон радикала након третмана екстрактима маховине, може бити још један од механизма помоћу ког ове биљке остварују свој антитуморски ефекат према MDA-MB-231 туморским ћелијама.

4.5.3 Антитуморска активност екстраката према НСТ-116 ћелијама

Ефекат испитиваних екстраката маховине сакупљене током пролећа на метаболичку активност и продукцију РВК и NO од стране ћелијске линије тумора дебелог црева, НСТ-116, приказани су у табели 14. Процент метаболичке активности ћелија је одређен уз помоћ МТТ теста, а ефекат екстраката на продукцију РВК и NO од стране НСТ-116 ћелија уз помоћ NBT и Griess-овог теста.

Табела 14. Ефекат различитих екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 µg/mL) сакупљене током пролећа на метаболичку активност и продукцију РВК и NO од стране НСТ-116 ћелија.

	Метаболичка активност (%)	Продукција РВК (индекс NBT)	Нитрити (µM)
Контрола	100,00 ± 2,16	1,00 ± 0,03	18,35 ± 0,55
П-1	97,59 ± 1,99	1,03 ± 0,05	18,43 ± 0,31
П-2	89,67 ± 0,68*	1,18 ± 0,05*	20,85 ± 0,30*
П-3	86,72 ± 0,35*	1,06 ± 0,03	19,60 ± 0,36
П-4	88,59 ± 1,42*	1,22 ± 0,02*	21,21 ± 0,26*

РВК – реактивне врсте кисеоника; резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка репрезентативног експеримента изведеног у кватрипликату (*p<0,05 екстрактима третиране ћелије vs. нетретиране (контролне) ћелије)

Метаболичка активност НСТ-116 ћелија након третмана била је већа од 85% за све испитиване екстракте маховине у односу на нетретиране ћелије (контроле) чији је ниво метаболичке активности дефинисан као 100%. Ови резултати показују да тестирани екстракти маховине *H. cupressiforme* из пролећне сезоне не испољавају антитуморски потенцијал ка ћелијској линији хуманог тумора дебелог црева. Такође, мерењем продукције РВК и NO од стране НСТ-116 ћелија након њиховог третирања екстрактима маховине из пролећне сезоне, утврђено је да екстракти **П-1** и **П-3** не утичу значајно на продукцију ових молекула, док екстракти **П-2** и **П-4** доводе до значајног повећања продукције како РВК тако и NO од стране ћелија, у односу на нетретиране, контролне ћелије.

4.6 Антинеуроинфламаторна активност

Антинеуроинфламаторна активност испитиваних екстраката маховине *H. cupressiforme* је одређена уз помоћ ћелијске линије мишје микроглије, BV2, док је утицај екстраката на цитотоксичност солубилних продуката микроглије према ћелијама неурона човека, одређен коришћењем SH-SY5Y ћелијске линије. Ћелије микроглије су

стимулисане помоћу два често коришћена активатора инфламације – ЛПС-а и водоник-пероксида (H₂O₂).

4.6.1 Модел систем: активација BV2 ћелија ЛПС-ом

Ефекат екстраката маховине из различитих сезона у концентрацији 10 µg/mL на функције BV2 ћелија микроглије, које су активирани ЛПС-ом, одређен је помоћу четири теста: МТТ, NBT, Griess-овог и ELISA теста, а резултати су приказани на графицима 8-14.

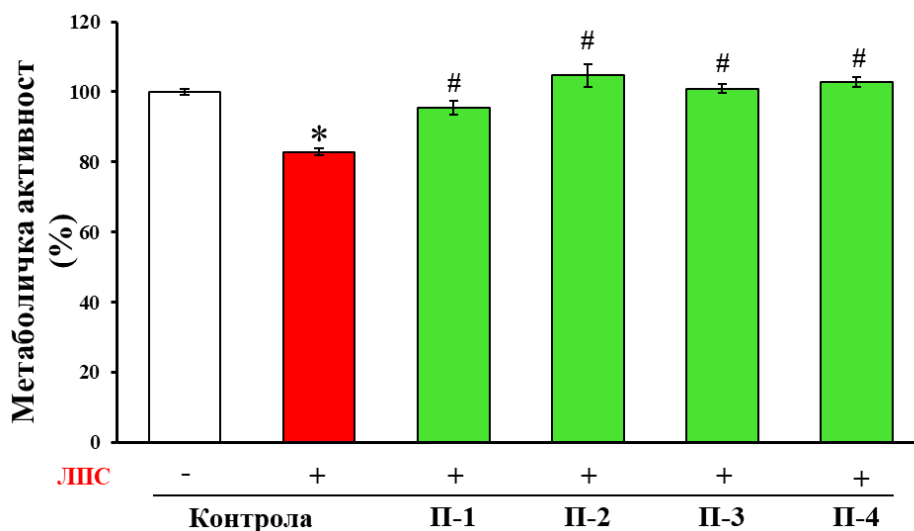


График 8. Утицај испитиваних екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 µg/mL) сакупљене током пролећа на метаболичку активност ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.

Резултати су приказани као средња вредност процента метаболичке активности ± стандардна грешка репрезентативног експеримента изведеног у кватрипликату (*p<0,05 vs. нестимулисана (контролна) ћелија (100%); #p<0,05 vs. ЛПС-ом стимулирана ћелија)

Добијени резултати (график 8) показују да је стимулација ћелија ЛПС-ом довела до значајног смањења метаболичке активности BV2 ћелија микроглије, у односу на нестимулисане контролне ћелије. Поређењем метаболичке активности ћелија стимулираних ЛПС-ом и третираних екстрактима са активношћу ћелија само стимулираних ЛПС-ом, може се закључити да третман свим екстрактима маховине из пролећне сезоне значајно повећава метаболичку активност BV2 ћелија, доводећи их близу или нешто изнад нивоа активности контролних ћелија. Највећу активност је показао екстракт П-2, где је метаболичка активност ћелија након третмана овим екстрактом

износила око 105% у поређењу са ЛПС-ом третираним ћелијама, чија метаболичка активност је била око 83%.

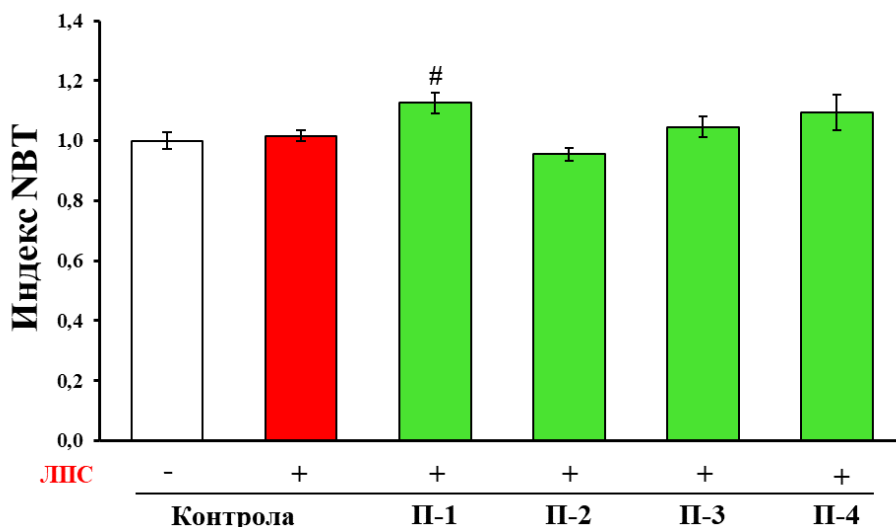


График 9. Утицај испитиваних екстраката маховине *H. cypressiforme* (10 µg/mL) сакупљене током пролећа на продукцију супероксид-анјон радикала од стране ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.

Резултати су приказани као средња вредност индекса NBT ± стандардна грешка репрезентативног експеримента изведеног у кватрипликату (*p<0,05 vs. нестимулисане (контролне) ћелије (1); #p<0,05 vs. ЛПС-ом стимулисане ћелије)

Резултати одређивања продукције РВК од стране ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија (график 9) показују да ЛПС не утиче значајно на продукцију РВК, као ни већина испитиваних екстраката маховине из пролећне сезоне. Једини екстракт који је довео до значајног повећања продукције РВК од стране ћелија је екстракт **П-1**.

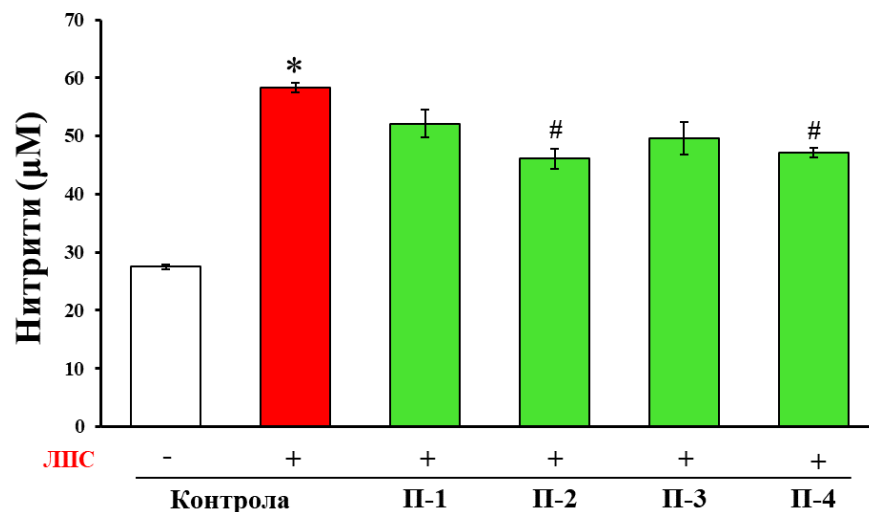


График 10. Утицај испитиваних екстраката маховине *H. cypressiforme* (10 µg/mL) сакупљене током пролећа на продукцију NO (процењено на основу концентрације нитрита) од стране ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.

Резултати су приказани као средња вредност концентрације NO ± стандардна грешка репрезентативног експеримента изведеног у кватрипликату (* $p < 0,05$ vs. нестимулисане (контролне) ћелије; # $p < 0,05$ vs. ЛПС-ом стимулисане ћелије)

Резултати приказани на графику 10 показују да активација нетретираних контролних ћелија ЛПС-ом доводи до значајног повећања производње NO од стране BV2 ћелија микроглије, што и јесте једна од карактеристика инфламације посредоване ЛПС-ом. Екстракти П-2 и П-4 значајно су смањили продукцију овог молекула од стране овако активираних ћелија микроглије и тиме показали антинеуроинфламаторни потенцијал.

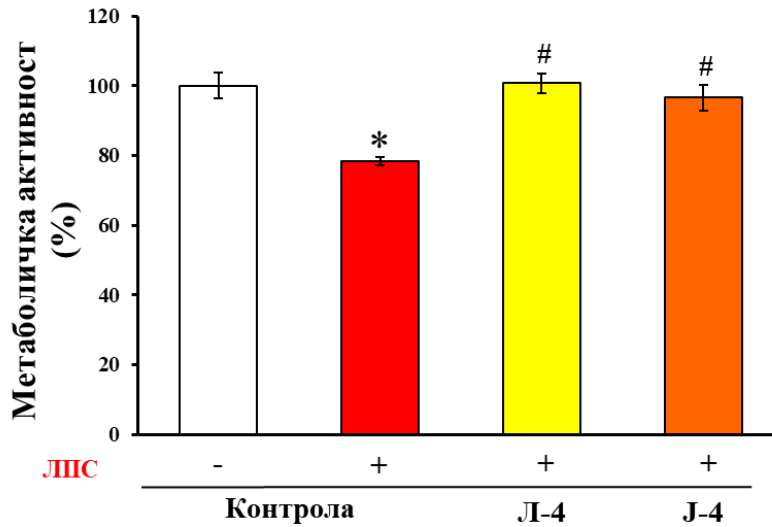


График 11. Утицај етил-ацетатних екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 $\mu\text{g/mL}$) сакупљене током лета и јесени на метаболичку активност ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.

Резултати су приказани као средња вредност процента метаболичке активности \pm стандардна грешка репрезентативног експеримента изведеног у кватрипликату (* $p < 0,05$ vs. нетретиране (контролне) ћелије (100%); # $p < 0,05$ vs. ЛПС-ом стимулиране ћелије)

Резултати приказани на графику 11 показују да су екстракти маховине *H. cupressiforme* сакупљене током лета (Л-4) и јесени (Ј-4) показали веома сличну активност као екстракти исте маховине сакупљене током пролећа (график 8). Након стимулације ћелија микроглије ЛПС-ом, дошло је до значајног смањења њихове метаболичке активности у поређењу са контролним нестимулисаним ћелијама, док је истовремена стимулација ЛПС-ом и третман ћелија екстрактима из лета и јесени довео до враћања нивоа метаболичке активности на ниво нестимулисаних/неактивираних ћелија.

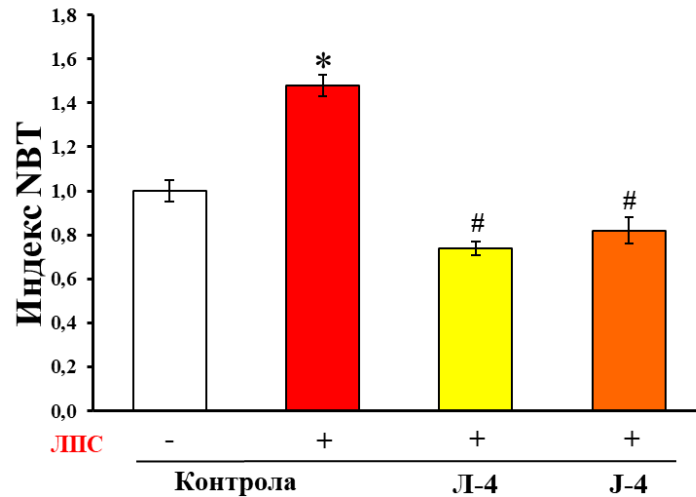


График 12. Утицај етил-ацетатних екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 $\mu\text{g/mL}$) сакупљене током лета и јесени на продукцију супероксид-анјон радикала од стране ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.

Резултати су приказани као средња вредност индекса NBT \pm стандардна грешка репрезентативног експеримента изведеног у кватрипликату (* $p < 0,05$ vs. нестимулисане (контролне) ћелије (1); # $p < 0,05$ vs. ЛПС-ом стимулисане ћелије)

Резултати NBT теста за екстракте маховине из лета и јесени (график 12) показују да стимулација BV2 ћелија ЛПС-ом доводи до значајно повећане продукције РВК, односно супероксид-анјон радикала, у поређењу са нестимулисаним контролним ћелијама. Такође, резултати показују да су етил-ацетатни екстракти маховине из летње (**Л-4**) и јесење (**Ј-4**) сезоне значајно смањили производњу РВК од стране ћелија и успели да је врате на ниво или чак испод нивоа контролних, нестимулисаних ћелија. У поређењу са екстрактима маховине из пролећне сезоне (график 9), маховине сакупљене током лета и јесени показале су већи антиоксидативни потенцијал, односно бољу активност у NBT тесту, јер су довеле до значајног смањења продукције РВК од стране ћелија микроглије, што код екстраката пролећне маховине није био случај.

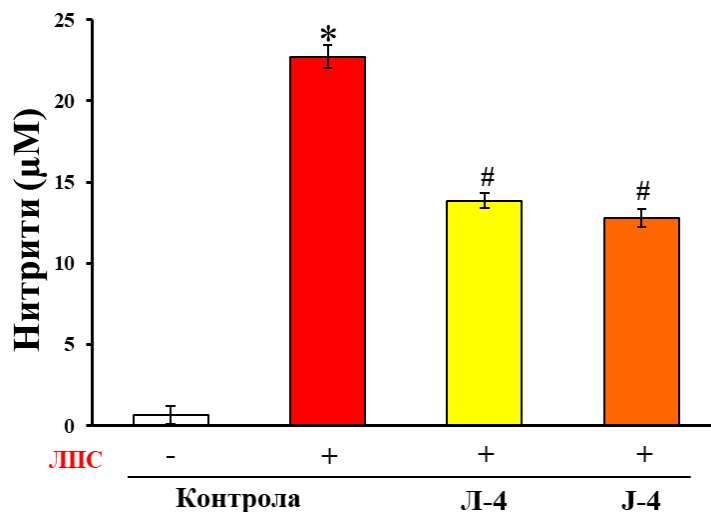


График 13. Утицај етил-ацетатних екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 µg/mL) сакупљене током лета и јесени на продукцију NO (процењено на основу концентрације нитрита) од стране ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.

Резултати су приказани као средња вредност концентрације NO ± стандардна грешка репрезентативног експеримента изведеног у кватрипликату (*p<0,05 ЛПС-ом стимулиране ћелије vs. нестимулиране (контролне) ћелије; #p<0,05 ЛПС-ом стимулиране и екстрактима третираних ћелија vs. ЛПС-ом стимулиране ћелије)

На основу резултата приказаних на графику 13 може се закључити да стимулација ћелија ЛПС-ом доводи до значајног повећања производње NO од стране BV2 ћелија, у односу на његову продукцију од стране контролних, нестимулисаних ћелија. Истовремена стимулација ЛПС-ом и третман етил-ацетатним екстрактима маховине из лета (**Л-4**) и јесени (**Ј-4**) доводи до значајне редукције концентрације NO у супернатантима BV2 ћелија микроглије. Слични резултати у Griess-овом тесту су добијени и за екстракте маховине из пролећне сезоне (график 10). Иако је тренд смањења продукције NO од стране ЛПС-ом стимулираних ћелија микроглије сличан за маховине из свих испитиваних сезона (пролеће, лето и јесен), бољи ефекат, односно веће смањење продукције NO се уочава након третмана ћелија екстрактима маховине сакупљене током лета и јесени (продукција NO је смањена за 39,02% након третмана ћелија са **Л-4**; за 43,82% након третмана ћелија са **Ј-4**; и за 11,54% након третмана ћелија екстрактом **П-2**, који је био најуспешнији у Griess-овом тесту када су у питању екстракти маховине из пролећа).

С обзиром да су показали већу антиоксидативну (NBT тест) и антинеуроинфламаторну (Griess-ов тест) активност у односу на екстракте маховине из пролећа, екстракти маховине из летње и јесење сезоне су даље анализирани како би се проценио њихов ефекат на производњу проинфламаторних цитокина, TNF- α и IL-6, од стране ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.

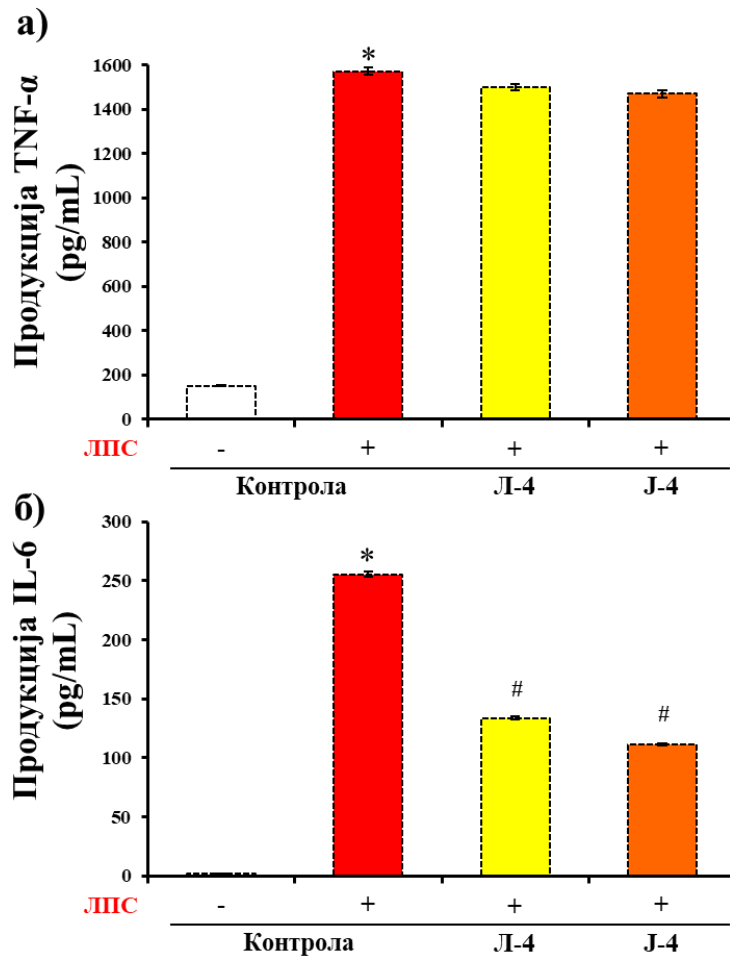


График 14. Утицај етил-ацетатних екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 $\mu\text{g/mL}$) сакупљене током лета и јесени на продукцију цитокина **а)** TNF- α и **б)** IL-6 од стране ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.

Резултати су приказани као средња вредност концентрације цитокина \pm стандардна грешка репрезентативног експеримента изведеног у кватрипликату (* $p < 0,05$ vs. нестимулисане (контролне) ћелије; # $p < 0,05$ vs. ЛПС-ом стимулисане ћелије)

Као што је приказано на графику 14, стимулација ЛПС-ом је значајно повећала ниво оба испитивана цитокина у супернатантима BV2 ћелија. Истовремена стимулација ЛПС-ом и третман ћелија етил-ацетатним екстрактима маховине сакупљене током лета (Л-4) и јесени (Ј-4) доводи до значајног смањења продукције IL-6 од стране ћелија, у поређењу са продукцијом овог цитокина од стране ћелија само стимулираних ЛПС-ом. Такође, иако продукција TNF- α није статистички значајно смањена, ипак је ниво овог цитокина у супернатантима BV2 ћелија био смањен након третмана екстрактима Л-4 и Ј-4 (4,5% за маховину сакупљену током лета и 6,5% за маховину сакупљену током јесени).

Са циљем да се утврди да ли екстракти маховине могу смањити цитотоксичност солубилних медијатора продукованих од стране ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија према SH-SY5Y неуронима, одређена је метаболичка активност неурона употребом модела трансфера супернатаната. Утицај супернатаната BV2 ћелија стимулираних ЛПС-ом и третираних екстрактима маховине из лета и јесени на метаболичку активност SH-SY5Y неурона приказан је на графику 15.

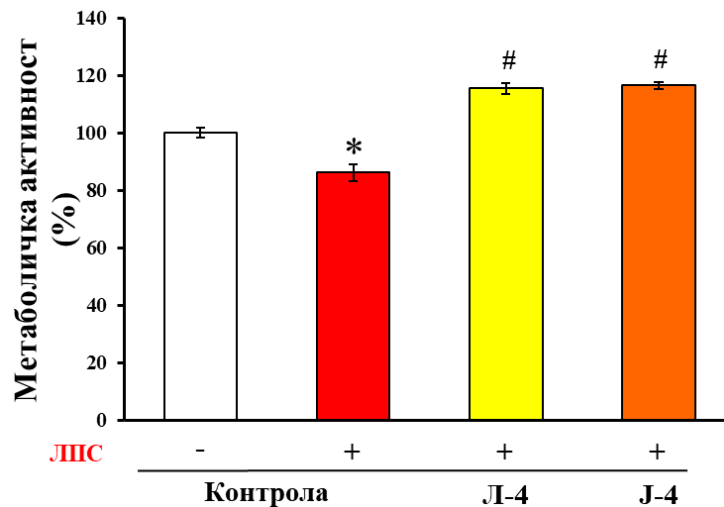


График 15. Утицај супернатаната ЛПС-ом стимулираних и екстрактима маховине *H. cypressiforme* третираних BV2 ћелија на метаболичку активност SH-SY5Y неурона.

Резултати су приказани као средња вредност процента метаболичке активности \pm стандардна грешка репрезентативног експеримента изведеног у кватрипликату (* $p < 0,05$ супернатанти ЛПС-ом стимулираних ћелија vs. супернатанти нестимулираних (контролних) ћелија (100%); # $p < 0,05$ супернатанти ЛПС-ом стимулираних и екстрактима третираних ћелија vs. супернатанти ЛПС-ом стимулираних ћелија)

Резултати представљени на графику 15 показују да су супернатанти BV2 ћелија стимулираних ЛПС-ом довели до смањења метаболичке активности SH-SY5Y ћелија неурона, у односу на неуроне третиране супернатантима контролних, нестимулисаних BV2 ћелија. Метаболичка активност SH-SY5Y неурона третираних супернатантима BV2 ћелија које су истовремено стимулиране ЛПС-ом и третиране екстрактима маховине из летње и јесење сезоне била је значајно већа у односу на неуроне третиране супернатантима ћелија које су само стимулиране ЛПС-ом, а нису третиране екстрактима. Супернатанти BV2 ћелија третирани екстрактима маховине **Л-4** и **Ј-4** повећали су метаболичку активност SH-SY5Y ћелија за 29,3% (**Л-4**) и 30,3% (**Ј-4**) у поређењу са ефектом супернатаната ћелија стимулираних ЛПС-ом, чиме је метаболичка активност овако третираних неурона враћена на ниво нестимулисаних, контролних ћелија. Ови резултати указују да екстракти маховине *H. cupressiforme* сакупљене током лета и јесени могу да обезбеде неуропротекцију SH-SY5Y неурона у моделу где је неуротоксичност посредована солубилним продукцијом ослобођеним из ЛПС-ом стимулиране микроглије.

4.6.2 Модел систем: активација BV2 ћелија водоник-пероксидом

Због добре антиоксидативне (NBT тест) и антинеуроинфламаторне (Griess-ов тест) активности коју су показали, екстракти маховине *H. cupressiforme* из летње и јесење сезоне су даље анализирани на истом модел систему (BV2 ћелије микроглије), уз примену другог често коришћеног активатора – водоник-пероксида. Испитан је утицај екстраката на метаболичку активност и продукцију РВК од стране водоник-пероксидом стимулираних BV2 ћелија, а резултати су приказани на графику 16.

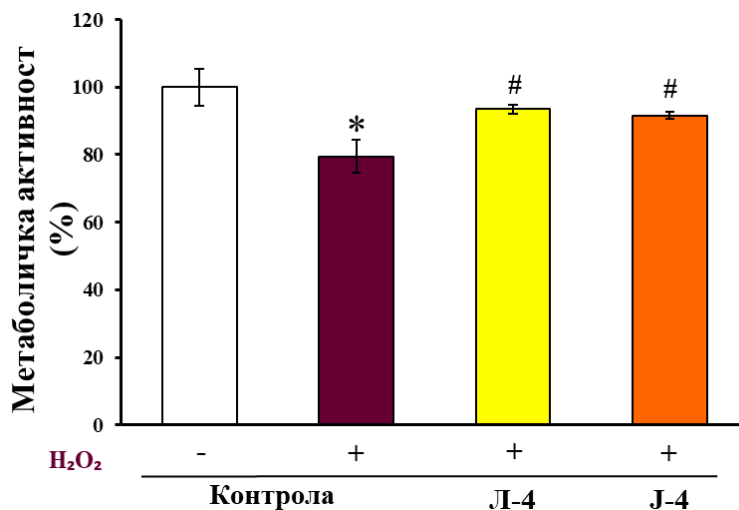


График 16. Утицај етил-ацетатних екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 µg/mL) сакупљене током лета и јесени на метаболичку активност водоник-пероксидом стимулираних BV2 ћелија.

Резултати су приказани као средња вредност процента метаболичке активности ± стандардна грешка репрезентативног експеримента изведеног у кватрипликату (*p<0,05 vs. нестимулисане (контролне) ћелије (100%); #p<0,05 vs. H₂O₂ стимулисане ћелије)

Као што је приказано на графику 16, метаболичка активност BV2 ћелија стимулираних водоник-пероксидом је значајно смањена у поређењу са контролним, нестимулисаним ћелијама. Након истовремене активације ћелија водоник-пероксидом и третмана екстрактима маховине из летње и јесење сезоне, дошло је до значајног опоравка метаболичке активности BV2 ћелија, у поређењу са ћелијама стимулираним водоник-пероксидом. Екстракти маховине из оба годишња доба показали су сличну активност и нису се статистички разликовали међу собом.

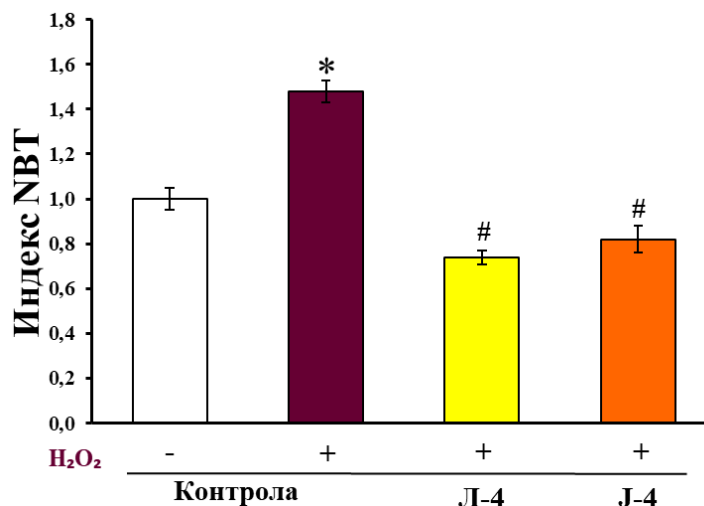


График 17. Утицај етил-ацетатних екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 µg/mL) сакупљене током лета и јесени на продукцију супероксид-анјон радикала од стране водоник-пероксидом стимулираних BV2 ћелија.

Резултати су приказани као средња вредност индекса NBT ± стандардна грешка репрезентативног експеримента изведеног у кватрипликату (*p<0,05 vs. нестимулисане (контролне) ћелије (1); #p<0,05 vs. H₂O₂ стимулисане ћелије)

Производња РВК од стране BV2 ћелија се значајно повећала након стимулације водоник-пероксидом, у поређењу са нестимулисаним ћелијама (график 17). Испитивани етил-ацетатни екстракти маховине из летње и јесење сезоне су значајно смањили продукцију РВК индуковану водоник-пероксидом, изражену као NBT индекс, до нивоа продукције РВК од стране нестимулисаних контролних ћелија. Ови резултати указују да испитивани екстракти поседују значајан антиоксидативни/антинеуроинфламаторни потенцијал у испитиваном ћелијском моделу – водоник-пероксидом стимулисане BV2 ћелије мишје микроглије.

4.7 Антинеуродегенеративна активност

Након потврде антинеуроинфламаторног потенцијала екстраката маховине *H. cupressiforme* коришћењем два модел система, антинеуродегенеративна активност екстраката је одређена уз помоћ тестова инхибиције два ензима чија се повећана активност доводи у везу са многим неуродегенеративним поремећајима, а то су

ацетилхолинестераза и тирозиназа. Антинеуродегенативна активност испитивана је у пет различитих концентрација екстраката: 1000, 500, 100, 50 и 10 $\mu\text{g/mL}$. Као позитивна контрола, односно стандард за инхибицију ацетилхолинестеразе коришћен је галантамин, док је за инхибицију тирозиназе као стандард коришћена којична киселина у истим масеним концентрацијама као екстракти. Резултати инхибиције ацетилхолинестеразе приказани су на графику 18.

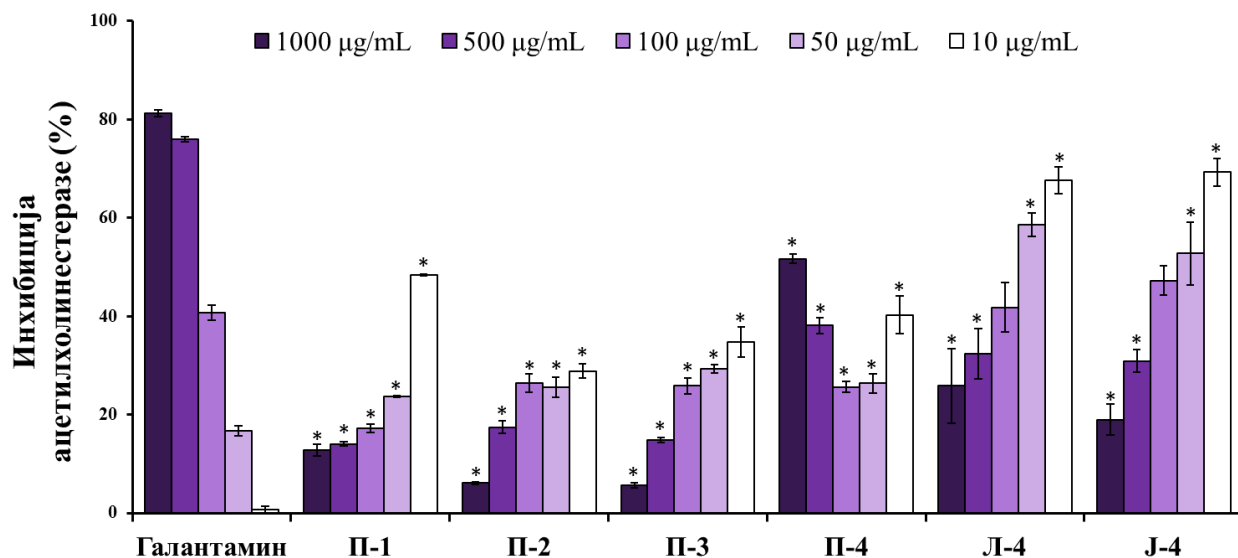


График 18. Инхибиција ацетилхолинестеразе различитим екстрактима маховине *H. supressiforme* сакупљене током пролећа (П), лета (Л) и јесени (Ј).

Резултати су приказани као проценти инхибиције \pm стандардна грешка. Галантамин је коришћен као позитивна контрола. * $p < 0,05$ узорак *vs.* галантамин

Као што може да се види на графику 18, када је у питању маховина сакупљена током пролећа, до највеће инхибиције ацетилхолинестеразе довели су екстракти **П-4** и **П-1**, а затим екстракти **П-3** и **П-2**. Иако је инхибиција ензима од стране стандардне супстанце галантамина директно зависила од концентрације стандарда, и била највећа на највишој тестираној концентрацији (1000 $\mu\text{g/mL}$), то није био случај са екстрактима, који су најјачу активност показали на најнижој тестираној концентрацији од 10 $\mu\text{g/mL}$. Једини изузетак је био екстракт **П-4** који је највећу активност показао при највишој и при најнижој тестираној концентрацији. Галантамин није инхибирао ензим при концентрацији од 10 $\mu\text{g/mL}$, док су екстракти у тој концентрацији били активни и тиме показали значајно

већи инхибиторни потенцијал према ацетилхолинестерази у испитиваној концентрацији у поређењу са стандардом.

Етил-ацетатни екстракти маховина сакупљених током лета и јесени (Л-4 и Ј-4) су испољили слабу до умерену активност при највишој тестираној концентрацији, док су у нижим концентрацијама проценти инхибиције били неколико пута виши и статистички значајни у поређењу са позитивном контролом, галантамином. Такође, може се уочити исти тренд као код екстраката маховине из пролећа, где се проценти инхибиције ензима повећавају пропорционално са смањењем концентрације екстракта. Тако је највећа вредност инхибиције ацетилхолинестеразе забележена при концентрацији од 10 µg/mL и за летње (67,58%) и за јесење узорке (69,25%).

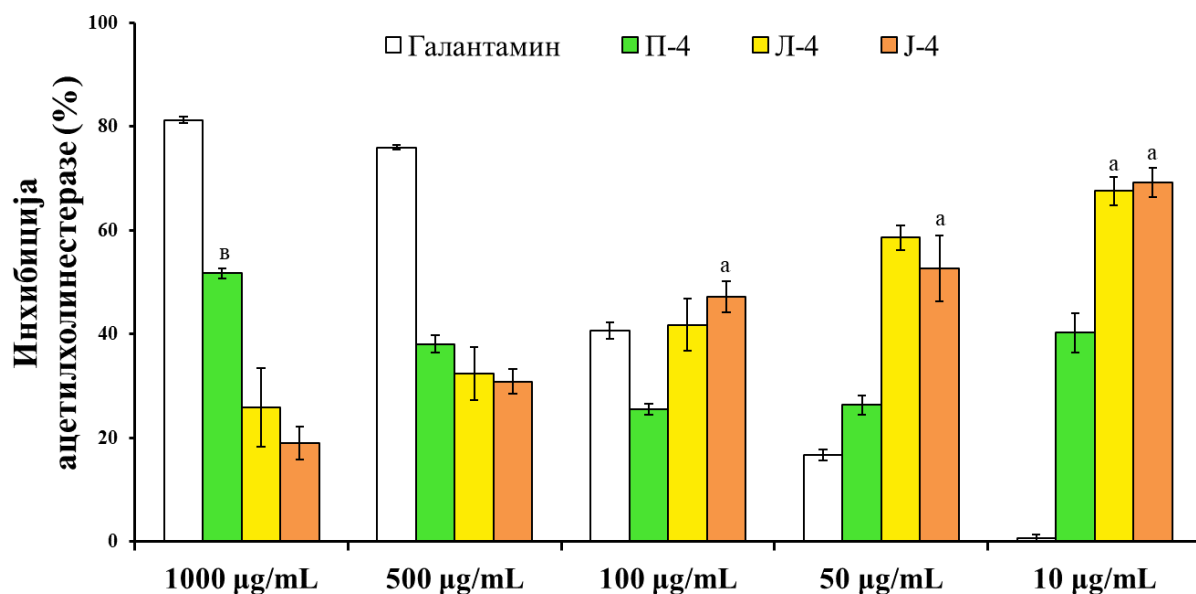


График 19. Поређење инхибиције ацетилхолинестеразе етил-ацетатним екстрактима маховине *N. cypressiforme* сакупљене током пролећа (П-4), лета (Л-4) и јесени (Ј-4).

Резултати су приказани као проценти инхибиције ± стандардна грешка. Галантамин је коришћен као позитивна контрола. ^аp<0,05 vs. П-4 и ^вp<0,05 vs. Ј-4

Праћењем разлика у активностима екстраката маховина из различитих годишњих доба (график 19), долази се до закључка да пролећни аспект маховине (П-4) испољава значајно већу активност при највишој тестираној концентрацији у односу на јесењи

аспект. Са друге стране, екстракт маховине из јесење сезоне (**J-4**) значајно више инхибира ензим при нижим испитиваним концентрацијама (100, 50 и 10 $\mu\text{g/mL}$) у поређењу са пролећним аспектом маховине (**П-4**), док екстракт маховине из летње сезоне (**Л-4**) значајно више инхибира ензим у односу на маховину из пролећа при концентрацији од 10 $\mu\text{g/mL}$. Када су у питању разлике између летњег и јесењег аспекта маховине, трендови инхибиције су веома слични и не постоје статистички значајне разлике између ефекта екстраката маховине прикупљене у ова два годишња доба у погледу инхибиције ацетилхолинестеразе. Антинеуродегенеративна активност екстраката процењена је и на основу њихове способности да инхибирају ензим тирозиназу, а резултати овог теста приказани су на графику 20.

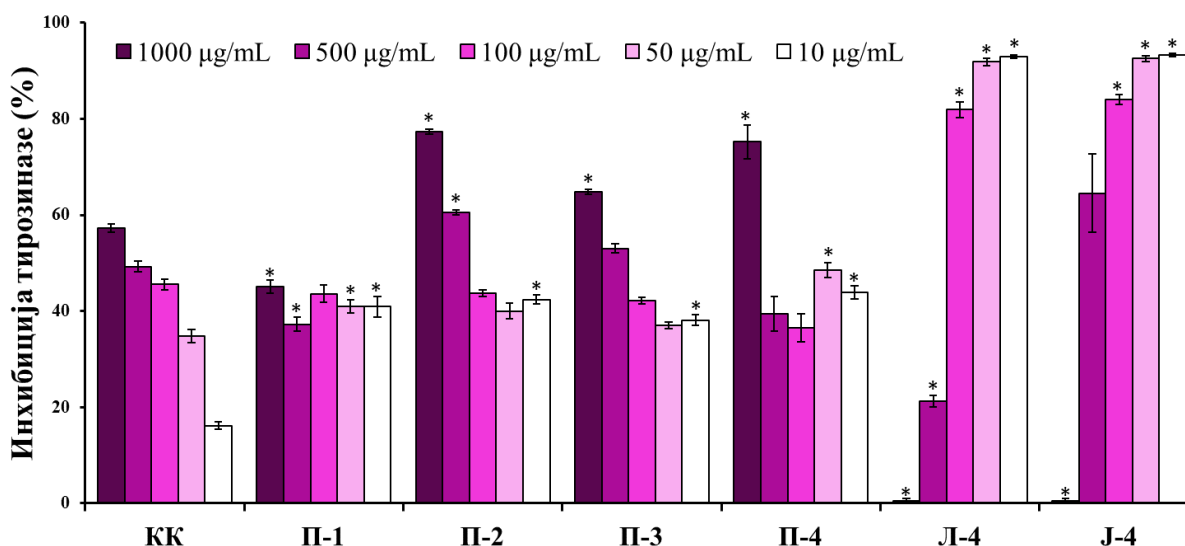


График 20. Инхибиција тирозиназе различитим екстрактима маховине *H. cypressiforme* сакупљене током пролећа (П), лета (Л) и јесени (Ј).

Резултати су приказани као проценти инхибиције \pm стандардна грешка. Којична киселина (КК) је коришћена као позитивна контрола. * $p < 0,05$ узорак vs. КК

Резултати приказани на графику 20 показују да сва четири испитивана екстракта маховине сакупљене током пролећа (**П-1**, **П-2**, **П-3** и **П-4**) доводе до значајне инхибиције тирозиназе у поређењу са стандардом – којичном киселином. При најнижој примењеној концентрацији (10 $\mu\text{g/mL}$), сви испитивани екстракти пролећне маховине су показали приближно 2,5 пута већи проценат инхибиције ензима него којична киселина. Такође, исти екстракти у осталим испитиваним концентрацијама (1000, 500, 100 и 50 $\mu\text{g/mL}$) су

показали сличну или чак већу инхибиторну активност него којична киселина при истим концентрацијама.

Инхибиција тирозиназе екстрактима маховина из летње и јесење сезоне пратила је исти тренд као претходно описана инхибиција ацетилхолинестеразе, уз значајно повећање инхибиције ензима како се концентрација екстракта смањивала. Екстракти маховине у концентрацијама од 100, 50 и 10 $\mu\text{g/mL}$ су показали вишеструко већу инхибицију која је били и статистички значајна у односу на стандардну инхибиторну супстанцу, којичну киселину.

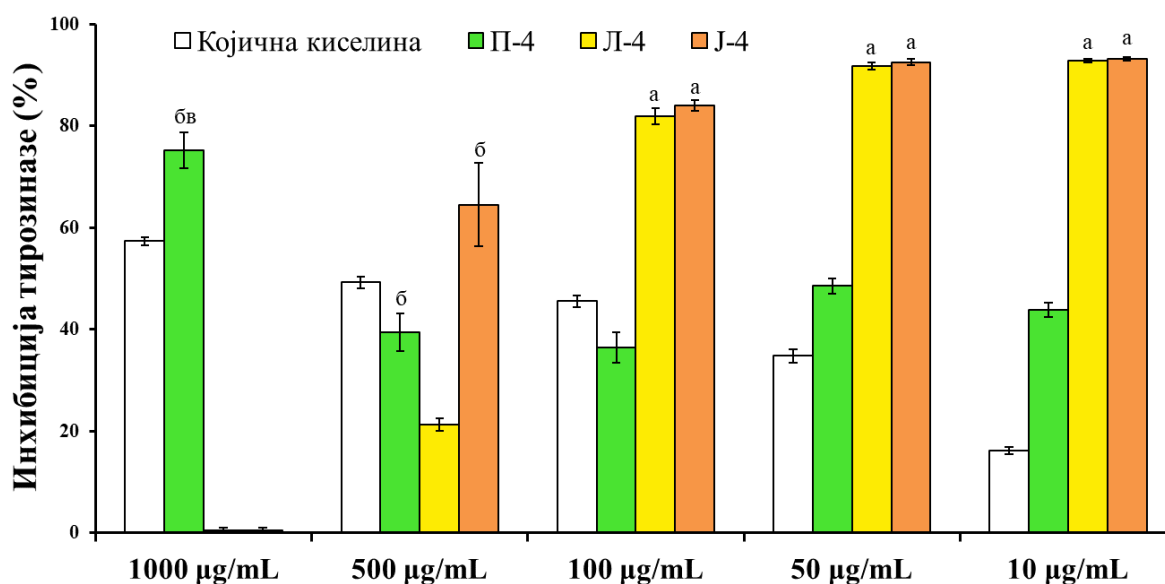


График 21. Поређење инхибиције тирозиназе етил-ацетатним екстрактима маховине *N. supressiforme* сакупљене током пролећа (П-4), лета (Л-4) и јесени (Ј-4).

Резултати су приказани као проценти инхибиције \pm стандардна грешка. Којична киселина је коришћена као позитивна контрола. ^а $p < 0,05$ vs. П-4, ^б $p < 0,05$ vs. Л-4 и ^в $p < 0,05$ vs. Ј-4

Што се тиче разлика између годишњих доба (график 21), летњи и јесењи аспекти су показали сличан тренд инхибиције тирозиназе у свим испитиваним концентрацијама без статистички значајних разлика, осим при концентрацији од 500 $\mu\text{g/mL}$, где је екстракт маховине из јесење сезоне показао значајно већу инхибицију ензима него летњи аспект маховине (64,5% инхибиције за јесењи аспект у односу на 21,2% инхибиције за летњи аспект). Такође, у односу на екстракт маховине из пролећа, летњи и јесењи аспекти

маховине значајно су више инхибирале ензим при нижим тестираним концентрацијама (100, 50 и 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). На највишој тестираној концентрацији (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) пролећни аспект маховине је био значајно бољи него екстракти маховине из лета и јесени, док је при концентрацији од 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ пролећни аспект значајно више инхибирао ензим у односу на летњи аспект маховине.

4.8 Молекулски докинг

Како би се испитале интеракције секундарних метаболита идентификованих употребом LC-MS-а у екстрактима маховине *H. cupressiforme* са протеинима од интереса (ацетилхолинестераза и тирозиназа) коришћена је *in silico* анализа молекулског докинга. Укупно 14 фенолних киселина и флавоноида детектованих у екстрактима *H. cupressiforme* уз помоћ LC-MS (табела 7) су анализирани као потенцијални лиганди, како би се открило који секундарни метаболити највише доприносе инхибицији ензима одређеној у *in vitro* условима (график 18 и график 20). Контрола докинг процедуре изведена је ре-докингом лиганада присутних у кристалним структурама испитиваних протеина, док су галантамин и којична киселина коришћени као стандардни инхибитори ацетилхолинестеразе и тирозиназе и као позитивна контрола добијених енергија. Такође, треба нагласити да су секундарни метаболити који су коришћени као лиганди у симулацијама молекулског докинга класификовани у шест група према њиховој хемијској структури. Унутар сваке од ових шест група одабрана су једињења са најбољим докинг резултатима, а њихове интеракције са одговарајућим ензимима су приказане на одговарајућим сликама.

У *in vitro* тестовима инхибиције ацетилхолинестеразе и тирозиназе коришћени су ензими из различитих извора, при чему ниједан ензим није пореклом из човека. Стога су у докинг студијама коришћени ензими из истих извора као у *in vitro* тестовима, како би резултати могли да се пореде. Међутим, поред поређења са резултатима *in vitro* тестова, циљ докинг симулација је био и да се добијени резултати транслирају на човека, односно да се види потенцијал екстраката ка инхибицији људских ензима, што би имало значај за практичну примену. У случају ацетилхолинестеразе, детаљном претрагом литературе утврђено је да је ензим коришћен у *in vitro* тесту (пореклом из јегуље *Electrophorus electricus*) по структури и динамици реакције коју катализује веома сличан

ацетилхолинестерази човека [89, 140], те би резултати добијени за ензим из *E. electricus* могли да се транслирају на човека. Са друге стране, у *in vitro* тесту инхибиције тирозиназе коришћен је ензим из гљиве (*Agaricus bisporus*) за који не може са сигурношћу да се тврди да је сличан људском ензиму [141]. Како за људску тирозиназу не постоји одговарајућа кристална структура, конструисан је хомологни модел протеина, како би докинг био изведен и на тирозинази човека и како би се виделе евентуалне разлике у зависности од извора ензима (ензим гљиве у односу на ензим човека).

4.8.1 Ре-докинг анализа

Како би се утврдила прецизност протокола коришћеног за молекулски докинг, урађен је ре-докинг, односно поновно укотвљавање лигананда бис(7)-такрина и трополона присутних у кристалним структурама испитиваних протеина, ацетилхолинестеразе и тирозиназе гљиве. Вредност корена средњег квадрата одступања (RMSD) за бис(7)-такрин била је 0,73 Å, а за трополон 1,30 Å, у односу на њихове конформације из кристалних структура. Уопштено, докинг параметри се сматрају прихватљивим ако RMSD вредност поново укотвљеног лигананда, у односу на лиганд из кристала, износи до 2 Å. Такође, конформације поново укотвљених и лигананда из кристалних структура су скоро идентичне, што потврђује да је докинг протокол коришћен у овој докторској дисертацији одговарајући за испитиване протеине и да може да продукује резултате са високом прецизношћу.

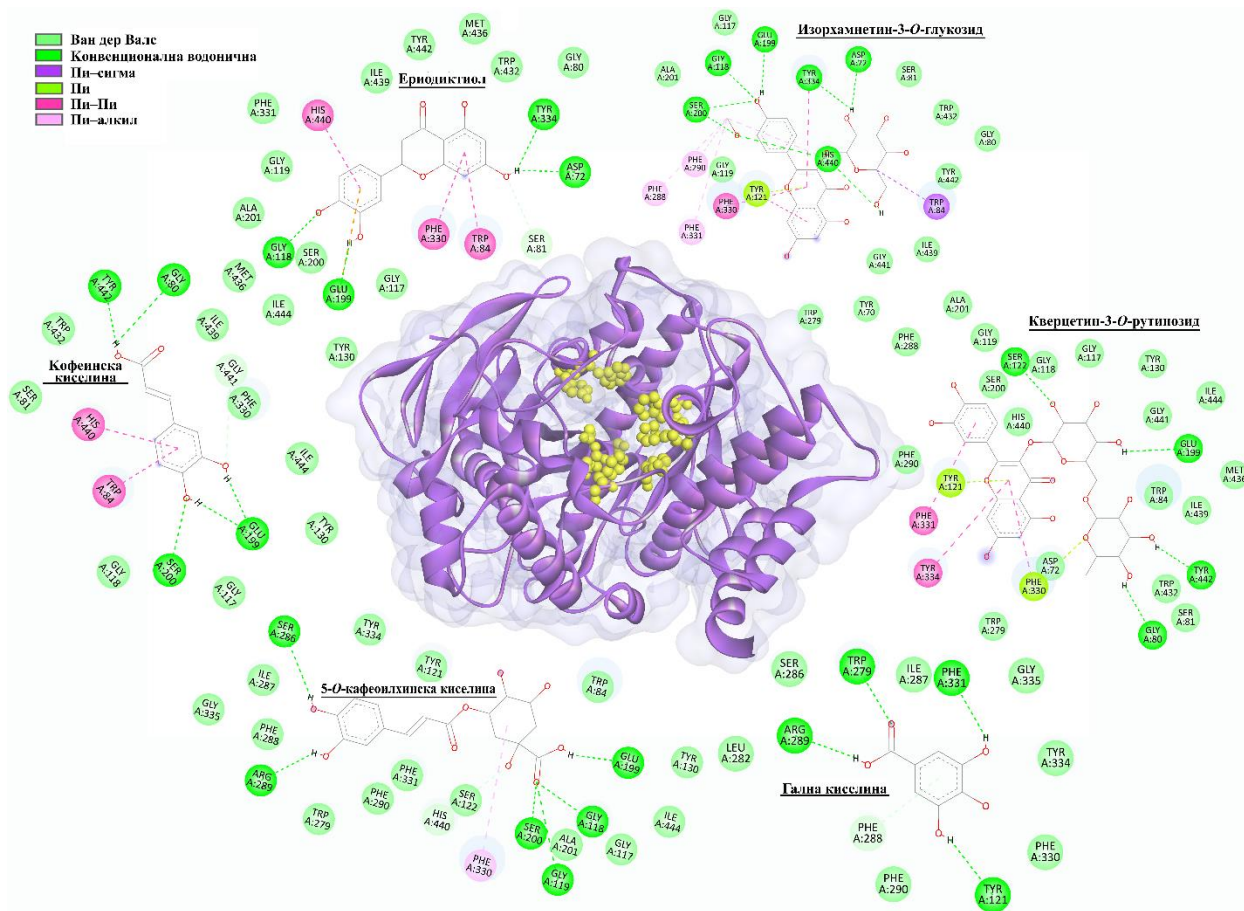
4.8.2 Докинг на ацетилхолинестеразу

Резултати докинг симулације (енергије везивања (ΔG), константе инхибиције (K_i) и ефикасност лигананда), као и интеракције једињења идентификованих у *H. cupressiforme* са ацетилхолинестеразом дате су у табели 15. На слици 18 представљене су дводимензионалне (2D) интеракције шест најбоље ранжираних представника из сваке класе секундарних метаболита (дефинисаних према њиховој хемијској структури), а на слици 19 су дате 3D интеракције најбоље ранжираног секундарног метаболита са активним местом ацетилхолинестеразе.

Табела 15. Резултати докинг симулације и интеракције секундарних метаболита детектованих у екстрактима маховине *H. cupressiforme* са активним местом ацетилхолинестеразе.

Једињење	ΔG (kcal/mol)	Ki (μM)	Ефикасност лиганда	Интеракције са каталитичким местом*	Интеракције ван каталитичког места*
Галантамин	-8,99	0,26	-0,43	His440	Trp84, Glu199, Phe288, Phe290, Phe330, Phe331
Гална киселина	-4,67	375,08	-0,39	/	Tyr121, Trp279, Phe288, Arg289, Phe331
Протокатеуинска киселина	-4,53	478,55	-0,41	/	Tyr121, Trp279, Phe288, Arg289, Phe330
5-О-Кафеоилхинска киселина	-5,86	51,01	-0,23	Ser200, His440	Gly118, Gly119, Glu199, Phe330, Ser286, Arg289
<i>p</i> -Хидроксибензоева киселина	-4,65	388,37	-0,47	/	Trp279, Ile287, Phe288, Arg289, Phe330
Кофеинска киселина	-5,32	126,94	-0,41	Ser200, His440	Gly80, Trp84, Glu199, Gly441, Tyr442
<i>p</i> -Кумаринска киселина	-5,05	198,38	-0,42	Ser200	Gly80, Glu199, Tyr442
Кверцетин 3-О- рутинозид	-4,79	310,25	-0,11	/	Gly80, Tyr121, Ser122, Glu199, Phe330, Phe331, Tyr334, Tyr442
Кверцетин 3-О- глукозид	-6,76	11,12	-0,20	His440	Asp72, Trp84, Tyr121, Glu199, Phe330
Изорхамнетин 3-О- глукозид	-7,34	4,20	-0,22	Ser200, His440	Asp72, Trp84, Gly118, Tyr121, Glu199, Phe288, Phe290, Phe330, Phe331, Tyr334
Ериодиктиол	-8,80	0,35	-0,42	His440	Asp72, Ser81, Trp84, Gly118, Glu199, Phe330, Tyr334
Апигенин	-8,59	0,51	-0,43	His440	Asp72, Ser81, Gly118, Phe330, Tyr334, Tyr442
Нарингенин	-8,52	0,57	-0,43	His440	Asp72, Trp84, Gly118, Gly119, Phe330, Tyr334
Кемпферол	-8,39	0,71	-0,40	His440	Asp72, Gly119, Phe330, Tyr442
Ацацетин	-8,58	0,51	-0,41	His440	Asp72, Gly118, Gly119, Ala201, Trp233, Phe290, Phe330, Tyr442

*Ван дер Валс-ове интеракције нису укључене у ову табелу



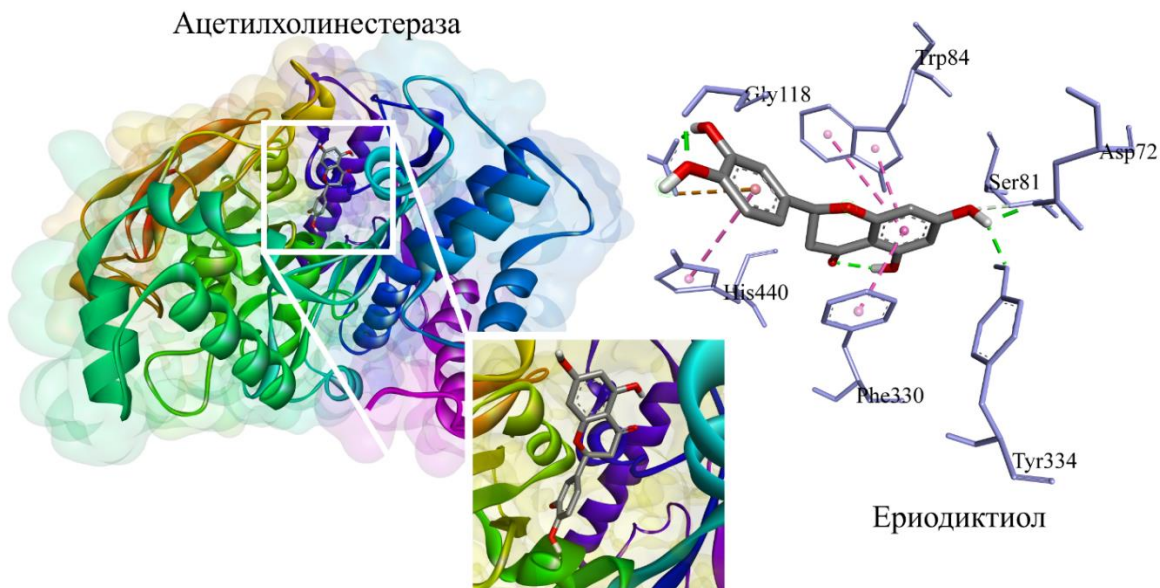
Слика 18. 2D интеракције шест најбоље ранжираних представника из сваке класе секундарних метаболита (дефинисаних према њиховој хемијској структури) са активним местом ацетилхолинестеразе (обележено жуто).

На основу резултата докинга приказаних на слици 18, може се приметити да су у оквиру сваке од шест група, секундарни метаболити са највећим афинитетом везивања за активно место ацетилхолинестеразе били следећи: ериодиктиол (-8,80 kcal/mol), изорхамнетин-3-О-глукозид (-7,34 kcal/mol), 5-О-кафеоилхинска киселина (-5,86 kcal/mol), кофеинска киселина (-5,32 kcal/mol), кверцетин-3-О-рутинозид (-4,79 kcal/mol) и гална киселина (-4,67 kcal/mol). Ова једињења су углавном остварила конвенционалне водоничне интеракције, Пи-Пи и Ван дер Валс-ове интеракције са Ser200 и His440, важним аминокиселинским остацима каталитичке тријаде ацетилхолинестеразе. Поред наведених типова интеракција, угљеник-водоник, Пи-анјон и Пи-алкил интеракције су остварене са Asp72, Gly80, Ser81, Trp84, Gly118, Glu199, Tyr121, Ser122, Trp279, Ser286,

Phe288, Arg289, Phe290, Phe330, Phe331, Tyr334, Gly441 и Tyr442 аминокиселинским остацима ензима ацетилхолинестеразе (табела 15).

Галантамин, коришћен као позитивна контрола у *in vitro* тесту инхибиције ензима, у *in silico* анализи је показао слободну енергију везивања на активно место ензима од -8,99 kcal/mol, што значи да галантамин има већи афинитет везивања у поређењу са испитиваним једињењима из маховине *H. cupressiforme*. Велики број водоничних веза, Ван дер Валс-ових, угљеник–водоник и Пи–алкил интеракција остварен је између галантамина и аминокиселинских остатака ацетилхолинестеразе, и то са Trp84, Glu199, Phe288, Phe290, Phe330, Phe331 и His440 (табела 15).

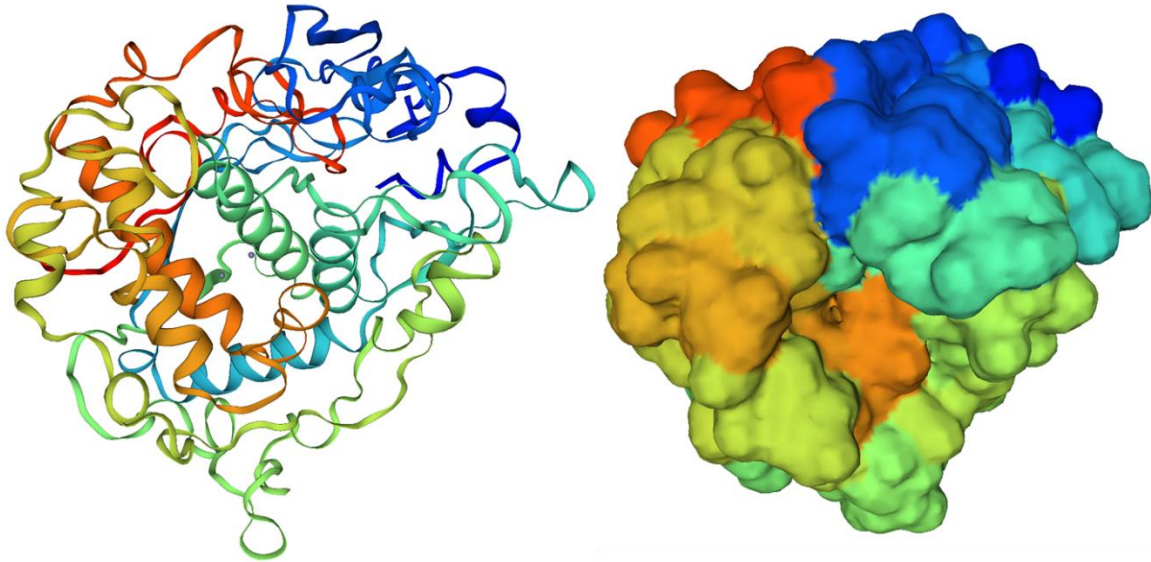
Група једињења која је показала најбољи афинитет везивања за ензим ацетилхолинестеразу били су флавоноиди. Ову групу чини пет једињења: ериодиктиол, ацацетин, апигенин, нарингенин и кемпферол, са њиховим одговарајућим докинг резултатима од -8,80, -8,72, -8,59, -8,52 и -8,39 kcal/mol. Сва ова једињења су интераговала са His440 из активног центра, као и са Asp72, Gly119, Phe330 и Tyr442, док су нека од ових једињења такође реаговала са Trp84, Gly118, Gly119, Ala201, Trp233, Phe290 и Tyr334 (табела 15). Од свих испитиваних секундарних метаболита, ериодиктиол је показао највећи афинитет ка везивању за ацетилхолинестеразу (слика 19).



Слика 19. Приказ 3D интеракција најбоље рангираног секундарног метаболита (ериодиктиол) са активним местом ацетилхолинестеразе.

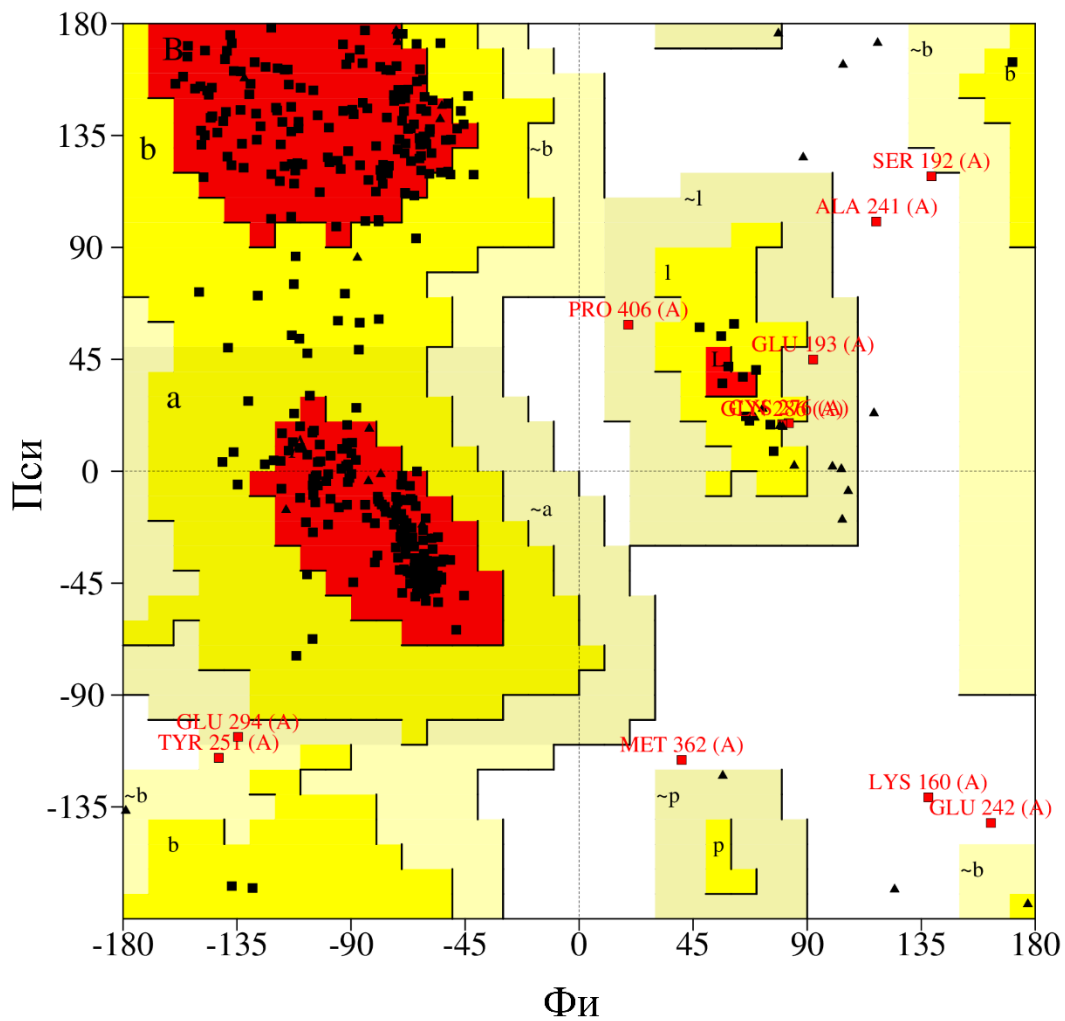
4.8.3 Тродимензионални модел тирозиназе човека

С обзиром на то да тренутно не постоји доступна кристална структура тирозиназе човека на PDB-у, коришћен је приступ заснован на хомоложном моделовању за предвиђање 3D структуре овог ензима. Хомоложно (компаративно) моделовање предвиђа структуру протеина на основу његове сличности у секвенци са хомоложним протеином чија је 3D структура већ позната. Еволутивно сродни протеини са веома сличним секвенцама се називају хомолози, а сличности у њиховим аминокиселинским секвенцама и функцијама обично се огледају у сличним терцијарним структурама. За разлику од *de novo* предвиђања, хомоложно моделовање мање зависи од величине протеина, а у много већој мери на њега утиче проценат идентичности секвенце тражене структуре (енгл. target) и шаблона (енгл. template). Резултат хомоложног моделовања тирозиназе човека помоћу интернет сервера SWISS-MODEL приказан је на слици 20. Процена просечне поузданости модела QMEANDisCo износи $0,74 \pm 0,05$, што указује на добар квалитет добијене тирозиназе човека. Наведене вредности представљају квалитет добијеног модела са бројевима између 0 и 1, при чему већи бројеви означавају вишу поузданост.



Слика 20. Модел тирозиназе човека добијен хомологним моделовањем.

Квалитет добијеног хомологног модела даље је испитан тестирањем геометрије протеина. За визуелну анализу торзионих углова конструисан је Рамачандранов дијаграм који показује стереохемију моделоване структуре мерењем углова веза између аминокиселина. Рамачандранов дијаграм приказан на слици 21 показује да се у моделованој тирозинази 98,7% аминокиселинских остатака налази у енергетски дозвољеном региону, док се само 1,3% структуре (односно 5 аминокиселина) налази у енергетски недозвољеном региону. Ови резултати потврђују валидност предложеног модела и од великог су значаја за његову даљу употребу у молекулском докинг.



Статистика дијаграма

Остаци у највише фаворизованом региону [A, B, L]	324	86,9%
Остаци у додатно дозвољеном региону [a, b, l, p]	39	10,5%
Остаци у генерички дозвољеном региону [~a, ~b, ~l, ~p]	5	1,3%
Остаци у недозвољеном региону	5	1,3%

Слика 21. Рамачандранов дијаграм за моделовану тирозиназу човека.

Енергетски највише фаворизовани региони су означени црвеном бојом, додатно фаворизовани жутом, а крем бојом генерички дозвољени региони. Недозвољени региони су означени белом бојом. Амино киселине у генерички дозвољеним и недозвољеним регионима су означене одговарајућом скраћеницом.

4.8.4 Докинг на тирозиназу из гљиве и моделовану тирозиназу човека

Резултати докинг симулација (енергије везивања (ΔG), константе инхибиције (K_i) и ефикасност лигананда), као и интеракције једињења идентификованих у *H. cupressiforme* са тирозиназом из гљиве и тирозиназом из човека дате су у табелама 16 и 17. На слици 22 су представљене 2D интеракције шест најбоље ранжираних представника из сваке класе секундарних метаболита (дефинисаних према њиховој хемијској структури) са активним местом тирозиназе из гљиве, а на слици 23 су дате 3D интеракције најбоље ранжираних секундарних метаболита са активним местом тирозиназе из гљиве. Када је у питању тирозиназа човека, на слици 24 су представљене 2D интеракције шест најбоље ранжираних представника из сваке класе секундарних метаболита (дефинисаних према њиховој хемијској структури) са активним местом моделоване тирозиназе из човека, а на слици 25 су дате 3D интеракције најбоље ранжираних секундарних метаболита са активним местом ензима.

Табела 16. Резултати докинг симулације и интеракције секундарних метаболита детектованих у екстрактима маховине *H. cupressiforme* са активним местом тирозиназе гљиве.

Једињење	ΔG (kcal/mol)	Ki (μM)	Ефикасност лиганда	Интеракције са Cu ^{+2*}	Интеракције са активним местом*	Интеракције ван активног места*
Којична киселина	-4,52	485,01	-0,45	/	His85	Cys83, Asn320, Glu322
Гална киселина	-6,14	31,36	-0,51	Cu401	His85, His263	Asn260, Phe264, Met280, Val283, Ala286
Протокатеуинска киселина	-6,47	18,00	-0,59	Cu401	His61, His85, His263	Asn260, Met280, Ser282, Val283, Ala286
5-О-Кафеоилхинска киселина	-6,42	19,67	-0,26	/	His85, His263	Met257, Asn260, Thr261, Met280, Gly281, Val283
<i>p</i> -Хидроксибензоева киселина	-6,30	24,28	-0,63	Cu401	His263	Met280, Gly281, Val283, Ala286
Кофеинска киселина	-5,71	65,68	-0,44	/	/	Val283
<i>p</i> -Кумаринска киселина	-6,72	11,86	-0,56	/	His263	Gly281, Val283
Кверцетин 3-О- рутинозид	-7,72	2,21	-0,18	Cu401	His61, His263	His244, Val248, Met257, Asn260, Thr261, Phe264, Arg268, Val283, Ala286
Кверцетин 3-О- глукозид	-5,67	69,73	-0,17	/	/	His244, Val248, Met257, Asn260, Thr261, Phe264, Arg268, Gly281
Изорхамнетин 3-О- глукозид	-5,71	64,91	-0,17	/	His85	His244, Val248, Glu256, Thr261, Phe264, Arg268, Gly281, Val283
Ериодиктиол	-5,29	133,42	-0,25	/	His263	Asn260, Arg268, Pro277, Val283
Апигенин	-5,73	63,52	-0,29	/	His263	Asn260, Arg268, Pro277, Ser282, Val283
Нарингенин	-5,45	100,64	-0,27	/	His263	Asn260, Arg268, Pro277, Val283
Кемпферол	-5,26	139,28	-0,25	Cu400, Cu401	His85, His259, His263	Val248, Glu256, Met280, Val283, Ala286
Ацацетин	-5,39	111,71	-0,26	Cu401	His85, His259, His263	Val248, Met280, Ser282, Val283, Ala286

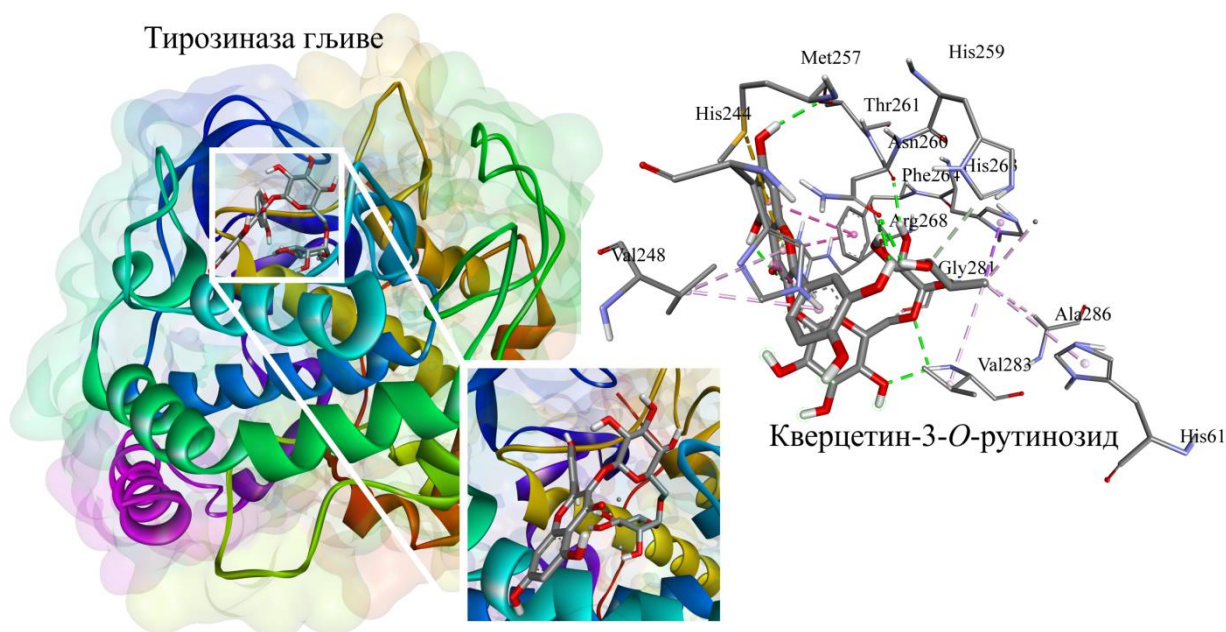
*Ван дер Валс-ове интеракције нису укључене у ову табелу

Табела 17. Резултати докинг симулације и интеракције секундарних метаболита детектованих у екстрактима маховине *H. cupressiforme* са активним местом моделоване тирозиназе човека.

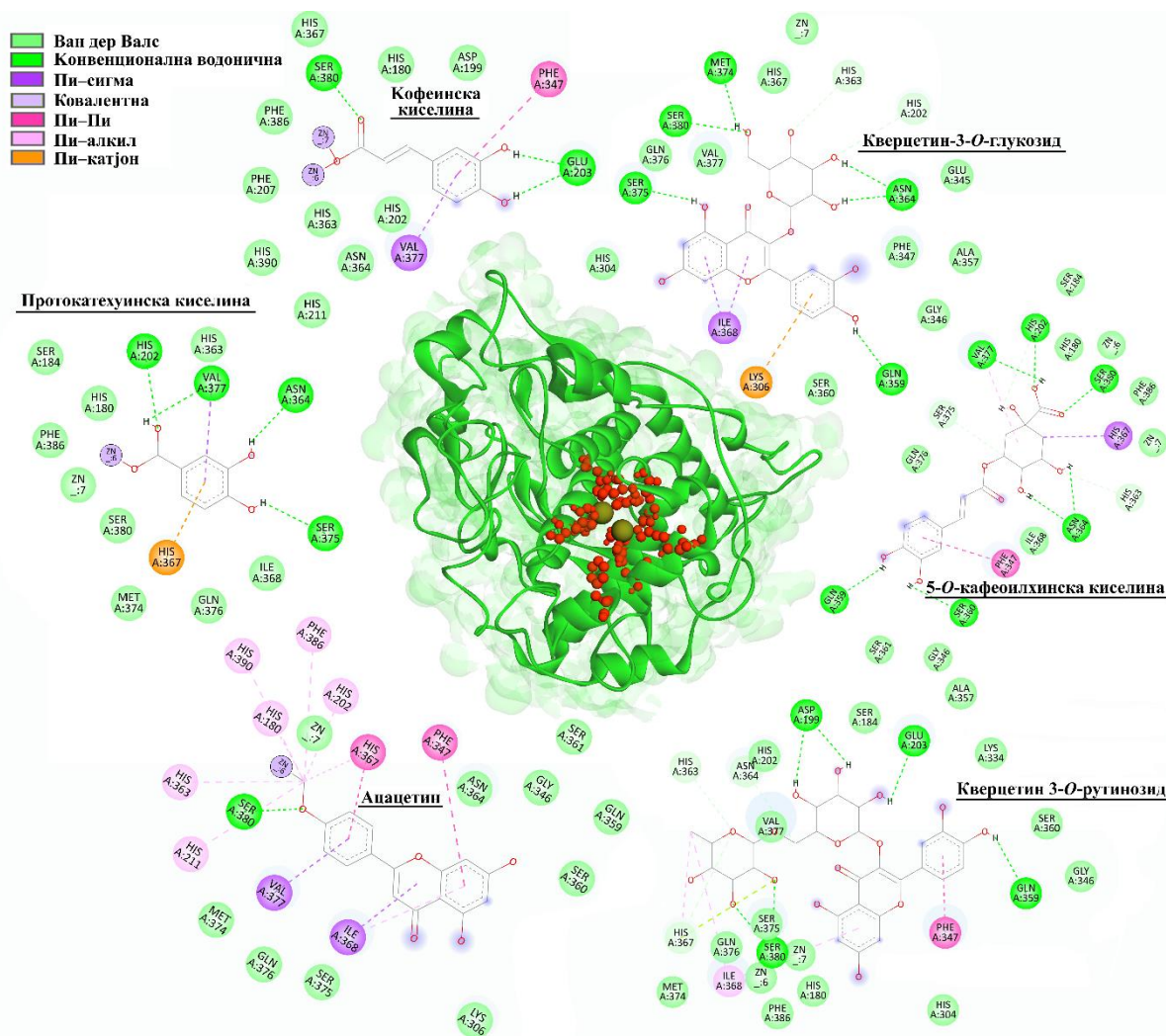
Једињење	ΔG (kcal/mol)	Ki (μM)	Ефикасност лиганда	Интеракције са Zn ^{+2*}	Интеракције са активним местом*	Интеракције ван активног места*
Којична киселина	-4,26	748,3	-0,43	/	His367	Asn364, Met374, Val377, Ser380
Гална киселина	-6,72	11,84	-0,56	Zn6, Zn7	His367	Asn364, Met374, Ser375, Val377
Протокатеуинска киселина	-6,94	8,19	-0,63	Zn6	His202, His367	Asn364, Ser375, Val377
5-О-Кафеоилхинска киселина	-6,70	12,29	-0,27	/	His202, His363, His367	Phe347, Gln359, Ser360, Asn364, Ser375, Val377, Ser380
<i>p</i> -Хидроксибензоева киселина	-6,77	10,93	-0,68	Zn6	His202, His367	Ser375, Val377
Кофеинска киселина	-7,02	7,17	-0,54	Zn6, Zn7	/	Glu203, Phe347, Val377, Ser380
<i>p</i> -Кумаринска киселина	-6,76	11,03	-0,56	Zn6, Zn7	His367	Ser375, Val377
Кверцетин 3-О- рутинозид	-5,65	72,49	-0,13	/	His363, His367	Asp199, Glu203, Phe347, Gln359, Asn364, Ile368, Ser380
Кверцетин 3-О- глукозид	-5,75	61,46	-0,17	/	His202, His363	Lys306, Gln359, Asn364, Ile368, Met374, Ser375, Ser380
Изорхамнетин 3-О- глукозид	-5,59	80,08	-0,16	/	His202, His363	His304, Lys306, Ala357, Gln359, Asn364, Ile368, Ser375, Ser380
Ериодиктиол	-5,92	45,71	-0,28	/	His367	Glu203, Phe347, Met374, Val377, Ser380
Апигенин	-5,66	71,28	-0,28	Zn6	His367	Glu203, Phe347, Val377
Нарингенин	-5,68	68,70	-0,28	Zn6	His367	Glu203, Phe347, Val377
Кемпферол	-6,00	40,00	-0,29	/	His367	Ile368, Ser375, Val377
Ацацетин	-6,27	25,33	-0,30	Zn6	His180, His202, His211, His363, His367, His390	Phe347, Ile368, Val377, Ser380, Phe386

*Ван дер Валс-ове интеракције нису укључене у ову табелу

(слика 22). Главне врсте интеракција између одабраних једињења и аминокиселинских остатака ензима биле су конвенционалне водоничне везе, угљеник–водоник, алкил, Пи–Пи, Пи–сигма, Пи–сумпор, Пи–алкил и Ван дер Валс-ове интеракције. Поред аминокиселина из активног места тирозиназе гљиве (His61, His85, His94, His259, His263 и His296), у остваривању наведених интеракција учествовали су и следећи остаци: His244, Val248, Glu256, Met257, Asn260, Thr261, Phe264, Arg268, Pro277, Met280, Gly281, Ser282, Val283 и Ala286. Којична киселина, као позитиван стандард коришћен у тесту инхибиције ензима, показала је афинитет везивања од -4,52 kcal/mol, што је било слабије од свих једињења испитиваних у овој студији. Од свих испитиваних секундарних метаболита, кверцетин-3-*O*-рутинозид је показао највећи афинитет ка везивању за тирозиназу гљиве (слика 23). Резултати су такође показали да нека од једињења формирају Пи-алкил интеракције са Cu400 и Cu401 (табела 16).



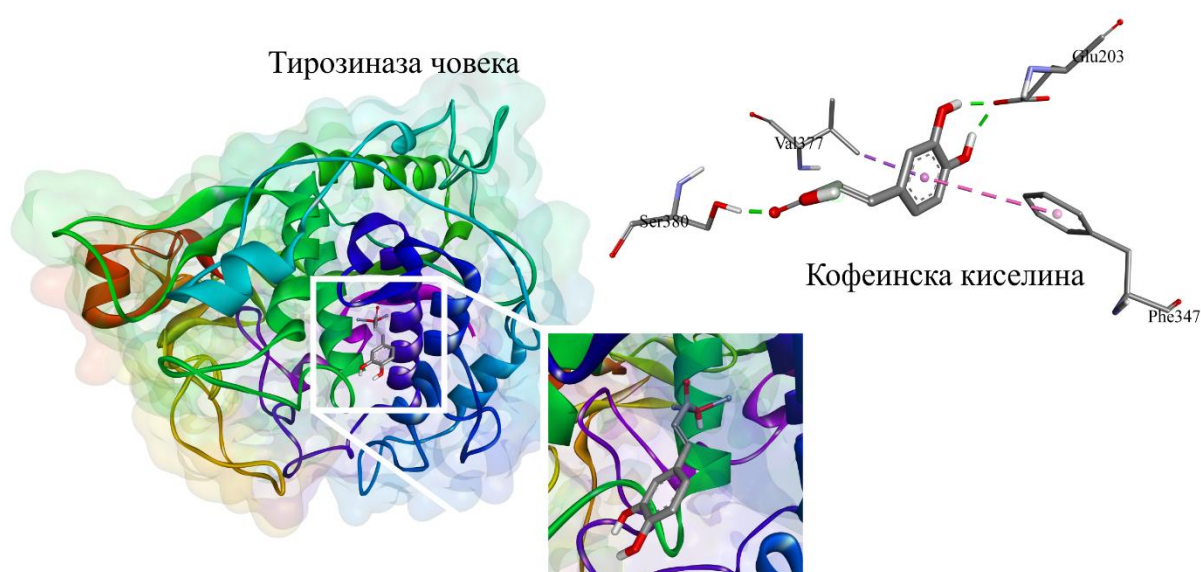
Слика 23. Приказ 3D интеракција најбоље рангираног секундарног метаболита (кверцетин-3-*O*-рутинозид) са активним местом тирозиназе гљиве.



Слика 24. 2D интеракције шест најбоље ранжираних представника из сваке класе секундарних метаболита (дефинисаних према њиховој хемијској структури) са активним местом (обележено црвено) моделоване тирозиназе човека. Јони Zn^{2+} су обележени маслинасто зелено.

На основу резултата докинг симулација извршених на тирозинази човека, следећи представници шест група једињења изабрани су као најбоље ранжирани: кофеинска киселина (-7,02 kcal/mol), протокатехуинска киселина (-6,94 kcal/mol), 5-О-кафеоилхинска киселина (-6,70 kcal/mol), ацацетин (-6,27 kcal/mol), кверцетин-3-О-глукозид (-5,75 kcal/mol) и кверцетин-3-О-рутинозид (-5,65 kcal/mol) (слика 24). Главне интеракције између једињења и тирозиназе човека биле су конвенционалне водоничне везе, угљеник–водоник, алкил, Пи–Пи, Пи–сигма, Пи–алкил, Пи–катјон и Ван дер Валс-ове интеракције. Аминокиселине које су оствариле ове интеракције у активном месту ензима су: His180, His202, His211, His363, His367 и His390. Поред ових, и други

остаци, укључујући Asp199, Glu203, Lys306, Phe347, Gln359, Asn364, Ile368, Met374, Ser375, Val377, Ser380 и Phe386, формирали су интеракције са једињењима (табела 17). Афинитет везивања којичне киселине за тирозиназу човека је био $-4,26 \text{ kcal/mol}$, што је био слабији афинитет него код тирозиназе гљиве ($-4,52 \text{ kcal/mol}$). Од свих испитиваних секундарних метаболита, кофеинска киселина је показала највећи афинитет везивања за тирозиназу човека (слика 25). Такође је примећено да једињења кофеинске киселине, протокатехуинске киселине и ацетина реагују са јонима цинка (ацетин и протокатехуинска киселина са Zn6, док је кофеинска киселина реаговала и са Zn6 и Zn7).

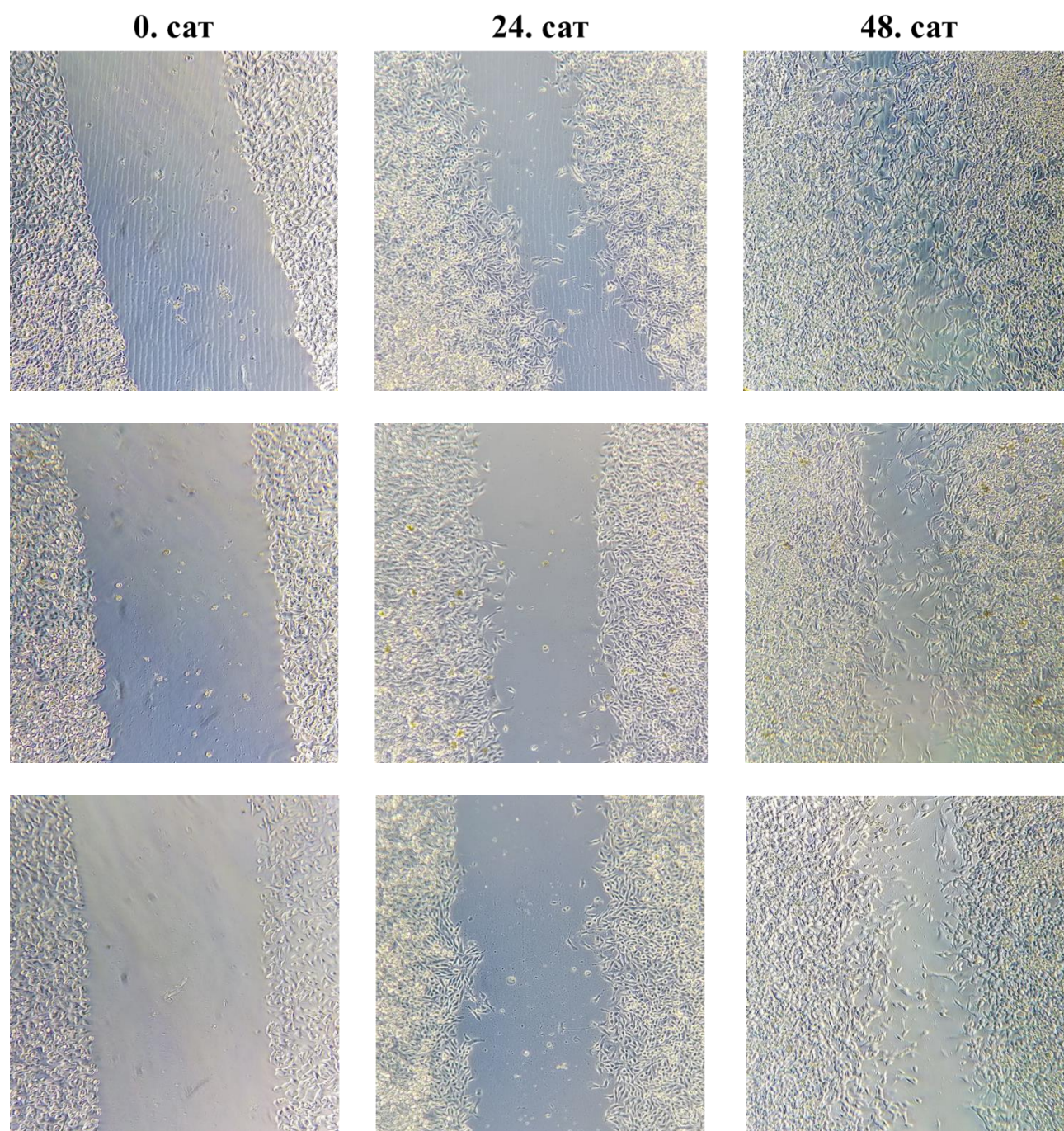


Слика 25. Приказ 3D интеракција најбоље рангираног секундарног метаболита (кофеинска киселина) са активним местом моделоване тирозиназе човека.

4.9 Утицај екстраката на миграцију ћелија у *in vitro* моделу зарастања рана

Утицај екстраката маховине *H. cypressiforme* сакупљене током лета (Л-4) и јесени (Ј-4) на зарастање монослоја L929 мишићних фибробласта је процењено помоћу такозваног „scratch“ есеја. У свим праћеним временским интервалима (0, 24 и 48 сати) на месту огреботине ћелијског монослоја одређени су просечна ширина повреде (μm) и стопа миграције ћелија (%), што је упоређено са нетретираним, контролним ћелијама. Репрезентативне микрографије добијене за контролу, као и екстракте из лета и јесени у

концентрацији од 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ су приказане на слици 26, док се у табели 18 налазе подаци о просечној ширини повреде и стопи миграције ћелија.



Слика 26. Репрезентативне микрографије добијене за контролу (К) и етил-ацетатне екстракте маховине *H. cypressiforme* из лета (Ј-4) и јесени (Ј-4) на месту огреботине ћелијског монослоја L929, током праћених временских интервала (0, 24 и 48 сати).

Табела 18. Просечна ширина повреде (μm) и стопа миграције ћелија (%) за контролу (К) и етил-ацетатне екстракте маховине *H. cupressiforme* из лета (Л-4) и јесени (Ј-4) на месту огреботине ћелијског монослоја L929, током праћених временских интервала (0, 24 и 48 сати).

Узорци	0. сат		24. сат		48. сат	
	Просечна ширина повреде (μm)	Стопа миграције ћелија (%)	Просечна ширина повреде (μm)	Стопа миграције ћелија (%)	Просечна ширина повреде (μm)	Стопа миграције ћелија (%)
К	894,70 \pm 9,07	0	419,73 \pm 19,73	53,09	102,39 \pm 10,06	88,56
Л-4	943,50 \pm 8,56	0	500,80 \pm 20,34	46,92	180,36 \pm 19,56	80,88
Ј-4	962,35 \pm 6,69	0	583,41 \pm 25,73	39,38	211,21 \pm 16,89	78,05

Вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна грешка (n=10)

Просечна ширина повреде за контролне ћелије је у 0. сату износила 894,70 \pm 9,07 μm , док је у 48. сату ширина смањена на 102,39 \pm 10,06 μm , што у процентима представља стопу миграције ћелија од 88,56%. Просечне ширине повреда код ћелија третираних екстрактима маховине из лета и јесени у старту (0. сату) биле су веће и износиле 943,50 \pm 8,56 μm (Л-4) и 962,35 \pm 6,69 μm (Ј-4), а након 48. сата су смањене на 180,36 \pm 19,56 μm (Л-4) и 211,21 \pm 16,89 μm (Ј-4). Процентуално гледано, стопе миграције ћелија третираних екстрактима биле су 80,88% за Л-4 и 78,05% за Ј-4, што је мање од стопе миграције контролних, нетретираних ћелија. На основу добијених резултата може се закључити да испитивани екстракти маховине *H. cupressiforme* из летње (Л-4) и јесење сезоне (Ј-4) не доводе до повећане миграције L929 ћелија мишјих фибробласта и да, у односу на нетретиране ћелије (К), ниједан екстракт није довео до убрзања „зарастања ране“ у коришћеном *in vitro* моделу повреде.

5 ДИСКУСИЈА

Имунски систем има веома важну улогу у регулисању различитих физиолошких параметара у организму, односно у одржавању хомеостазе организма. Функционалан имунски систем пре свега има одбрамбену функцију да штити организам од инфекција и болести које настају као последица инфекције, а то постиже помоћу софистицираних механизма и сложених интеракција компоненти урођеног и стеченог имунског система. Међутим, познато је да је имунски систем укључен у етиологију и патофизиологију многих болести [142]. У савременом свету многе болести настају као последица сувише снажне или пак слабе активације имунског система, због чега се јавља потреба за имуномодулацијом. Модулација функције имунског система се односи на било какву промену у имунском одговору, укључујући стимулацију, повећану експресију, или инхибицију различитих компоненти или неког од стадијума имунског одговора [143, 144]. Дакле, имуномодулатори су супстанце које остварују стимулишући или инхибиторни ефекат на имунски систем, на тај начин га припремајући за различите претње из спољашње или унутрашње средине. На тржишту је доступно много синтетских имуномодулаторних лекова који поред високе цене испољавају различите нежељене ефекте, а неки од њих су и токсични, због чега се јавила потреба за проналажењем сигурнијих алтернативних имуномодулатора. Имунофармакологија је нова грана фармакологије у развоју, која има за циљ да идентификује нове потенцијалне имуномодулаторе [144]. Бројне новије студије у имунофармакологији су усмерене ка развоју имуномодулатора природног порекла, при чему су различите биљке и њихове активне компоненте међу највише истраживаним имуномодулаторним агенсима [142-144].

Биљке се од давнина користе у лечењу различитих патолошких стања код човека, а њихов имуномодулаторни потенцијал је испитан у великом броју студија [143-145]. Многа једињења биљног порекла, као што су стероли, полисахариди, алкалоиди, терпени, флавоноиди и фенолне киселине користе се као имуномодулатори [144]. Ова једињења могу стимулисати имунски систем и на тај начин помоћи у борби против различитих тумора и инфекција, док са друге стране могу да ограниче претеран и сувише снажан имунски одговор који се налази у основи многих инфламаторних болести. Иако бриофите представљају другу по распрострањености групу биљака (након цветница), њихов имуномодулаторни потенцијал је тек недавно почео да се истражује. Због изузетне структурне и хемијске разноликости једињења идентификованих у бриофитама, а посебно у маховинама, овим биљкама се у последње

време посвећује много више пажње. Секундарни метаболити који се налазе у саставу екстраката маховина показали су биолошке активности као што су антибактеријска, антифунгална и антивирусна, затим антиоксидативна, антитуморска, анти-инфламаторна и антидијабетична [13, 15, 24, 54, 72]. Стога су маховине постале предмет истраживања великог броја студија у којима се испитује њихов биолошки потенцијал и могућа употреба за развој нових терапеутика [11, 12, 15, 23, 73].

Маховине производе широк спектар секундарних метаболита који им помажу да се изборе против различитих биотичких и абиотичких стресова попут микроорганизама, инсеката, ултраљубичастог зрачења, високих температура и суша. Стога, хемијски састав маховина, а тиме и њихова биолошка и имуномодулаторна активност, веома зависе од фактора спољашње средине, и мењају се са променом годишњег доба, места раста, и уопште локалних услова средине у којој маховине расту. С обзиром на то да су студије о сезонским варијацијама у хемијском саставу и биолошкој активности маховина оскудне, а да су фактори спољашње средине веома битни када је реч о овим параметрима, истраживања која би допринела проналажењу оптималних услова за бербу врсте од интереса имају велики значај. Врста која је била главни фокус ове докторске дисертације је *H. cupressiforme*, плеурокарпна маховина из рода *Hypnum*. Ова маховина је веома распрострањена како у Србији тако и у региону. Упркос распрострањености и њеној познатој традиционалној употреби, студије о хемијском саставу и биолошкој активности ове маховине су малобројне и обично укључују анализу антиоксидативног, антимикробног и/или антитуморског потенцијала њених екстраката [54, 146, 147]. Стога је главни циљ ове докторске дисертације био да се испита хемијски састав и биолошки потенцијал различитих екстраката маховине *H. cupressiforme* са подручја Вршачких планина (Србија). Поред тога, имајући у виду претходно описан значај фактора спољашње средине, испитан је и утицај промена годишњих доба (пролеће, лето и јесен) на састав секундарних метаболита и биолошку активност екстраката маховине *H. cupressiforme*. Пошто се зима генерално сматра периодом мировања за биљке, укључујући и неке бриофите [29, 148], зимски аспект маховине *H. cupressiforme* није био укључен у ову студију.

Имуномодулаторни потенцијал биљака, па и маховина, у великој мери зависи од хемијског састава екстраката добијених од биљке. Принос екстракције и хемијски састав самог екстракта зависе од начина екстракције, врсте растварача, масено-запреминског односа биљке и растварача, као и температуре и времена екстракције

[149]. Постоји неколико техника екстракције, а када је екстракција биљака у питању, највише се користе мацерација, перколација, Сокслет екстракција, микроталасна екстракција, ултразвучна екстракција, као и екстракција суперкритичним флуидима [150, 151]. Свака од ових техника има одређене предности и недостатке, а који се односе на трајање екстракције, количину и врсту растварача и биљног материјала, као и температуре које се користе. На пример, мацерација је погодна за биљни материјал који захтева дуго излагање растварачу, док се технике попут микроталасне или ултразвучне екстракције користе за кратке временске интервале. Мацерацијом се троше велике количине растварача, и последично добијају екстракти великих запремина, док се уз помоћ Сокслет или микроталасне и ултразвучне екстракције користи мање растварача, а екстракти који се добију су концентрованији и лакши за упаравање [150]. Правилан избор технике за екстракцију је веома значајан и од њега у великој мери зависи састав добијеног екстракта. Када су у питању бриофите, користе се готово све претходно набројане технике екстракције, а у једној студији се за маховине *Rhytidiadelphus triquetrus* и *Sphagnum rubellum* као најефикаснија издвојила микроталасна екстракција [26]. Екстракти добијен на овај начин имали су највећи садржај укупних фенола као и најбољу антиоксидативну активност процењивану ДППХ тестом [26].

Поред технике, још један битан параметар екстракције је избор растварача. Избор растварача за екстракцију зависи од растворљивости циљних једињења, интеракције између растварача и биљке, као и од апсорбујућег својства растварача. Пожељно је да растварач има високу селективност према једињењима од интереса, а да истовремено не доводи до екстракције нежељених компоненти биљке. Својства растварача могу се променити комбиновањем различитих растварача, што такође доводи до различите селективности за једињења од интереса. За екстракцију фенолних једињења из биљака најчешће се користе растварачи као што су етанол, метанол, етил-ацетат, ацетон, вода и њихове комбинације [74]. С обзиром на то да се фенолна једињења из биљног материјала доста разликују по својој поларности, у раду се често прибегава примени растварача различите поларности. Вода као растварач има изузетну способност екстракције великог броја различитих једињења, а њену практичну примену олакшава и њена нетоксичност [150]. Међутим, вода као растварач поседује и одређене недостатке као што су изазивање хидролитичке разградње једињења, растварање различитих неактивних супстанци (баластне материје), као и омогућавање

развоја микроорганизама [152]. Због недостатака које вода као растварач поседује, за екстракцију поларних једињења из биљака често се користе и водено-етанолне смеше, односно раствори етанола различитих концентрација. Етанол је као растварач селективнији у односу на воду, и показано је да ефикасно изолује активне супстанце, а врло мало баластне материје. Етанол је, као и вода нетоксичан, стога се екстракти добијени помоћу ових растварача могу без већих проблема користити у фармацеутској и прехранбеној индустрији [153]. Са друге стране, етанол је испарљив и запаљив, о чему се мора водити рачуна када се са њим ради [143]. Повећањем удела воде у смеси воде и етанола, повећава се и поларност смеше, те се финим подешавањем односа воде и етанола могу добити смеше различитих поларности погодне за екстракцију различитих једињења. Међутим, слаба растворљивост одређених једињења која су присутна у биљкама у води и етанолу захтевају примену неполарнијих растварача како би се издвојила из биљке, а за ове сврхе се користе растварачи као што су етил-ацетат, хлороформ или етар [154]. Ови растварачи имају способност екстракције различитог профила једињења, а с обзиром на то да су токсични, њихово уклањање из готовог производа је обавезно.

У циљу испитивања оптималног растварача за екстракцију маховине *H. cupressiforme* прикупљене у пролеће, у овој дисертацији испитани су следећи поларни и неполарни растварачи и њихове смеше: вода, 96% етанол, смеша етанола и воде (однос 1:1) и етил-ацетат, а за екстракцију је коришћена Сокслет апаратура. Приноси екстракција маховине прикупљене током пролећа опадали су са смањењем поларности (смеше) растварача, а њихов редослед је био следећи: вода > смеша вода/етанол > етанол > етил-ацетат. Многи истраживачи су у својим студијама дошли до сличних резултата и закључака о утицају промене поларности растварача на степен приноса екстракције различитих биљних врста [152, 155, 156], па и бриофита [157]. Наиме, повећање садржаја воде у систему растварача доводи до бубрења биљног материјала што резултује повећањем површине контакта између биљке и растварача, и на крају повећањем приноса [149]. Такође, као што је претходно речено, вода има способност растварања различитих неактивних супстанци, односно баластних материја, због чега се углавном и добијају већи приноси коришћењем воде као растварача. Међутим, како биолошка активност, па и хемијски састав биљке не зависе директно од приноса екстракције у квантитативном смислу, приликом одређивања оптималних услова екстракције неопходно је сагледати ширу слику и узети у обзир неколико параметара

пре него што се донесе закључак о најбољем начину и растварачу за екстракцију за одређену врсту [26]. На основу циља који жели да се постигне након екстракције, постављају се и параметри који се прате и на основу којих се бира најпогоднија метода и растварач за екстракцију. У те сврхе најчешће се у студијама прате параметри као што су укупан садржај фенола (или других класа секундарних метаболита од интереса) и антиоксидативни капацитет [26], али у зависности од жељеног циља и активности од интереса, могу да се прате и остали параметри, на пример антидијабетична, антитуморска, анти-инфламаторна, али и многе друге активности.

Резултати поређења приноса етил-ацетатних екстраката маховине сакупљене у пролеће, лето и јесен показали су да принос екстракције опада на следећи начин: јесен > лето > пролеће. У литератури нема много података о разлици у приносу екстраката бриофита у односу на годишње доба, а једна студија је показала да су приноси екстракције неколико врста маховина (*Sphagnum magellanicum*, *Sphagnum fallax* и *Sphagnum fuscum*) у пролеће били већи него у јесен [158]. Међутим, како поред годишњег доба постоји низ фактора који утичу на принос екстракције (као што су техника екстракције, растварач, локалитет и састав земљишта на коме су биљке сакупљене, и други), а с обзиром на то да експериментални услови ове студије нису били једнаки условима коришћеним у овој дисертацији у погледу растварача и технике екстракције, треба бити пажљив приликом тумачења и поређења резултата. У условима коришћеним у овој дисертацији, а то су екстракција маховине *H. cupressiforme* сакупљене на Вршачким планинама у Србији, употребом Сокслет апаратуре и етил-ацетата као растварача, најбољи принос је добијен за јесењи аспект маховине, у поређењу са пролећним и летњим аспектом.

Хемијска карактеризација екстраката маховине извршена је спектрофотометријским тестовима (одређивањем садржаја укупних фенола, фенолних киселина, флавоноида, флавонола, тритерпеноида и кумарина) и течном хроматографијом спрегнутом са масеном спектрометријом. На основу резултата спектрофотометријских испитивања, може се закључити да су у различитим екстрактима маховине *H. cupressiforme* прикупљене у пролеће детектоване све класе испитиваних секундарних метаболита осим кумарина, а да је највећа концентрација добијена када се као растварач користио етил-ацетат. У претходним студијама у којима је одређен укупан садржај фенолних једињења у етанолнима екстрактима *H. cupressiforme* из Турске и из Пољске детектовано је мање укупних фенола; 4,10 mg

ЕГК/100 g екстракта [159] и 1 mg ЕГК/g екстракта [15] у односу на њихов садржај у етанолном екстракту у овој дисертацији (6,25 mg ЕГК/g екстракта). Са друге стране, садржај укупних фенола у маховини из Грузије био је нешто виши него што је добијен у овој дисертацији (11,3 mg ЕГК/g екстракта) [160]. Садржај фенолних једињења у биљкама зависи од неколико фактора укључујући годишње доба, географски локалитет, тип земљишта, стање животне средине или гео-/гено-тип [23, 161], а велики утицај имају и тип екстракције као и растварачи коришћени за екстракцију [23]. Неки од ових фактора су допринели разлици у садржају фенолних једињења у екстрактима ове маховине, с обзиром на то да су се испитиване маховине разликовале како по географском локалитету и годишњем добу прикупљања, тако и по начину екстракције. Када су у питању фенолне киселине, флавоноиди, флавоноли, тритерпеноиди и кумарини, детаљном претрагом литературе је утврђено да не постоје студије оваквог типа са маховином *H. cupressiforme*. Само у једној студији урађена је квалитативна анализа екстракта маховине *H. cupressiforme*, где је потврђено присуство одређених класа једињења као што су антрахинони, терпеноиди, флавоноиди и алкалоиди [162], али њихов укупан садржај, односно тачне концентрације нису одређене. Стога, преглед доступне литературе указује да су у овој докторској дисертацији први пут приказани подаци о фенолним киселинама, флавоноидима, флавонолима, тритерпеноидима и кумаринима у екстрактима маховине *H. cupressiforme*.

Испитивањем сезонских варијација у концентрацији различитих класа секундарних метаболита у овој дисертацији утврђено је да је у маховини *H. cupressiforme* највећи садржај готово свих испитиваних секундарних метаболита (изузев кумарина) присутан током лета. Повећана заступљеност ових једињења током лета вероватно је последица одговора маховине на повећан стрес као што су високе температуре, суша и ултраљубичасто зрачење, што је карактеристика многих биљака [145]. У литератури су примећени различити обрасци понашања међу бриофитама када су у питању промене годишњих доба. Док се у неким бриофитама највише секундарних метаболита синтетише током лета, у другима је концентрација фенолних једињења највећа у пролеће и постепено опада током сезоне [27, 163]. Овакви подаци говоре у прилог томе да бриофите на сезонске промене реагују специфично, односно да одговор на промене годишњег доба зависи од саме врсте. Поред тога, треба узети у обзир и могућност синергизма/антагонизма између различитих секундарних метаболита, као и географски локалитет врсте. Са тим у вези, сви узорци маховине

коришћени у овој дисертацији сакупљени су на истој локацији и из исте популације (Вршачке планине, Србија), док је регенерација документована као вегетативна одсуством полних органа. Због тога се варијације у садржају секундарних метаболита екстраката могу приписати климатским карактеристикама различитих годишња доба, као што су флукуације температуре, падавина, влажности ваздуха и/или трајање и интензитет сунчевог зрачења. Имајући у виду све претходно наведено, студије о сезонским варијацијама у хемијском саставу маховина су од изузетног значаја за одређивање годишњег доба које је најпродуктивније за врсту од интереса. За маховину *H. cupressiforme* са Вршачких планина, на основу резултата ове дисертације, утврђено је да је годишње доба током кога је испољен највећи садржај испитиваних секундарних метаболита лето.

Уз помоћ течне хроматографије спрегнуте са масеном спектрометријом у овој докторској дисертацији идентификовано је 14 фенолних киселина и флавоноида у различитим екстрактима маховине *H. cupressiforme* прикупљене током пролећа. Најзаступљенија фенолна једињења присутна у овој маховини биле су фенолне киселине: *p*-хидроксибензоева, протокатехуинска, *p*-кумаринска, гална и кофеинска киселина, као и флавоноид – кемпферол. Ова једињења су била неравномерно распоређена међу испитиваним екстрактима маховине, што је последица различите растворљивости у коришћеним растварачима, а истиче и значај коришћења више од једне врсте растварача приликом екстракције. Присуство кемпферола у екстрактима маховине *H. cupressiforme* је потврђено раније [164], док су остала једињења први пут детектована у екстрактима маховине у овој докторској дисертацији. Поред кемпферола, у истој студији су из метанолних екстраката гаметофита ове маховине изолована два нова бифлавоноида (хипногенол Б1 и хипнум бифлавоноид А) и два нова фенил-супституисана деривата аромадендрина (хипнумска киселина и метилестар хипнумске киселине) [164], а у студији која је претходила овој први пут су откривени деривати аромадендрина у маховини *H. cupressiforme* [37]. У етарском уљу ове маховине детектовани су различити моно-, сескви- и дитерпени, као и алдехиди и угљоводоници (укупно 29 једињења) [165]. Нека од једињења идентификована у овој докторској дисертацији у *H. cupressiforme* помоћу течне хроматографије спрегнуте са масеном спектрометријом, укључујући *p*-хидроксибензоеву, кофеинску, 5-О-кафеоилхинску, *p*-кумаринску, протокатехуинску киселину и апигенин, откривена су и у другим врстама маховина [13, 166]. С обзиром на то да једињења детектована у

екстрактима маховине *H. cypressiforme* показују низ биолошких активности и могу бити корисна у терапији различитих патолошких стања код људи [9, 38, 44, 167, 168], наредни корак у овој дисертацији представљао је одређивање имуномодулаторних активности екстраката укључујући антиоксидативну, антитуморску, антинеуроинфламаторну, као и антидијабетичну и потенцијал у побољшању зарастања ране.

Имајући у виду значај оксидативног стреса у регулацији/дисрегулацији различитих механизма имунског одговора, а самим тим и потребу за применом антиоксиданата у третману патолошких стања повезаних са дисрегулацијом имунског одговора, у овој докторској дисертацији испитан је антиоксидативни потенцијал екстраката маховине *H. cypressiforme*. Резултати су показали слабу до умерену активност у односу на коришћене стандардне супстанце – БХА, БХТ и аскорбинску киселину. Претходне студије о нивоу инхибиције ДППХ радикала показале су различит антиоксидативни потенцијал екстраката ове маховине, од ниске до високе. На пример, у једној студији екстракт маховине *H. cypressiforme* из Грузије показао је активност у уклањању ДППХ радикала од 7,2% [160], а у другој је та активност за метанолни екстракт маховине из Турске износила од 7% до 58% у зависности од концентрације екстракта [169]. У овој дисертацији проценат уклањања ДППХ радикала од стране екстракта при највишој концентрацији достигао је 23%. Сви ови резултати говоре у прилог чињеници да екстракти маховине *H. cypressiforme* имају умерену или добру антиоксидативну активност у тесту уклањања ДППХ радикала. Са друге стране, у литератури постоје подаци и о високој антиоксидативној активности метанолног екстракта маховине *H. cypressiforme* из Турске, добијеног помоћу Соклет екстракције [54]. Активност у уклањању ДППХ радикала зависи од много фактора, као што су растварач за екстракцију или процедура екстракције у целини, различита концентрација радикала или екстракта коришћена у експерименту, географски локалитет раста биљке, различити услови на месту раста, годишње доба, и други [170]. Генерално, сматра се да су најефикаснија једињења у уклањању ДППХ радикала фенолна једињења, која могу да донирају атом водоника из своје хидроксилне групе и тако неутрализују радикал [171]. У литератури се често наводи да је укупан садржај фенолних једињења у директној корелацији са антиоксидативном активношћу мереном ДППХ тестом. У овој дисертацији, етил-ацетатни и водени екстракти маховине сакупљене у пролеће су имали највећи садржај укупних фенолних једињења, а

показали су и најбољу антиоксидативну активност међу пролећним екстрактима, што говори о директном тренду између заступљености фенолних једињења и антиоксидативне активности. Међутим, када се упореде сезонске варијације у саставу секундарних метаболита и испољеној антиоксидативној активности мереној ДППХ тестом, може се приметити да екстракти маховине сакупљене у лето имају највећи садржај готово свих испитиваних секундарних метаболита, али да екстракти маховине из пролећа ипак показују већу активност. Док је у васкуларним биљкама садржај фенола и флавоноида обично у директној корелацији са капацитетом биљке за уклањање радикала [172], код маховина то није увек случај [166], тако да иако маховине садрже фенолна једињењима, чини се да је њихова активност уклањања радикала нижа од активности васкуларних биљкама. Ово може бити разлог зашто испитивани екстракти у овој дисертацији нису показали високу активност уклањања ДППХ радикала упркос детектованим фенолним једињењима у њима. Такође, треба напоменути и да је удео фенолних једињења у маховини испитаној у овој дисертацији, али и уопште у бриофитама, генерално нижи у односу на васкуларне биљке [173].

Даље је антиоксидативни потенцијал испитиваних екстраката маховине *H. cupressiforme* процењиван и одређивањем укупног редукционог потенцијала и то први пут у овој дисертацији. Резултати су показали слабу до умерену активност у односу на коришћене стандардне супстанце. У литератури се могу пронаћи студије у којима су екстракти ове маховине испитани помоћу теста који се заснива на истом реакционом механизму, односно редукцији јона гвожђа из феро у фери облик, а то је FRAP (енгл. Ferric reducing antioxidant power) тест. Резултати ових студија су показали ниске до умерене активности етанолних екстраката ове маховине из Пољске [15] и Турске [159], што је у складу са резултатима добијеним у овој докторској дисертацији и указују на чињеницу да маховина *H. cupressiforme* не поседује значајан редукциони потенцијал у *in vitro* условима мерен овим тестом.

У тесту инхибиције избељивања β -каротена добијена је значајна активност, а посебно за етил-ацетатне екстракте маховине за сва три испитивана годишња доба (пролеће, лето и јесен). У концентрацијама од 100, 50 и 10 $\mu\text{g/mL}$ ови екстракти су показали значајну инхибиторну активност у поређењу са истим концентрацијама стандардне супстанце АК, док је активност истих екстраката на вишим концентрацијама (1000 и 500 $\mu\text{g/mL}$) била веома слична као активност АК на истим концентрацијама, са изузетком екстракта маховине сакупљене у лето, који је на

највишој тестираној концентрацији показао значајно већу активност него стандард АК. Након детаљне претраге литературе, утврђено је да је у овој дисертацији први пут одређена активност екстраката маховине *H. cupressiforme* употребом β -каротен теста. Овај тест се генерално користи за одређивање антиоксидативне активности липофилних једињења [174], стога не зачуђује што су управо етил-ацетатни екстракти показали највећу активност, с обзиром на то да је међу растварачима коришћеним за екстракцију у овој дисертацији етил-ацетат био најнеполарнији. Поређењем активности екстраката маховине из различитих годишњих доба, долази се до закључка да на вишим концентрацијама најбољу активност има екстракт маховине сакупљене током лета, а на најнижим концентрацијама екстракт маховине из пролећа. Маховина је током лета и пролећа изложена вишим температурама и екстремнијим условима средине, стога је и већа потреба биљке за антиоксидативном заштитом, што може бити једно од објашњења за детектовану активност екстраката маховине *H. cupressiforme* у овој дисертацији. Ова претпоставка је у складу и са постојећим литературним подацима, који указују да маховине испољавају већу антиоксидативну ензимску активност током лета [175], а у неким случајевима и током пролећа [27]. Антоцијанини и флавоноли поседују високу активност у тесту инхибиције избељивања β -каротена, а затим флаваноли и фенолне киселине [176]. Нека од ових једињења као што су кемпферол, гална и кофеинска киселина [176] идентификована у испитиваним екстрактима, вероватно су допринела инхибиторној активности детектованој овим тестом. Већа активност током пролећа и лета је у складу и са садржајем тритерпеноида у испитиваним екстрактима, за које је такође утврђено да доприносе антиоксидативној активности [177]. Међутим, пошто је познато да ниво антиоксидативне активности појединачних једињења не одражава нужно и укупни антиоксидативни капацитет екстраката (због могућности синергистичких и антагонистичких интеракција), закључке о доприносу појединачних једињења укупном антиоксидативном капацитету биљке треба доносити са резервом, поготово узимајући у обзир да у испитиваним екстрактима постоји значајан број једињења која још увек нису идентификована.

На основу свих резултата антиоксидативне активности може се закључити да испитивани екстракти маховине *H. cupressiforme* своју антиоксидативну активност остварују највише заштитом других антиоксидативних супстанци (принцип β -каротен/линолна киселина теста), а мање директним уклањањем слободних радикала и/или редукцијом јона гвожђа. Овакви резултати јасно показују значај примене више

од једне аналитичке методе при процени антиоксидативне активности нових, раније неокarakterисаних екстраката. С обзиром на то да антиоксидативна активност екстраката зависи од великог броја фактора као што су хемијско окружење, коришћени тест, међусобне интеракције присутних активних супстанци, и други, као и на постојање великог броја како тестова за процену антиоксидативног капацитета, тако и појединачних једињења у саставу биљака, не може се очекивати да се све компоненте и механизми појединачно тестирају. Због тога, овакве резултате треба веома пажљиво анализирати, а приликом поређења антиоксидативних карактеристика различитих биљака (или истих биљака у различитим условима) треба узети у обзир комплексну природу како самог екстракта, тако и предности и недостатке тестова за процену антиоксидативне активности. Такође, резултати добијену применом *in vitro* тестова не морају нужно да указују на антиоксидативну активност супстанце примењене *in vivo* [178]. Међутим, резултати антиоксидативне активности мерене *in vitro* тестовима представљају добру полазну основу за одређивање антиоксидативног потенцијала, поготово нових, претходно неиспитаних биљних екстраката [178]. У том смислу, дефинисање антиоксидативног потенцијала екстраката од интереса може бити од великог значаја за њихову потенцијалну примену у случају болести чија се етиологија и прогресија повезује са последицама оксидативног стреса.

Оксидативни стрес се налази у основи дијабетеса, и то у случајевима имунски посредованог типа 1, али и типа 2 у чијој основи није имунски поремећај [179]. Како су екстракти маховине показали добар антиоксидативни потенцијал, следећи корак у овој дисертацији било је одређивање њиховог антидијабетичног потенцијала. Иако у литератури постоји неколико студија о антидијабетичном потенцијалу бриофита [9, 13], у овој дисертацији је први пут одређена антидијабетична активност маховине *H. cypressiforme*, и то на основу инхибиције ензима α -амилазе и α -глукозидазе, који катализују кључне кораке у дигестији угљених хидрата из хране. Испитивана маховина је показала слаб инхибиторни потенцијал ка α -амилази, са највећом инхибицијом ензима од око 15% и то само на највишој концентрацији етил-ацетатних екстраката. Са друге стране, етил-ацетатни екстракти из свих испитиваних годишњих доба су снажно инхибирани α -глукозидазу, показујући неколико пута бољи ефекат од стандардне антидијабетичне супстанце акарбозе. Од осталих растварача коришћених за екстракцију, добро се показала и вода, док су екстракти припремљени применом етанола и меша воде и етанола имали ниску активност. Међу испитиваним сезонским

аспектима, најбоље су се показали екстракти маховине прикупљене у лето и јесен, поготово на најнижим тестираним концентрацијама. Ови екстракти су показали обрнут концентрациони градијент при инхибицији ензима, односно више су инхибирали ензим при нижим тестираним концентрацијама. Овакав феномен је примећен у литератури за друге ензиме [13, 180], а може се објаснити међусобном интеракцијом између једињења при вишим концентрацијама, што спречава њихово везивање за ензим, а самим тим и инхибицију ензима. Слаба инхибиција α -амилазе и снажна инхибиција α -глукозидазе су, поред цитокомпатибилности једињења, у литератури описане као својства која треба да поседује идеални антидијабетични препарат [181]. Високоафинитетно везивање једињења за α -глукозидазу спречава овај ензим да катализује крајњи корак у којем долази до разградње олигосахарида и ослобађања глукозе. На тај начин се смањује њена апсорпција, односно смањује се концентрација слободне глукозе у крви. Различита фенолна једињења, међу којима и нека идентификована у екстрактима испитиваним у овој дисертацији, описана су у литератури као снажни инхибитори α -глукозидазе и/или α -амилазе [182]. Стога су различити полифеноли предложени као ефикасна алтернатива за синтетске антидијабетичне лекове као што је акарбоза. С обзиром на то да екстракти испитани у овој дисертацији садрже широк спектар различитих фенолних једињења, а притом су показали и својства „идеалног“ инхибитора ензима, може се закључити маховина *H. cupressiforme* има потенцијал за примену у смањењу постпрандијалне хипергликемије и терапији дијабетеса. Међутим, иако иницијални резултати указују на велики потенцијал екстракта маховине *H. cupressiforme* у третману дијабетеса, за потврду њиховог антидијабетичног потенцијала неопходна су даља испитивања како у *in vitro* тако и у *in vivo* условима.

Повећан оксидативни стрес се налази и у основи прогресије различитих тумора, који могу настати услед оштећења ДНК, оксидативне модификације протеина или промена у структури липида [183]. Антитуморски агенси представљају једну од најважнијих истраживачких области у развоју нових лекова. Екстракти бриофита су показали значајну цитотоксичну активност према различитим туморским ћелијама *in vitro* [13, 15, 72, 73]. У овој докторској дисертацији најпре је показана цитокомпатибилност екстраката маховине *H. cupressiforme*, што је у складу и са скорашњим истраживањем које је показало да су екстракти ове маховине безбедни и не показују цитотоксични ефекат према нормалним ћелијама фибробласта [15].

Потенцијална антитуморска активност екстраката је затим тестирана коришћењем две туморске ћелијске линије, НСТ-116 ћелије колоректалног канцера и MDA-MB-231 ћелије аденокарцинома дојке. Сви испитивани екстракти маховине прикупљене у пролеће, осим етанолног, довели су до значајног смањења метаболичке активности MDA-MB-231 ћелија (приближно 50%). Са друге стране, није било значајног ефекта на НСТ-116 ћелије. Дакле, екстракти маховине *H. cupressiforme* показали су селективност у смањењу метаболичке активности између различитих туморских ћелија. Детаљном претрагом литературе пронађени су подаци о снажном антипролиферативном ефекту метанолних екстраката маховине *H. cupressiforme* према ћелијама рака цервикса HeLa и умереном антипролиферативном ефекту према ћелијама тумора плућа A549 [184]. У овој докторској дисертацији први пут је забележена значајна антитуморска активност екстраката маховине *H. cupressiforme* према MDA-MB-231 ћелијама. Студије су показале да у ћелијским линијама тумора дојке људи, као што је MDA-MB-231, различити флавоноиди смањују експресију мутираног протеина p53 до нивоа који се скоро не може детектовати, као и да инхибирају производњу протеина топлотног шока [76]. Флавоноиди као што је кверцетин остварују ефекат и на немутирани p53 протеин, и то повећањем његове експресије у хуманој ћелијској линији леукемије и индукцијом апоптозе у овим ћелијама [185]. Такође, експериментално је утврђено да су флавоноиди апигенин, кверцетин, кемпферол и кверцетин 3-О-рутинозид снажни инхибитори транскрипционог фактора NF-κB и да имају значајну улогу у регулацији раста ћелија, апоптозе као и ћелијског циклуса [186]. С обзиром да су у екстрактима маховине испитане у овој дисертацији детектовани набројани флавоноиди, може се претпоставити да су управо они, између осталих, допринели значајној антитуморској активности испитиваних екстраката. Додатно је показано да су сви екстракти тестирани у овој дисертацији довели до значајног повећања производње PFK и NO од стране MDA-MB-231 ћелија. Познато је да, иако су PFK и NO неопходни за одржавање хомеостазе у организму, повећана продукција ових молекула може довести до развоја различитих патолошких стања. Њихова улога у туморским ћелијама још увек није у потпуности разјашњена, с обзиром на то да неке студије указују на њихов антитуморски потенцијал, док друге сугеришу да PFK и NO имају улогу у промоцији раста тумора [67, 69]. Туморске ћелије се генерално одликују повећаном продукцијом PFK, што их заузврат чини осетљивијим за даљи оксидативни стрес. Због тога се повећавање концентрације PFK често користи за селективно убијање туморских

ћелија. Повећана производња РВК у туморским ћелијама може изазвати индукцију програмиране ћелијске смрти – апоптозе [67]. Познато је да NO инхибира пролиферацију ћелија и индукује смрт ћелија тако што утиче на протеине митохондрија повезане са апоптозом [187]. Доказано је да ћелије тумора дојке третиране различитим проапоптотским агенсима показују повећану производњу NO [188]. Стога би ефекат екстракта маховине *H. cypressiforme* у значајном смањењу метаболичке активности MDA-MB-231 ћелија који је показан у овој дисертацији могао бити посредован повећаном продукцијом РВК и NO.

Неуроинфламација је одбрамбени механизам ЦНС-а који пре свега има улогу да заштити мозак од различитих патогена, али учествује и у репарацији ткива и уклањању ћелијских остатака у ЦНС-у [189]. Међутим, услед перзистентних инфекција или константно повећаног оксидативног стреса, овај механизам може прећи у хроничну инфламацију, која има штетан утицај по читаво околно ткиво и налази се у основи многих неуродегенеративних поремећаја. Главни посредници у хроничном инфламаторном одговору су ћелије микроглије. Изучавањем микроглије, као главног покретача инфламације у ЦНС-у, може да се стекне бољи увид у механизме којима долази до настанка неуроинфламаторних и неуродегенеративних стања, а све у циљу проналаска потенцијалних терапеутских мета којима се спречава њихово настајање или прогресија [190]. Испитивање антинеуроинфламаторног потенцијала екстракта маховине *H. cypressiforme* изведено је на моделу ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија микроглије. BV2 ћелије се веома често користе у експериментима у којима се испитује антинеуроинфламаторни потенцијал супстанци различитог порекла [13, 81, 191, 192] због бројних сличности које има са примарном културом микроглије у морфолошком, фенотипском и функционалном смислу [193]. BV2 ћелије се у експериментима најчешће стимулишу ЛПС-ом, ендотоксином који доводи до покретања брзе инфламаторне реакције. Ћелије микроглије активирани на овај начин представљају добро окарактерисан и често коришћен модел систем за испитивање неуроинфламације, због чега су и коришћене у овој дисертацији. Активација микроглије ЛПС-ом доводи до трансформације ћелија у морфолошком смислу, повећане експресије површинских рецептора укључених у инфламацију, као и ослобађања проинфламаторних медијатора као што су цитокини, РВК и NO [190, 193]. Једињења која смањују активацију микроглије, као и последичну неуроинфламацију, могу послужити као ефикасни агенси за лечење различитих неуродегенеративних

обољења у чијој се основи налази неуроинфламација. Стога је проналажење нових ефикасних терапеутика који би смањили активацију микроглије и неуроинфламацију од суштинског значаја и налази се у фокусу великог броја истраживача [190].

Познато је да ЛПС у зависности од времена стимулације и концентрације која се користи, може да доведе до апоптозе ћелија микроглије [194, 195]. У овој дисертацији примећена је смањена метаболичка активност BV2 ћелија након стимулације ЛПС-ом, док су испитивани екстракти довели до повећања метаболичке активности ћелија до или изнад нивоа контролних, нестимулисаних ћелија. Када су у питању терапеутици који делују на активiranу микроглију пожељно је да они буду модулатори активности микроглије, али без испољавања цитотоксичног ефекта на њих, с обзиром да се све одвија у деликатном окружењу ЦНС-а [193], што су испитивани екстракти маховине *H. cupressiforme* управо и показали. Смањење метаболичке активности ћелија услед прекомерне стимулације ћелија микроглије је примећено и у другим модел системима активације [193, 196, 197], при чему важну улогу у овом процесу имају солубилни медијатори продуковани од стране микроглије – PVK и NO [193]. У овој докторској дисертацији показано је да екстракти маховине *H. cupressiforme* прикупљене у пролеће, лето и јесен смањују продукцију NO, маркера активираних микроглије, док летњи и јесењи екстракти маховине значајно смањују и продукцију PVK. Студије показују да различита једињења из биљака инхибирају експресију iNOS-а у ЛПС-ом активираним макрофагима, као и да инактивацијом NF-κB смањују производњу NO посредовану iNOS-ом [198]. На пример, флавоноиди показују значајну инхибицију ЛПС-ом индуковане производње NO, при чему су кемпферол, кверцетин и нарингенин међу најефикаснијим једињењима у погледу инхибиције производње NO, а ефикасна је и кофеинска киселина [199]. Када је у питању продукција PVK, студије су показале да једињења као што су изорхамнетин [168], кемпферол [75] и *p*-кумаринска киселина [200] имају потенцијал да смање оксидативни стрес који настаје као последица прекомерне продукције ових реактивних врста. Механизми деловања ових једињења обично укључују инхибицију NF-κB сигналног пута, смањење ЛПС-ом индуковане експресије TLR4 и фактора диференцијације мијелоида 88, као и инхибицију везивања ЛПС-а за TLR4 у BV2 ћелијама [168]. На тај начин се значајно смањује ЛПС-ом индукована продукција PVK у BV2 ћелијама, што указује на снажан антиоксидативни и анти-инфламаторни ефекат. Могуће је закључити да нека од наведених једињења идентификованих у испитиваним екстрактима маховине *H. cupressiforme*, појединачно

или заједно/синергистички доприносе потенцијалној антинеуроинфламаторној активности екстракта ове маховине. Додатно, етил-ацетатни екстракти маховине *H. cupressiforme* прикупљени у лето и јесен значајно су смањили ЛПС-ом индуковану продукцију цитокина IL-6 од стране BV2 ћелија, а довели су и до смањења продукције TNF- α . Иако IL-6 може да подстакне преживљавање, диференцијацију и раст неурона, показано је да у већим количинама овај цитокин смањује неурогенезу у хипокампусу, а заједно са TNF- α представља значајан проинфламаторни медијатор у ЦНС-у [190, 201]. TNF- α ослобођен од стране активираних микроглије посредује у неуротоксичности и може изазвати смрт неурона, било директно или индиректно путем продукције NO и PVK [190, 202, 203]. Дакле, смањењем продукције NO, PVK, IL-6 и TNF- α могу се смањити и неуротоксични ефекти које изазива активирани микроглија. У овој дисертацији је показано да супернатанти овако активираних и екстракта маховине *H. cupressiforme* сакупљене у лето и јесен третираних ћелија испољавају значајно смањену цитотоксичност према ћелијама SH-SY5Y неурона, у поређењу са неуроцитотоксичним ефектом супернатаната само ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија. На овај начин екстракти маховине *H. cupressiforme* сакупљене у лето и јесен испољавају и неуропротективни ефекат. Ово је прва студија која је детаљније испитала начине деловања ове маховине, иако је њен анти-инфламаторни потенцијал познат од давнина, због чега се користила у традиционалној медицини многих народа. Стога се оваквом свеобухватном анализом која подразумева испитивање продукције NO, PVK, IL-6 и TNF- α од стране ЛПС-ом активираних и екстракта третиране микроглије, као и утицај солубилних продуката овако активираних и третираних ћелија према неуронима, пружа детаљан увид у неке од механизма антинеуроинфламаторног деловања екстракта маховине *H. cupressiforme*. Ови резултати могу указати на потенцијал испитиваних екстракта у превенцији или лечењу неуродегенеративних болести које су повезане са прекомерном активацијом микроглије и последичним неуротоксичним ефектом. Свакако, неопходна су детаљнија испитивања имуномодулаторног утицаја екстракта и у другим *in vitro* и *in vivo* моделима у циљу дефинисања осталих молекулских механизма њихове потенцијалне неуропротективне активности.

Антиоксидативни и антинеуроинфламаторни потенцијал испитиваних екстракта маховине прикупљене у лето и јесен додатно је испитан и у моделу водоник-пероксидом активираних BV2 ћелија микроглије. Третман BV2 ћелија

водоник-пероксидом значајно је смањио метаболичку активност ћелија и повећао ослобађање РВК, доводећи ћелије у стање оксидативног стреса, што је у сагласности са литературним налазима [204-206]. Екстракти маховине испитивани у овој дисертацији довели су до редукције метаболичке активности ћелија микроглије стимулираних водоник-пероксидом и смањили ослобађање РВК, доводећи их на ниво нетретираних контролних ћелија. Екстракти маховине из оба испитивана годишња доба (лето и јесен) имали су сличне активности, без значајних разлика између њих, што сугерише да оба аспекта маховине *H. cypressiforme* могу имати терапеутски потенцијал у третману неуродегенеративних болести у чијој основи се налази оксидативни стрес.

С обзиром на то да су екстракти испољили значајну антинеуроинфламаторну активност, следећи корак био је испитивање инхибиторног потенцијала екстраката маховине *H. cypressiforme* сакупљене у пролеће, лето и јесен према ензимима чија се повећана активност повезује са настанком и прогресијом многих неуродегенеративних обољења – ацетилхолинестераза и тирозиназа. Ацетилхолинестераза је ензим који катализује разградњу неуротрансмитера ацетилхолина, чиме регулише његову количину у синапсама. Једна од главних карактеристика Алцхајмерове болести је губитак памћења услед смањене количине ацетилхолина у синапсама, због чега је инхибиција ацетилхолинестеразе ефикасан терапијски приступ у терапији Алцхајмерове болести [87, 128]. Са друге стране, тирозиназа је кључни ензим укључен у производњу меланина у кожи и коси, а доказано је да у ЦНС-у доприноси стварању неуромеланина. Производња и накупљање неуромеланина и последично оштећење неурона повезани су са Паркинсоновом болешћу, те је инхибиција тирозиназе значајна мета у развоју лекова за Паркинсонову болест [91, 207]. Резултати ове дисертације су показали снажну инхибицију оба ензима од стране готово свих испитиваних екстраката. Међу екстрактима маховине прикупљене у пролеће, највећу активност у инхибицији ацетилхолинестеразе су показали етил-ацетатни и водени екстракти, док су за инхибицију тирозиназе највећи потенцијал показали етил-ацетатни и етанолни екстракти. На најнижим тестираним концентрацијама, екстракти су показали вишеструко већи потенцијал за инхибицију у односу на одговарајуће стандардне супстанце. Поређењем сезонских разлика може се приметити да су генерално интензивнију инхибицију остварили екстракти маховине из лета и јесени, у односу на маховину сакупљену у пролеће. То се посебно односи на ниже испитиване концентрације, док су на највишим концентрацијама бољу инхибиторну активност

показали екстракти маховине сакупљене у пролеће и то према оба испитивана ензима. Такође, у случају оба испитивана ензима примећена је обрнута зависност од концентрације, односно ензим су јаче инхибирали екстракти при нижој концентрацији. Код инхибиције тирозиназе, овакав потенцијал су показали само екстракти маховине летњег и јесењег аспекта, док су код ацетилхолинестеразе и екстракти маховине из пролећа показали обрнуту дозну зависност. Овај обрнути концентрациони вид инхибиторног ефекта према испитиваним ензимима је у сагласности са подацима у литератури [13, 180]. Као што је већ раније истакнуто, овај феномен се може јавити услед међусобне интеракције једињења на вишим концентрацијама екстракта, што смањује количину слободних молекула расположивих за интеракцију са ензимима. Самим тим, смањује се везивање једињења за активно место ензима, чиме се смањује и инхибиција ензима. Већина секундарних метаболита који имају инхибиторни потенцијал ка ацетилхолинестерази и тирозинази припадају флавоноидима, алкалоидима и терпеноидима [208]. За неке од флавоноида идентификованих у испитиваним екстрактима *H. cupressiforme*, као што су нарингенин, апигенин, кемпферол и кверцетин, раније је утврђено да могу да инхибирају ацетилхолинестеразу и тирозиназу [209]. Поред тога, неке од фенолних киселина детектоване у испитиваним екстрактима, као што су *p*-хидроксибензоева, протокатехуинска, *p*-кумаринска и кофеинска киселина, испитане су због њиховог инхибиторног потенцијала према тирозинази [207]. Претпоставка је да су ова једињења, између осталих, допринела детектованим инхибиторним активностима према ацетилхолинестерази и тирозинази. Стога, како би се утврдио појединачни допринос сваког од наведених једињења у инхибицији испитиваних ензима и како би се добила шира слика о њиховом везивању за ензиме, следећи корак у дисертацији била је *in silico* студија – молекулски докинг.

In silico студија молекулског докинга изведена је коришћењем 14 секундарних метаболита идентификованих у екстрактима *H. cupressiforme* као потенцијалних лиганда ка ензимима ацетилхолинестерази и тирозинази. Тродимензионална структура ацетилхолинестеразе је еволутивно очувана, тако да су ензими пореклом из различитих врста генерално веома слични [89]. Стога очекујемо да је структура ацетилхолинестеразе коришћена у *in vitro* експерименту као и за докинг у овој дисертацији упоредива са људском и да поседује иста својства активног места. Са друге стране, услед разлика између тирозиназе гљиве (која је коришћена у *in vitro* експерименту) и тирозиназе човека, утврђено је да једињења која су снажни

инхибитори тирозиназе гљиве нису увек ефикасни у инхибицији тирозиназе човека [141]. Како је један од циљева ове докторске дисертације био да се дефинишу најефикаснији секундарни метаболити екстраката маховине у смислу потенцијалне примене код људи, молекулски докинг изведен је и на тирозинази гљиве и на тирозинази човека.

Када је у питању ацетилхолинестераза, резултати докинга су показали да се сви испитивани секундарни метаболити маховине везују за активно место ензима, које укључује каталитичко место (Ser200, His440 и Glu327), као и многа додатна места важна за каталитички процес. У ањонском месту (Trp84, Tyr130, Tyr330 и Phe331) везује се холински део супстрата ацетилхолина који се ту позиционира за хидролизу. Ацилни џеп ензима (Phe288 и Phe290) везује ацетилну групу супстрата, док је оксиањонска рупа (Gly118, Gly119 и Ala201) укључена у стабилизацију прелазног стања супстрата [210]. Међу испитиваним лигандима, најјачи афинитет везивања према ацетилхолинестерази је добијен за ериодиктиол, као и генерално за све негликозиловане флавоноиде (апигенин, нарингенин, кемпферол, ацацетин). Ова једињења су остварила интеракције (Пи-Пи и Ван дер Валс-ове) са важним аминокиселинским остацима Ser200 и His440 унутар каталитичког места ензима. Поред тога, флавоноиди су остварили неколико интеракција са важним аминокиселинским остацима ањонског места ацетилхолинестеразе, као што су Пи-Пи интеракције са Trp84 и Tyr330 и Ван дер Валс-ове интеракције са Tyr130 и Phe331. Ове интеракције су сличне интеракцијама које је остварио галантамин, стандардна супстанца која се користи за инхибицију ацетилхолинестеразе. На основу резултата ове докинг симулације, може се закључити да су флавоноиди идентификовани у *H. cupressiforme* испољили велики инхибиторни потенцијал према ацетилхолинестерази, што је и раније забележено у литератури, како *in vitro* тако и *in silico* приступом [211-213]. Показано је да се афинитет, а тиме и инхибиторни потенцијал према ацетилхолинестерази мења у зависности од врсте супституената и њихове позиције у структури флавоноида [212]. На пример, хидроксилацијом се повећава афинитет, док гликозилација смањује афинитет и инхибиторну активност према ензиму, што је потврђено и резултатима добијеним у овој дисертацији, где је ериодиктиол као флавоноид са највише хидроксилних група показао највећи афинитет ка ензиму, док су гликозиловани флавоноиди као што су кверцетин 3-*O*-глукозид и изорхамнетин 3-*O*-глукозид генерално имали мањи афинитет.

Тирозиназа је ензим који игра кључну улогу у биосинтези меланина код различитих организама, а у ЦНС-у учествује у синтези неуромеланина. Тирозиназа се састоји од две идентичне Н субјединице и две идентичне L субјединице [37]. Субјединица Н садржи четири α -хеликса у чијем саставу се налази каталитичко место са 2 јона бакра. Сваки јон бакра формира координационе везе са три хистидинска остатка (His61, His85, His94 и His259, His263, His296) који се налазе у центру два антипаралелна пара α -хеликса. Хистидински остаци везани за јоне бакра су стабилизовани интеракцијама са оближњим остацима као што су Phe90 и Phe292 који су неопходни за каталитичку активност, те су интеракције са јонима бакра, као и хистидинским и другим остацима у њиховој близини важне за ефикасну инхибицију ензима [214]. Докинг симулације за тирозиназу гљиве и човека потврдиле су да се сви секундарни метаболити идентификовани у екстрактима *H. cupressiforme* јаче везују за активно место тирозиназе од стандардног инхибитора, којичне киселине. Ово је у сагласности са резултатима *in vitro* инхибиције тирозиназе детектоване у овој дисертацији. Наиме, показано је да у *in vitro* условима екстракти маховине имају већи инхибиторни потенцијал ка тирозинази гљиве у поређењу са којичном киселином, поготово при нижим концентрацијама услед мање шансе за формирање интермолекулских интеракција између једињења. Потом је у *in vitro* условима испитано везивање појединачних једињења идентификованих у екстрактима, а најбољи докинг резултат за тирозиназу гљиве је добијен за флавоноидни гликозид (кверцетин-3-*O*-рутинозид) који формира две водоничне везе са остацима активног места (His61 и His263), а интерагује и са јоном бакра, који је неопходан за каталитичку активност ензима. Поред тога, овај секундарни метаболит остварује интеракције са неколико аминокиселинских остатака који се налазе у непосредној близини активног места (His244, Val248, Met257, Asn260, Thr261, Phe264, Arg268, Val283 и Ala286). Литературни подаци говоре у прилог резултатима добијеним за тирозиназу гљиве у овој дисертацији, а као потенцијални инхибитори посебно се истичу флавоноидна једињења која на позицији 7 у А прстену имају хидроксилну групу, као кључни супституент за хелацију бакра и за интеракцију са важним остацима активног места ензима [214]. У две различите студије су се међу испитиваним једињењима посебно издвојили кверцетин и кверцетин-3-*O*-рутинозид, који су испољили висок инхибиторни потенцијал *in vitro* и *in silico* тестирањем [214, 215], што потврђују и резултати ове дисертације.

Већина инхибитора тирозиназе описаних у литератури тестирани су само према тирозинази гљиве, због чега се приликом испитивања њиховог потенцијала ка ензиму човека, или приликом практичне примене у различитим комерцијалним препаратима, често испостави да је њихова инхибиторна активност ка тирозинази човека лоша. Стога, у овој дисертацији је поред докинга секундарних метаболита идентификованих у екстрактима према тирозинази гљиве, урађена и докинг симулација према тирозинази човека, а услед недоступности тродимензионалне кристалне структуре за тирозиназу човека, направљен је модел овог ензима помоћу хомологног моделовања. Резултати докинга са хомологним моделом тирозиназе човека потврдили су снажан потенцијал екстраката у инхибицији ензима. Највећи афинитет према тирозинази човека показала је кофеинска киселина, дериват хидроксициметне киселине. Ово једињење остварило је Ван дер Валс-ове интеракције са аминокиселинским остацима активног места ензима, али и водоничне везе, Пи-Сигма и Пи-Пи интеракције са аминокиселинским остацима Glu203, Phe347, Val377, Ser380, као и са оба јона цинка који се налазе у близини активног места. Дакле, на основу резултата ове докторске дисертације, може се закључити да би једињења слична кофеинској киселини по структури могла бити ефикасна у инхибицији тирозиназе човека. У литератури постоје студије које су показале да су деривати хидроксициметне киселине успешни у инхибицији тирозиназе човека [167, 216]. Такође, поређењем једињења која су у овој дисертацији имала најбољи афинитет везивања према тирозинази гљиве (флавоноидни гликозиди) и човека (деривати хидроксициметне киселине), може се закључити да се секундарни метаболити идентификовани у екстрактима маховине *H. cupressiforme* различито везују за ова два ензима, и да једињења која ефикасно инхибирају тирозиназу гљиве, не морају нужно бити ефикасна према тирозинази човека. С обзиром на то да и у литератури постоје докази о различитим начинима инхибиције тирозиназе из гљиве и из човека [141], приступ коришћен у овој дисертацији може бити користан за превођење *in silico* резултата добијених за тирозиназу човека, али и друге протеине од интереса, у очекиване експерименталне резултате.

Имунски систем игра веома важну улогу током процеса зарастања рана. Активацијом имунских ћелија и ослобађањем различитих солубилних фактора покреће се инфламаторни процес, олакшава „чишћење“ ране и подстиче зарастање ткива. Међутим, дисрегулација имунског система током зарастања ране може довести до перзистентне инфламације и спорог зарастања, што на крају доводи до стварања

хроничних рана. Микроокружење хроничних рана карактерише се великом количином проинфламаторних макрофага, прекомерном експресијом инфламаторних медијатора као што су TNF- α и IL-1 β , повећаном активношћу матриксних металопротеиназа и великом количином РВК [217]. Поред тога, хроничне ране су често праћене бактеријским инфекцијама, који подстичу константну инфламацију око ране, што у великој мери отежава њихово зарастање [217]. С обзиром на то да су екстракти маховине тестирани у овој дисертацији показали значајан антиоксидативни и анти-инфламаторни потенцијал, и да у литератури постоје подаци о њиховој антимикробној активности [147, 162, 165], а да се управо ови механизми налазе у основи процеса зарастања рана, следећи корак је био испитивање прорегенеративног потенцијала екстраката маховине *H. cupressiforme*, односно њихове способности да убрзају зарастање ране.

Многе лековите биљке и њихови секундарни метаболити описани су у литератури као ефикасни агенси за побољшање зарастања ране у различитим *in vitro* и *in vivo* студијама. Показано је да екстракти биљака могу да повећавају пролиферацију, миграцију, диференцијацију и секреторну активност фибробласта и кератиноцита, који представљају кључне ћелије укључене у процес зарастања ране. У присуству производа природног порекла такође долази до повећања инфилтрације инфламаторних ћелија, ангиогенезе, нагомилавања ванћелијског матрикса као и повећане епителизације [15, 218, 219]. С обзиром на то да у литератури постоје подаци о активности различитих биљака, па и бриофита [14, 15], у побољшању зарастања ране, прорегенеративна активност екстраката маховине је у овој дисертацији тестирана коришћењем *in vitro* модела повреде ћелијског монослоја. Међутим, у „scratch“ тесту, који је симулирао поједностављени процес зарастања рана, екстракти маховине нису довели до повећане миграције фибробласта, односно до побољшања затварања ране. У литератури не постоје подаци о активности екстраката маховине *H. cupressiforme* у зарастању рана, док су друге маховине које су испитиване показале различите активности у смислу утицаја на процес зарастања ране. На пример, студија је показала да екстракти маховина *Tortulla muralis* и *Dryptodon pulvinatus* повећавају пролиферацију HFF-1 фибробласта, а тиме и затварање ране, док екстракти *Ceratodon purpureus* у истој студији нису показали активност, иако је садржај укупних фенола у овој врсти био већи него код врста које су показале активност [15]. Дакле, може се приметити да немају сви екстракти маховина утицај на стимулацију зарастања ране и

да је он вероватно условљен специфичним хемијским профилем одређене врсте маховине и интеракцијама које се у екстрактима јављају, као и да не зависи директно од садржаја одређене класе једињења [15]. Додатно, важно је истаћи да је пролиферација и миграција фибробласта само један од механизма у процесу зарастања ране и да је потребно испитати и ефекат на друге кључне механизме како би се донео закључак о постојању или непостојању активности неке врсте.

6 ЗАКЉУЧЦИ

У овој докторској дисертацији извршена је анализа укупног садржаја различитих класа секундарних метаболита и квантификација одређених фенолних киселина и флавоноида у екстрактима маховине *H. cupressiforme* сакупљене у пролеће, лето и јесен на подручју Вршачких планина. Потом је спроведено свеобухватно испитивање њихове потенцијалне антиоксидативне, антидијабетичне, антитуморске, антинеуроинфламаторне, антинеуродегенеративне и неуропротективне активности, као и њихов утицај на зарастање ране у *in vitro* условима. На основу постављених циљева ове докторске дисертације, примењене методологије и анализе добијених резултата, изведени су следећи закључци:

1. Принос екстракције маховине *H. cupressiforme* у овој дисертацији зависио је од употребљеног растварача за екстракцију, као и од годишњег доба у које је маховина сакупљена.

(а) Водени екстракти маховине *H. cupressiforme* сакупљене у пролеће имали су већи принос у односу на друге коришћене раствараче (етанол, смеша воде и етанола и етил-ацетат).

(б) Када су у питању сезонске варијације, највећи принос је добијен након екстракције маховине сакупљене у јесен помоћу етил-ацетата.

2. Највећи садржај свих испитиваних класа секундарних метаболита (изузев кумарина) је детектован у етил-ацетатном екстракту маховине *H. cupressiforme* сакупљене током лета. Најприсутнија фенолна киселина у екстрактима била је *p*-хидроксibenзоева киселина, а кемпферол најприсутнији флавоноид.

3. Испитивани екстракти маховине *H. cupressiforme* су показали значајан антиоксидативни, антидијабетични и антинеуродегенеративни потенцијал.

(а) Највећу антиоксидативну активност екстракти су показали у β -каротен/линолна киселина тесту где су се посебно издвојили етил-ацетатни екстракти маховине сакупљене у лето (при вишим концентрацијама) и сакупљене у пролеће (при најнижим концентрацијама).

(б) Етил-ацетатни екстракти маховине сакупљене у лето и јесен су испољили значајан антидијабетични потенцијал мерен инхибицијом α -глукозидазе, док према α -амилази није испољен инхибиторни потенцијал.

(в) Етил-ацетатни екстракти маховине сакупљене у лето и јесен (при нижим концентрацијама) су испољили најинтензивнију инхибицију активности ацетилхолинестеразе, док су при вишим концентрацијама најбољи ефекат

испољили етил-ацетатни екстракти маховине сакупљене у пролеће. Са друге стране, етанолни екстракт маховине сакупљене у пролеће при вишим концентрацијама је испољио најбољи инхибиторни ефекат према тирозинази, а при најнижим тестираним концентрацијама најбоље су се показали етил-ацетатни екстракти маховине сакупљене у лето и јесен.

4. Испитивани екстракти маховине *H. cupressiforme* су, поред задовољавајуће цитокомпатибилности, показали значајан антитуморски, антинеуроинфламаторни и неуропротективни потенцијал.

(а) Сви испитивани екстракти маховине сакупљене у пролеће (изузев етанолног) довели су до значајне редукције метаболичке активности MDA-MB-231 ћелија хуманог аденокарцинома дојке, а најефикаснији је био водени екстракт маховине. Додатно, сви екстракти маховине сакупљене у пролеће (изузев етанолног) значајно су повећали продукцију РВК и NO од стране туморских ћелија. Најпотентнији су били екстракти припремљени применом смеше воде и етанола.

(б) Третирање ЛПС-ом активираних BV2 ћелија мишје микроглије екстрактима маховине довело је до спречавања ефекта ЛПС-а на смањење метаболичке активности ових ћелија, као и до значајног смањења продукције NO, РВК и IL-6, што указује на њихову антинеуроинфламаторну активност, а најбољу активност су испољили екстракти маховине сакупљени у лето и јесен. Екстракти из лета и јесени су смањили и акумулацију РВК након третмана BV2 ћелија водоник-пероксидом, а такође су спречили и смањење метаболичке активности у култури индуковано водоник-пероксидом.

(в) Екстракти маховине сакупљени у лето и јесен значајно су смањили неурцитотоксични потенцијал солубилних медијатора ослобађених од стране ЛПС-ом активираних ћелија микроглије према SH-SY5Y неуронима, што указује на њихов потенцијални неуропротективни ефекат.

(г) Екстракти маховине из летње и јесење сезоне нису довели до повећане миграције L929 ћелија мишјих фибробласта нити до убрзања „зарастања ране“ у коришћеном *in vitro* моделу повреде.

5. Најпотентнији растварач за екстракцију маховине *H. cupressiforme*, на основу хемијског састава и испољене биолошке активности свих испитиваних екстраката, био је етил-ацетат. Екстракти добијени употребом етил-ацетата су

показали највећи релативни удео свих испитиваних класа секундарних метаболита, најбољи антиоксидативни (β -каротен тест), антидијабетични (инхибиција α -глукозидазе) и антинеуродегенеративни потенцијал (инхибиција ацетилхолинестеразе и тирозиназе при нижим концентрацијама) у биохемијским тестовима, најбољи антинеуроинфламаторни потенцијал као и добар антитуморски потенцијал у биолошким тестовима.

6. Најпогодније годишње доба за сакупљање маховине *H. cupressiforme*, на основу хемијског састава и испољене биолошке активности свих испитиваних екстраката маховине, било је лето. Екстракти маховине сакупљени у лето су имали највећи садржај готово свих испитиваних класа секундарних метаболита (изузев кумарина), а заједно са јесењим аспектом и најбољи антиоксидативни (при највишим тетсираним концентрацијама), антидијабетични (при најнижим тестираним концентрацијама) и антинеуродегенеративни потенцијал (при најнижим тестираним концентрацијама) у биохемијским тестовима, као и најбољи антинеуроинфламаторни и неуропротективни потенцијал у биолошким тестовима.
7. Молекулским докингом је показано да се секундарни метаболити идентификовани у екстрактима маховине *H. cupressiforme* везују за активно место ензима ацетилхолинестеразе и тирозиназе, чиме се спречава везивање супстрата и долази до инхибиције ензима. Међу испитиваним лигандима, највећи афинитет везивања према ацетилхолинестерази је показао ериодиктиол, али и флавоноиди генерално. Највећи афинитет према тирозинази гљиве је показао флавоноидни гликозид кверцетин-3-*O*-рутинозид, док су за везивање за тирозиназу човека највећи афинитет показале фенолне киселине, конкретно кофеинска киселина.

Сумирањем свих наведених специфичних закључака, може се извести општи закључак да екстракти маховине *H. cupressiforme* садрже разноврсна биолошки активна једињења која показују антиоксидативни, антидијабетични, антитуморски, антинеуроинфламаторни, антинеуродегенеративни и неуропротективни потенцијал, те постоји добар основ за њихово даље проучавање и потенцијалну употребу као природних помоћних средстава у терапији болести повезаних са оксидативним стресом и инфламацијом. Најбољи ефекат испољавају екстракти маховине сакупљене током

лета и добијени употребом етил-ацетата као растварача. Свакако, неопходна су даља испитивања имуномодулаторног утицаја екстраката коришћењем *in vivo* модел система, а у циљу додатног дефинисања ћелијских и молекулских механизма који се налазе у основи примећених активности.

7 ЛИТЕРАТУРА

1. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology E-book*. 2014: Elsevier Health Sciences.
2. Radulović, N.S., et al., *Immunomodulatory pinguisane-type sesquiterpenes from the liverwort Porella cordaeana (Porellaceae): the “new old” furanopinguisanol and its oxidation product exert mutually different effects on rat splenocytes*. RSC advances, 2016. **6**(48): p. 41847-41860.
3. Zhao, S., et al., *Immunomodulatory effects of edible and medicinal mushrooms and their bioactive immunoregulatory products*. Journal of Fungi, 2020. **6**(4): p. 269.
4. Fontana, F., et al., *Immunostimulation and immunosuppression: nanotechnology on the brink*. Small Methods, 2018. **2**(5): p. 1700347.
5. Sellon, D.C. and M.T. Long, *Equine infectious diseases E-book*. 2013: Elsevier Health Sciences.
6. Rathee, P., et al., *Immunosuppressants: a review*. The Pharma Innovation, 2013. **1**(12).
7. Shi, J., J.-H. Weng, and T.J. Mitchison, *Immunomodulatory drug discovery from herbal medicines: Insights from organ-specific activity and xenobiotic defenses*. Elife, 2021. **10**: p. e73673.
8. Glime, J., *Medical uses: medical conditions*. Bryophyte Ecology, 2017. **5**.
9. Asakawa, Y. and A. Ludwiczuk, *Chemical constituents of bryophytes: structures and biological activity*. Journal of natural products, 2017. **81**(3): p. 641-660.
10. Cianciullo, P., et al., *Antioxidant and Antibacterial Properties of Extracts and Bioactive Compounds in Bryophytes*. Applied Sciences, 2021. **12**(1): p. 160.
11. Gahtori, D. and P. Chaturvedi, *Bryophytes: A potential source of antioxidants*, in *Bryophytes*. 2019, IntechOpen London, UK.
12. Marko, S., B. Aneta, and G. Dragoljub, *Bryophytes as a potential source of medicinal compounds*. Pregl Rev, 2001. **21**(1): p. 17-29.
13. Mandić, M.R., et al., *Chemical characterization and in vitro immunomodulatory effects of different extracts of moss Hedwigia ciliata (Hedw.) P. Beauv. from the Vršacke Planine Mts., Serbia*. PloS one, 2021. **16**(2): p. e0246810.
14. Tosun, A., et al., *Wound healing potential of selected Liverworts*. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016. **13**(3): p. 285-291.
15. Wolski, G.J., et al., *Cytotoxicity, antimicrobial and antioxidant activities of mosses obtained from open habitats*. Plos one, 2021. **16**(9): p. e0257479.
16. Dziwak, M., et al., *Modern Use of Bryophytes as a Source of Secondary Metabolites*. Agronomy, 2022. **12**(6): p. 1456.
17. Pantović, J., et al., *An annotated list of moss species of Serbia*. Phytotaxa, 2021. **479**(3): p. 207–249-207–249.
18. Saxena, D., *Uses of bryophytes*. Resonance, 2004. **9**(6): p. 56-65.
19. BENEK, A., K. CANLI, and E.M. ALTUNER, *Traditional Medicinal Uses of Mosses*. Anatolian Bryology, 2022. **8**(1): p. 57-65.

20. Sabovljević, M.S., et al., *Bryophytes—an emerging source for herbal remedies and chemical production*. Plant genetic resources, 2016. **14**(4): p. 314-327.
21. Vujičić, M., A. Sabovljević, and M. Sabovljević, *Axenicly culturing the bryophytes: Establishment and propagation of the moss *Hypnum cupressiforme* Hedw.(Bryophyta, Hypnaceae) in in vitro conditions*. Botanica Serbica, 2011. **35**(1): p. 71-77.
22. Smith, A., *The *Hypnum cupressiforme* complex in the British Isles*. Journal of bryology, 1997. **19**(4): p. 751-774.
23. Kļaviņa, L., *Composition of mosses, their metabolites and environmental stress impacts*. 2018.
24. YAYINTAS, O.T. and L.C. IRKIN, *Bryophytes as Hidden Treasure*. Journal of Scientific Perspectives, 2018. **2**(1): p. 71-82.
25. Pagare, S., et al., *Secondary metabolites of plants and their role: Overview*. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 2015. **9**(3): p. 293-304.
26. Klaviņa, L. and G. Spriðe. *Optimisation of Conditions for Extraction of Biologically Active Compounds from Common Bryophytes in Latvia/Latvijā Augošu Briofītu Ekstrakcijas Apstākļu Optimizācijas Ietekme Uz Bioloģiski Aktīviem Sekundārajiem Metabolītiem*. in *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*. 2016.
27. Klavina, L., et al., *Seasonal changes of chemical composition in boreonemoral moss species*. Environmental and Experimental Biology, 2018. **16**: p. 9-19.
28. Kļaviņa, L., et al., *Characterization of chemical composition of some bryophytes common in Latvia*. Environ. and Exp. Biol, 2012. **10**: p. 27-34.
29. Thakur, S. and S. Kapila, *Seasonal changes in antioxidant enzymes, polyphenol oxidase enzyme, flavonoids and phenolic content in three leafy liverworts*. Lindbergia, 2017. **40**(5): p. 39-44.
30. Karunen, P., *Seasonal changes in lipids of photosynthetically active and senescent parts of *Sphagnum fuscum**. 1982.
31. Soni, U., S. Brar, and V.K. Gauttam, *Effect of seasonal variation on secondary metabolites of medicinal plants*. Int J Pharm Sci Res, 2015. **6**(9): p. 3654-3662.
32. Ebrahimi, P. and A. Lante, *Polyphenols: A comprehensive review of their nutritional properties*. The Open Biotechnology Journal, 2021. **15**(1).
33. Al Mamari, H.H., *Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis*, in *Phenolic Compounds-Chemistry, Synthesis, Diversity, Non-Conventional Industrial, Pharmaceutical and Therapeutic Applications*. 2021, IntechOpen.
34. Kolton, A., et al., *Biosynthesis regulation of folates and phenols in plants*. Scientia Horticulturae, 2022. **291**: p. 110561.
35. Garg, S., *Flavonoids: Biosynthesis, Metabolism, Mechanism of Antioxidation and Clinical Implications: A Review*. Agricultural Reviews, 2020. **41**(3).
36. Kawser Hossain, M., et al., *Molecular mechanisms of the anti-obesity and anti-diabetic properties of flavonoids*. International journal of molecular sciences, 2016. **17**(4): p. 569.

37. Sievers, H., et al., *Hypnogenols and other dihydroflavonols from the moss Hypnum cupressiforme*. *Phytochemistry*, 1992. **31**(9): p. 3233-3237.
38. Asakawa, Y., A. Ludwiczuk, and F. Nagashima, *Chemical constituents of bryophyta*. *Chemical Constituents of Bryophytes*, 2013: p. 563-605.
39. Bor, T., et al., *Antimicrobials from herbs, spices, and plants*, in *Fruits, vegetables, and herbs*. 2016, Elsevier. p. 551-578.
40. Jain, P.K. and H. Joshi, *Coumarin: chemical and pharmacological profile*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2012(Issue): p. 236-240.
41. Jung, M., H. Zinsmeister, and H. Geiger, *New three-and tetraoxygenated coumarin glucosides from the mosses Atrichum undulatum and Polytrichum formosum*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 1994. **49**(11-12): p. 697-702.
42. Asakawa, Y., K. Nii, and M. Higuchi, *Identification of sesquiterpene lactones in the Bryophyta (mosses) Takakia: Takakia species are closely related chemically to the Marchantiophyta (liverworts)*. *Natural Product Communications*, 2015. **10**(1): p. 1934578X1501000104.
43. Cox-Georgian, D., et al., *Therapeutic and medicinal uses of terpenes*, in *Medicinal Plants*. 2019, Springer. p. 333-359.
44. Chen, F., et al., *Terpenoid secondary metabolites in bryophytes: chemical diversity, biosynthesis and biological functions*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2018. **37**(2-3): p. 210-231.
45. Turrens, J.F., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. *The Journal of physiology*, 2003. **552**(2): p. 335-344.
46. Yang, Y., et al., *Reactive oxygen species in the immune system*. *International reviews of immunology*, 2013. **32**(3): p. 249-270.
47. Gorrini, C., I.S. Harris, and T.W. Mak, *Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy*. *Nature reviews Drug discovery*, 2013. **12**(12): p. 931-947.
48. Thomas, C., et al., *Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation*. *Redox Report*, 2009. **14**(3): p. 102-108.
49. Pisoschi, A.M. and A. Pop, *The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review*. *European journal of medicinal chemistry*, 2015. **97**: p. 55-74.
50. Lourenço, S.C., M. Moldão-Martins, and V.D. Alves, *Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications*. *Molecules*, 2019. **24**(22): p. 4132.
51. Singh, M., et al., *Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of Plagiochasma appendiculatum Lehm. et Lind.* *Journal of Ethnopharmacology*, 2006. **107**(1): p. 67-72.
52. Paciolla, C. and F. Tommasi, *The ascorbate system in two bryophytes: Brachythecium velutinum and Marchantia polymorpha*. *Biologia plantarum*, 2003. **47**(3): p. 387-393.
53. Hirata, T., et al., *A 37-kDa peroxidase secreted from liverworts in response to chemical stress*. *Phytochemistry*, 2000. **55**(3): p. 197-202.

54. Yayıntaş, O.T., S. Yılmaz, and M. Sökmen, *Determination of antioxidant, antimicrobial and antitumor activity of bryophytes from Mount Ida (Canakkale, Turkey)*. 2019.
55. Papoutsis, K., et al., *Fruit, vegetables, and mushrooms for the preparation of extracts with α -amylase and α -glucosidase inhibition properties: A review*. Food Chemistry, 2021. **338**: p. 128119.
56. Ćorković, I., et al., *Dietary Polyphenols as Natural Inhibitors of α -Amylase and α -Glucosidase*. Life, 2022. **12**(11): p. 1692.
57. Sun, C., et al., *Dietary polyphenols as antidiabetic agents: Advances and opportunities*. Food Frontiers, 2020. **1**(1): p. 18-44.
58. Lin, D., et al., *An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes*. Molecules, 2016. **21**(10): p. 1374.
59. Kalita, D., et al., *Inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and aldose reductase by potato polyphenolic compounds*. PloS one, 2018. **13**(1): p. e0191025.
60. Patel, A., *Benign vs malignant tumors*. JAMA oncology, 2020. **6**(9): p. 1488-1488.
61. Obradović, A., et al., *Anti-tumor mechanisms of novel 3-(4-Substituted Benzyl)-5-isopropyl-5-phenylhydantoin derivatives in human colon cancer cell line*. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 2019. **19**(12): p. 1491-1502.
62. Obradović, A., et al., *Antiproliferative and antimigratory effects of 3-(4-substituted benzyl)-5-isopropyl-5-phenylhydantoin derivatives in human breast cancer cells*. Saudi Pharmaceutical Journal, 2020. **28**(3): p. 246-254.
63. Ribatti, D., *The concept of immune surveillance against tumors: The first theories*. Oncotarget, 2017. **8**(4): p. 7175.
64. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nature immunology, 2002. **3**(11): p. 991-998.
65. Gao, P., et al., *HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo*. Cancer cell, 2007. **12**(3): p. 230-238.
66. Reczek, C.R. and N.S. Chandel, *The two faces of reactive oxygen species in cancer*. 2017.
67. Wang, J. and J. Yi, *Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question*. Cancer biology & therapy, 2008. **7**(12): p. 1875-1884.
68. Perillo, B., et al., *ROS in cancer therapy: The bright side of the moon*. Experimental & Molecular Medicine, 2020. **52**(2): p. 192-203.
69. Wink, D.A., et al., *The multifaceted roles of nitric oxide in cancer*. Carcinogenesis, 1998. **19**(5): p. 711-721.
70. Mishra, D., V. Patel, and D. Banerjee, *Nitric oxide and S-nitrosylation in cancers: emphasis on breast cancer*. Breast cancer: basic and clinical research, 2020. **14**: p. 1178223419882688.
71. Sharifi-Rad, J., et al., *Natural products and synthetic analogs as a source of antitumor drugs*. Biomolecules, 2019. **9**(11): p. 679.

72. Mishra, R., V.K. Pandey, and R. Chandra, *Potential of bryophytes as therapeutics*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2014. **5**(9): p. 3584-3593.
73. Dey, A. and A. Mukherjee, *Therapeutic potential of bryophytes and derived compounds against cancer*. Journal of acute disease, 2015. **4**(3): p. 236-248.
74. Dai, J. and R.J. Mumper, *Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties*. Molecules, 2010. **15**(10): p. 7313-7352.
75. Wang, J., et al., *Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol*. PLoS One, 2018. **13**(5): p. e0197563.
76. Kumar, S. and A.K. Pandey, *Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview*. The scientific world journal, 2013. **2013**.
77. Cheng, X., et al., *Anti-tumor and pro-apoptotic activity of ethanolic extract and its various fractions from Polytrichum commune L. ex Hedw in L1210 cells*. Journal of ethnopharmacology, 2012. **143**(1): p. 49-56.
78. Zheng, G.Q., et al., *Ohioensins: novel benzonaphthoxanthones from Polytrichum ohioense*. The Journal of Organic Chemistry, 1993. **58**(2): p. 366-372.
79. Asakawa, Y. and W. Herz, *Progress in the chemistry of organic natural products*. 1995.
80. Chandra, S., et al., *Bryophytes: Hoard of remedies, an ethno-medicinal review*. Journal of traditional and complementary medicine, 2017. **7**(1): p. 94-98.
81. Wu, Y., et al., *Anti-neuroinflammatory effects of tannic acid against lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells via inhibition of NF- κ B activation*. Drug Development Research, 2019. **80**(2): p. 262-268.
82. Choi, D.K., S. Koppula, and K. Suk, *Inhibitors of microglial neurotoxicity: focus on natural products*. Molecules, 2011. **16**(2): p. 1021-1043.
83. Alam, Q., et al., *Inflammatory process in Alzheimer's and Parkinson's diseases: central role of cytokines*. Current pharmaceutical design, 2016. **22**(5): p. 541-548.
84. Brabazon, F., et al., *The effects of insulin on the inflammatory activity of BV2 microglia*. PLoS One, 2018. **13**(8): p. e0201878.
85. Smith, J.A., et al., *Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases*. Brain research bulletin, 2012. **87**(1): p. 10-20.
86. McGill-Carter, T., *Market analysis Alzheimer's disease 2020*. J Psychiatry, 2020. **22**: p. 21-22.
87. Sharma, K., *Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics*. Molecular medicine reports, 2019. **20**(2): p. 1479-1487.
88. Francis, P.T., et al., *The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 1999. **66**(2): p. 137-147.
89. Wiesner, J., et al., *Acetylcholinesterases—the structural similarities and differences*. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, 2007. **22**(4): p. 417-424.

90. David, B., et al., *Discovery of new acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: Virtual screening and in vitro characterisation*. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, 2021. **36**(1): p. 491-496.
91. Carballo-Carbajal, I., et al., *Brain tyrosinase overexpression implicates age-dependent neuromelanin production in Parkinson's disease pathogenesis*. Nature communications, 2019. **10**(1): p. 1-19.
92. Tan, X., et al., *Highly potent tyrosinase inhibitor, neorauflavane from *Campylotropis hirtella* and inhibitory mechanism with molecular docking*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2016. **24**(2): p. 153-159.
93. Asakawa, Y., A. Ludwiczuk, and F. Nagashima, *Phytochemical and biological studies of bryophytes*. Phytochemistry, 2013. **91**: p. 52-80.
94. Pinto, B.I., et al., *In vitro scratch assay to demonstrate effects of arsenic on skin cell migration*. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2019(144): p. e58838.
95. Quintão, G.C., G.M. Cavalcante, and L.A. Lins, *Investigation of wound healing in vitro of specie *Brachymerium exile* (Dozy & Molk.) Bosch & Sande Lac*. Research, Society and Development, 2022. **11**(4): p. e6311427057-e6311427057.
96. Fan, J., A. Fu, and L. Zhang, *Progress in molecular docking*. Quantitative Biology, 2019. **7**(2): p. 83-89.
97. Stanzone, F., I. Giangreco, and J.C. Cole, *Use of molecular docking computational tools in drug discovery*. Progress in Medicinal Chemistry, 2021. **60**: p. 273-343.
98. Dilshad, R., et al., *Phytochemical profiling, in vitro biological activities, and in-silico molecular docking studies of *Typha domingensis**. Arabian Journal of Chemistry, 2022. **15**(10): p. 104133.
99. Aati, H.Y., et al., *Phytochemical Profiling, In Vitro Biological Activities, and In-Silico Studies of *Ficus vasta* Forssk.: An Unexplored Plant*. Antibiotics, 2022. **11**(9): p. 1155.
100. Ahmed, M., et al., *Comprehensive phytochemical profiling, biological activities, and molecular docking studies of *Pleurospermum candollei*: An insight into potential for natural products development*. Molecules, 2022. **27**(13): p. 4113.
101. Ghalloo, B.A., et al., *Phytochemical Profiling, In Vitro Biological Activities, and In Silico Molecular Docking Studies of *Dracaena reflexa**. Molecules, 2022. **27**(3): p. 913.
102. Lengauer, T. and M. Rarey, *Computational methods for biomolecular docking*. Current opinion in structural biology, 1996. **6**(3): p. 402-406.
103. Magalhães, C.S.d., H.J. Barbosa, and L.E. Dardenne, *A genetic algorithm for the ligand-protein docking problem*. Genetics and Molecular Biology, 2004. **27**: p. 605-610.
104. Singleton, V.L. and J.A. Rossi, *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. American journal of Enology and Viticulture, 1965. **16**(3): p. 144-158.
105. Mihailović, V., et al., *Chemical profile, antioxidant activity and stability in stimulated gastrointestinal tract model system of three *Verbascum* species*. Industrial Crops and Products, 2016. **89**: p. 141-151.

106. Park, Y.K., et al., *Comparison of the flavonoid aglycone contents of Apis mellifera propolis from various regions of Brazil*. Arq. Biol. Tecnol, 1997: p. 97-106.
107. Chang, C.L., C.S. Lin, and G.H. Lai, *Phytochemical characteristics, free radical scavenging activities, and neuroprotection of five medicinal plant extracts*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012. **2012**.
108. Amorim, E., et al., *Standard operating procedures (SOP) for the spectrophotometric determination of phenolic compounds contained in plant samples*. Latest research into quality control, 2012: p. 47-66.
109. Mišić, D., et al., *Simultaneous UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS/MS analysis of phenolic acids and nepetalactones in methanol extracts of Nepeta species: a possible application in chemotaxonomic studies*. Phytochemical Analysis, 2015. **26**(1): p. 72-85.
110. Mishra, K., H. Ojha, and N.K. Chaudhury, *Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results*. Food chemistry, 2012. **130**(4): p. 1036-1043.
111. Blois, M.S., *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical*. Nature, 1958. **181**(4617): p. 1199-1200.
112. Oyaizu, M., *Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine*. The Japanese journal of nutrition and dietetics, 1986. **44**(6): p. 307-315.
113. Tusevski, O., et al., *Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants*. Central European Journal of Biology, 2014. **9**(9): p. 888-900.
114. Nickavar, B. and N. Esbati, *Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of three Thymus species*. Journal of Acupuncture and Meridian Studies, 2012. **5**(3): p. 119-125.
115. Dapkevicius, A., et al., *Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998. **77**(1): p. 140-146.
116. Zengin, G., et al., *Survey of phytochemical composition and biological effects of three extracts from a wild plant (Cotoneaster nummularia Fisch. et Mey.): A potential source for functional food ingredients and drug formulations*. PloS one, 2014. **9**(11): p. e113527.
117. Wan, L.-S., et al., *Xanthone glycoside constituents of Swertia kouitchensis with α -glucosidase inhibitory activity*. Journal of natural products, 2013. **76**(7): p. 1248-1253.
118. Jacobs, J.P., C. Jones, and J. Baille, *Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5*. Nature, 1970. **227**(5254): p. 168-170.
119. Ghanbari, H., Z. Keshavarzi, and J. Tavakol-Afshari, *The effects of aqueous extract of Alpinia Galangal on gastric cancer cells (AGS) and L929 cells in vitro*. Iranian Journal of Cancer Prevention, 2014. **7**(3): p. 142.
120. Wang, S.-J., et al., *Differential effects of EGF gradient profiles on MDA-MB-231 breast cancer cell chemotaxis*. Experimental cell research, 2004. **300**(1): p. 180-189.

121. Ghaemmaghami, S., et al., *Resistin and visfatin expression in HCT-116 colorectal cancer cell line*. International journal of molecular and cellular medicine, 2013. **2**(3): p. 143.
122. Bocchini, V., et al., *An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells*. Journal of neuroscience research, 1992. **31**(4): p. 616-621.
123. Xicoy, H., B. Wieringa, and G.J. Martens, *The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review*. Molecular neurodegeneration, 2017. **12**(1): p. 1-11.
124. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. Journal of immunological methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
125. Auclair, C. and E. Voisin, *Nitroblue tetrazolium reduction*. Handbook of methods for oxygen radical research, 1985. **123**.
126. Griess, P., *Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselky und Benedikt ueber eineige Azoverbindungen*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1879. **12**: p. 426-428.
127. Alhaji, M. and A. Farhana, *Enzyme linked immunosorbent assay*, in *StatPearls [Internet]*. 2022, StatPearls Publishing.
128. Mukherjee, P.K., et al., *Acetylcholinesterase inhibitors from plants*. Phytomedicine, 2007. **14**(4): p. 289-300.
129. Ellman, G.L., et al., *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochemical pharmacology, 1961. **7**(2): p. 88-95.
130. Behbahani, I., S.A. Miller, and D. Okeeffe, *A comparison of mushroom tyrosinase dopaquinone and dopachrome assays using diode-array spectrophotometry: dopachrome formation vs ascorbate-linked dopaquinone reduction*. Microchemical journal, 1993. **47**(1-2): p. 251-260.
131. Masuda, T., et al., *Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from Garcinia subelliptica*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2005. **69**(1): p. 197-201.
132. Lampugnani, M.G., *Cell migration into a wounded area in vitro*. Adhesion protein protocols, 1999: p. 177-182.
133. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nature methods, 2012. **9**(7): p. 671-675.
134. Pitz, H.d.S., et al., *In vitro evaluation of the antioxidant activity and wound healing properties of Jaboticaba (Plinia peruviana) fruit peel hydroalcoholic extract*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016. **2016**.
135. Laskowski, R., M. MacArthur, and J. Thornton, *PROCHECK: validation of protein-structure coordinates*. 2006.
136. Sepsova, V., et al., *Oximes: inhibitors of human recombinant acetylcholinesterase. A structure-activity relationship (SAR) study*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(8): p. 16882-16900.
137. Biovia, D.S., *Discovery Studio, version 21.1.0*. San Diego: Dassault Systèmes, 2021.

138. Morris, G.M., et al., *AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility*. Journal of computational chemistry, 2009. **30**(16): p. 2785-2791.
139. Hanwell, M.D., et al., *Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform*. Journal of cheminformatics, 2012. **4**(1): p. 1-17.
140. Acheson, S.A. and D.M. Quinn, *Anatomy of acetylcholinesterase catalysis: reaction dynamics analogy for human erythrocyte and electric eel enzymes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1990. **1040**(2): p. 199-205.
141. Mann, T., et al., *Inhibition of human tyrosinase requires molecular motifs distinctively different from mushroom tyrosinase*. Journal of Investigative Dermatology, 2018. **138**(7): p. 1601-1608.
142. Gohil, P., M. Zaveri, and S. Jain, *Immunomodulatory activity of n-butanol extract of Oroxyllum indicum*. Pharmaceutical Biology, 2008. **46**(12): p. 914-919.
143. Mazumdar, S., et al., *Immunomodulatory activity of ethanol extract of Annona reticulata L. leaf in cultured immune cells and in Swiss albino mice*. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine, 2022. **13**(2): p. 100554.
144. Abood, W.N., et al., *Immunomodulatory effect of an isolated fraction from Tinospora crispa on intracellular expression of INF- γ , IL-6 and IL-8*. BMC complementary and alternative medicine, 2014. **14**(1): p. 1-12.
145. Yeshi, K., et al., *Plant secondary metabolites produced in response to abiotic stresses has potential application in pharmaceutical product development*. Molecules, 2022. **27**(1): p. 313.
146. Altuner, E.M., K. Canli, and I. Akata, *Antimicrobial screening of Calliargonella cuspidata, Dicranum polysetum and Hypnum cupressiforme*. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2014. **8**(1): p. 539-545.
147. Veljić, M., et al., *Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata Fontinalis antipyretica, Hypnum cupressiforme i Ctenidium molluscum*. Archives of Biological Sciences, 2009. **61**(2): p. 225-229.
148. Perera-Castro, A.V., et al., *It is hot in the sun: Antarctic mosses have high temperature optima for photosynthesis despite cold climate*. Frontiers in Plant Science, 2020. **11**: p. 1178.
149. Che Sulaiman, I.S., et al., *Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of Clinacanthus nutans Lindau leaves by response surface methodology*. Chemistry Central Journal, 2017. **11**(1): p. 1-11.
150. Abubakar, A.R. and M. Haque, *Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes*. Journal of pharmacy & bioallied sciences, 2020. **12**(1): p. 1.
151. Pourmortazavi, S.M. and S.S. Hajimirsadeghi, *Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis*. Journal of chromatography A, 2007. **1163**(1-2): p. 2-24.
152. Kostić, M., *Hemijski sastav i farmakološki profil ekstrakata Salvia sclarea L.* Универзитет у Нишу, 2019.

153. Radojković, M., *Ekstrakti duda (Morus spp., Moraceae), sastav, delovanje i primena*. 2012, University of Novi Sad (Serbia).
154. Đorđević, B.S., *EKSTRAKCIJA MASNOG ULJA I FENOLA IZ SEMENA CRNE SLAČICE (BRASSICA NIGRA L.) EUTEKTIČKIM RASTVARAČIMA I ETANOLIZA MASNOG ULJA U PRISUSTVU KALCIJUM-OKSIDA*.
155. Ahmad, A., et al., *Extraction, separation and identification of chemical ingredients of Elephantopus scaber L. using factorial design of experiment*. International Journal of Chemistry, 2009. **1**(1): p. 36.
156. Anwar, F. and R. Przybylski, *Effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from flaxseed (Linum usitatissimum L.)*. ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 2012. **11**(3): p. 293-302.
157. Öztopçu-Vatan, P., et al. *Screening of antimicrobial, cytotoxic effects and phenolic compounds of the moss Aulacomnium androgynum (Hedw.) schwagr (Bryophyta)*. 2017. Pakistan Agricultural Scientists Forum.
158. Tienaho, J., et al., *Ultraviolet absorbance of Sphagnum magellanicum, S. fallax and S. fuscum extracts with seasonal and species-specific variation*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2021. **20**(3): p. 379-389.
159. Erturk, O., et al., *The antimicrobial and antioxidant activities of extracts obtained from some moss species in Turkey*. Herba Polonica, 2015. **61**(4).
160. Badridze, G., et al., *Content of Active Metabolites in some Species of Mosses of Georgia*. Bull. Georg. Natl. Acad. Sci, 2020. **14**(1).
161. Veličković, J.M., et al., *The determination of the phenolic composition, antioxidative activity and heavy metals in the extracts of Calendula officinalis L.* Savremene tehnologije, 2014. **3**(2): p. 46-51.
162. Filiz, S., I. Semra, and F.-I. Cansu, *An evaluation of the antimicrobial activity of some Turkish mosses*. Journal of Medicinal Plants Research, 2011. **5**(14): p. 3286-3292.
163. Peters, K., et al., *Seasonal variation of secondary metabolites in nine different bryophytes*. Ecology and evolution, 2018. **8**(17): p. 9105-9117.
164. Sievers, H., et al., *Further biflavonoids and 3'-phenylflavonoids from Hypnum cupressiforme*. Phytochemistry, 1994. **35**(3): p. 795-798.
165. Üçüncü, O., et al., *Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of mosses (Tortula muralis Hedw., Homalothecium lutescens (Hedw.) H. Rob., Hypnum cupressiforme Hedw., and Pohlia nutans (Hedw.) Lindb.) from Turkey*. Turkish Journal of Chemistry, 2010. **34**(5): p. 825-834.
166. Klavina, L., et al., *Chemical composition analysis, antimicrobial activity and cytotoxicity screening of moss extracts (moss phytochemistry)*. Molecules, 2015. **20**(9): p. 17221-17243.
167. Boo, Y.C., *p-Coumaric acid as an active ingredient in cosmetics: A review focusing on its antimelanogenic effects*. Antioxidants, 2019. **8**(8): p. 275.
168. Kim, S.Y., et al., *Isorhamnetin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglia by inactivating NF- κ B, blocking the TLR4 pathway and reducing ROS generation*. International Journal of Molecular Medicine, 2019. **43**(2): p. 682-692.

169. Aydinl, S., M. Alatas, and N. Batan, *Fatty Acid Content and Free Radical Scavenging (DPPH) Activities of Some of Bryophytes Extracts*. FRESINIUS ENVIRONMENTAL BULLETIN, 2021. **30**(3).
170. Becker, M.M., et al., *Determination of the antioxidant capacity of red fruits by miniaturized spectrophotometry assays*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2019. **30**: p. 1108-1114.
171. Indrianingsih, A.W., S. Tachibana, and K. Itoh, *In vitro evaluation of antioxidant and α -glucosidase inhibitory assay of several tropical and subtropical plants*. Procedia Environmental Sciences, 2015. **28**: p. 639-648.
172. Bakari, S., et al., *Phytochemicals, antioxidant and antimicrobial potentials and LC-MS analysis of hydroalcoholic extracts of leaves and flowers of *Erodium glaucophyllum* collected from Tunisian Sahara*. Food Science and Technology, 2018. **38**: p. 310-317.
173. Aryal, S., et al., *Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from Western Nepal*. Plants, 2019. **8**(4): p. 96.
174. Wijaya, S., et al., *In vitro 5-LOX inhibitory and antioxidant activities of extracts and compounds from the aerial parts of *Lopholaena coriifolia* (Sond.) E. Phillips & CA Sm.* Journal of Complementary and Integrative Medicine, 2012. **9**(1).
175. Kashyap, R., et al., *Seasonal variation of antioxidant enzymatic responses in the desiccation-tolerant bryophyte *Syntrichia ruralis* (Hedw.) Web. & Mohr*. COLUMELLA: JOURNAL OF AGRICULTURAL AND ENVIRONMENTAL SCIENCES, 2021. **8**(1): p. 37-50.
176. Fukumoto, L. and G. Mazza, *Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds*. Journal of agricultural and food chemistry, 2000. **48**(8): p. 3597-3604.
177. Liu, X., et al., *Glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of flavonoid compound and triterpenoid compound from *Agrimonia Pilosa* Ledeb.* BMC complementary and alternative medicine, 2014. **14**(1): p. 1-10.
178. Haenen, G.R., et al., *Structure and activity in assessing antioxidant activity in vitro and in vivo: A critical appraisal illustrated with the flavonoids*. Environmental toxicology and pharmacology, 2006. **21**(2): p. 191-198.
179. Maiese, K., S. Daniela Morhan, and Z. Zhong Chong, *Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus*. Current neurovascular research, 2007. **4**(1): p. 63-71.
180. Duletić-Laušević, S., et al., *Antineurodegenerative, antioxidant and antibacterial activities and phenolic components of *Origanum majorana* L.(Lamiaceae) extracts*. J. Appl. Bot. Food Qual, 2018. **91**: p. 126-134.
181. Krentz, A.J. and C.J. Bailey, *Oral antidiabetic agents*. Drugs, 2005. **65**(3): p. 385-411.
182. Kan, L., et al., *Interaction of bread and berry polyphenols affects starch digestibility and polyphenols bio-accessibility*. Journal of Functional Foods, 2020. **68**: p. 103924.
183. Bartsch, H. and J. Nair, *Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair*. Langenbeck's Archives of Surgery, 2006. **391**(5): p. 499-510.

184. Yayintas, Ö., S. Yilmaz, and M. Sokmen, *Determination of antioxidant, antimicrobial and antitumor activity of bryophytes from Mount Ida (Canakkale, Turkey)*. Indian Journal of Traditional Knowledge, 2019. **18**(2).
185. Mertens-Talcott, S.U., et al., *Ellagic acid potentiates the effect of quercetin on p21waf1/cip1, p53, and MAP-kinases without affecting intracellular generation of reactive oxygen species in vitro*. The Journal of nutrition, 2005. **135**(3): p. 609-614.
186. Basli, A., N. Belkacem, and I. Amrani, *Health benefits of phenolic compounds against cancers*. Phenolic compounds-biological activity. London: InTechOpen, 2017: p. 193-210.
187. Snyder, C.M., et al., *Nitric oxide induces cell death by regulating anti-apoptotic BCL-2 family members*. PloS one, 2009. **4**(9): p. e7059.
188. Reveneau, S., et al., *Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade, proliferation rate, and expression of progesterone receptors*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1999. **79**(10): p. 1215-1225.
189. Kwon, H.S. and S.-H. Koh, *Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes*. Translational neurodegeneration, 2020. **9**(1): p. 1-12.
190. Lucas, S.M., N.J. Rothwell, and R.M. Gibson, *The role of inflammation in CNS injury and disease*. British journal of pharmacology, 2006. **147**(S1): p. S232-S240.
191. Ganesan, P., et al., *Antineuroinflammatory activities and neurotoxicological assessment of curcumin loaded solid lipid nanoparticles on LPS-stimulated BV-2 microglia cell models*. Molecules, 2019. **24**(6): p. 1170.
192. Zhou, Y., et al., *Chemical constituents of hemp (Cannabis sativa L.) seed with potential anti-neuroinflammatory activity*. Phytochemistry Letters, 2018. **23**: p. 57-61.
193. Božić, I.D., *Antiinflamatorna i antioksidativna svojstva benfotiamina u aktiviranoj liniji mikroglijskih ćelija miša: uloga proinflamatornih signalnih puteva*. Универзитет у Београду, 2016.
194. Liu, B., et al., *Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis*. Journal of neurochemistry, 2001. **77**(1): p. 182-189.
195. Lee, P., et al., *NO as an autocrine mediator in the apoptosis of activated microglial cells: correlation between activation and apoptosis of microglial cells*. Brain research, 2001. **892**(2): p. 380-385.
196. Kingham, P., M. Cuzner, and J. Pocock, *Apoptotic pathways mobilized in microglia and neurones as a consequence of chromogranin A-induced microglial activation*. Journal of neurochemistry, 1999. **73**(2): p. 538-547.
197. HOU, R.C.W., et al., *Oxidative Toxicity in BV-2 Microglia Cells: Sesamol Neuroprotection of H₂O₂ Injury Involving Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2005. **1042**(1): p. 279-285.
198. Kang, C.-H., et al., *Quercetin inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 microglial cells by suppressing the NF- κ B pathway and activating the Nrf2-dependent HO-1 pathway*. International immunopharmacology, 2013. **17**(3): p. 808-813.

199. Jeong, E.J., et al., *Inhibitory constituents of Euonymus alatus leaves and twigs on nitric oxide production in BV2 microglia cells*. Food and chemical toxicology, 2011. **49**(6): p. 1394-1398.
200. Daroi, P.A., S.N. Dhage, and A.R. Juvekar, *p-Coumaric acid mitigates lipopolysaccharide induced brain damage via alleviating oxidative stress, inflammation and apoptosis*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2022. **74**(4): p. 556-564.
201. Sawada, M., et al., *Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture*. Brain research, 1989. **491**(2): p. 394-397.
202. Zajicek, J., et al., *Interactions between oligodendrocytes and microglia: a major role for complement and tumour necrosis factor in oligodendrocyte adherence and killing*. Brain, 1992. **115**(6): p. 1611-1631.
203. Hu, S., P. Peterson, and C. Chao, *Cytokine-mediated neuronal apoptosis*. Neurochemistry international, 1997. **30**(4-5): p. 427-431.
204. Khalil, M., et al., *Repressive effect of Rhus coriaria L. fruit extracts on microglial cells-mediated inflammatory and oxidative stress responses*. Journal of Ethnopharmacology, 2021. **269**: p. 113748.
205. Awada, R., et al., *Autotaxin protects microglial cells against oxidative stress*. Free Radical Biology and Medicine, 2012. **52**(2): p. 516-526.
206. Cobourne-Duval, M.K., et al., *The antioxidant effects of thymoquinone in activated BV-2 murine microglial cells*. Neurochemical research, 2016. **41**(12): p. 3227-3238.
207. Zolghadri, S., et al., *A comprehensive review on tyrosinase inhibitors*. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, 2019. **34**(1): p. 279-309.
208. Cespedes, C.L., et al., *Inhibition on cholinesterase and tyrosinase by alkaloids and phenolics from Aristotelia chilensis leaves*. Food and Chemical Toxicology, 2017. **109**: p. 984-995.
209. Neagu, E., et al., *Assessment of acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of Alchemilla vulgaris and Filipendula ulmaria extracts*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2015. **52**: p. 1-6.
210. Johnson, G. and S. Moore, *The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design*. Current pharmaceutical design, 2006. **12**(2): p. 217-225.
211. Uriarte-Pueyo, I. and M. I Calvo, *Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors*. Current medicinal chemistry, 2011. **18**(34): p. 5289-5302.
212. Xie, Y., et al., *Inhibition of flavonoids on acetylcholine esterase: binding and structure-activity relationship*. Food & function, 2014. **5**(10): p. 2582-2589.
213. Zhou, P. and F. Hua, *Exploration of Acetylcholinesterase Inhibitors from Flavonoids and Flavonoid Glycosides*. Neurochemical Journal, 2020. **14**(3): p. 251-256.
214. Jakimiuk, K., et al., *Flavonoids as tyrosinase inhibitors in in silico and in vitro models: Basic framework of SAR using a statistical modelling approach*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2022. **37**(1): p. 427-436.
215. El-Nashar, H.A., et al., *Insights on the inhibitory power of flavonoids on tyrosinase activity: A survey from 2016 to 2021*. Molecules, 2021. **26**(24): p. 7546.

216. Taofiq, O., et al., *Hydroxycinnamic acids and their derivatives: Cosmeceutical significance, challenges and future perspectives, a review*. *Molecules*, 2017. **22**(2): p. 281.
217. Raziyeva, K., et al., *Immunology of acute and chronic wound healing*. *Biomolecules*, 2021. **11**(5): p. 700.
218. Moghadam, S.E., et al., *Hypermongone C accelerates wound healing through the modulation of inflammatory factors and promotion of fibroblast migration*. *Molecules*, 2019. **24**(10): p. 2022.
219. Ozcan, T., et al., *Phenolics in human health*. *International Journal of chemical engineering and applications*, 2014. **5**(5): p. 393.

Прилог 1

Списак скраћеница

АБТС – 2,2'-азинобис-3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина

АДТ – енгл. Auto Dock Tools

АК – аскорбинска киселина

АТСС – енгл. American Tissue Culture Collection

БХА – бутил-хидроксианизол

БХТ – бутил-хидрокситолуен

ВВ2 – нормална ћелијска линија мишије микроглије

БСА – албумин говеђег серуме

ЦНС – централни нервни систем

DMEM – енгл. Dulbecco's Modified Eagle Medium

ДМСО – диметил сулфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина

ДППХ – 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил

ДТНБ – 5,5'-дитиобис-2-нитробензоева киселина

ЕАК – еквиваленти аскорбинске киселине

ЕГК – еквиваленти галне киселине

ЕК – еквиваленти кверцетина

ЕКК – еквиваленти кофеинске киселине

ЕКм – еквиваленти кумарина

ELISA – енгл. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ЕУК – еквиваленти урсолне киселине

FBS – енгл. Fetal Bovine Serum

Fe(II)– феро јон

Fe(III) – фери јон

FRAP – енгл. Ferric Reducing Antioxidant Power

НСТ-116 – ћелијска линија хуманог колоректалног тумора

HIF-1 α – енгл. Hypoxia-inducible factor 1-alpha

НОС1 – хипохлоритна киселина

H_2O_2 – водоник-пероксид
IL – интерлеукин
iNOS – индуцибилна азот оксид синтаза
IU – енгл. International Unit
J – екстракт маховине сакупљене у јесен
J-4 – екстракт маховине сакупљене у јесен добијен употребом етил ацетата
K_i – константа инхибиције
KK – којична киселина
Л – екстракт маховине сакупљене у лето
Л-4 – екстракт маховине сакупљене у лето добијен употребом етил ацетата
L-DOPA – 3,4-дихидрокси-L-фенилаланин
LC-MS – енгл. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry
LGA – енгл. Lamarckian Genetic Algorithm
ЛПС – липополисахарид
L929 – нормална ћелијска линија мишјих фибробласта
MDA-MB-231 – ћелијска линија хуманог аденокарцинома дојке
МПО – мијелопероксидаза
MRC-5 – нормална ћелијска линија хуманих фибробласта плућа
МТТ – енгл. Methyl Thiazol Tetrazolium,
NBT – енгл. Nitro Blue Tetrazolium
нд – није детектовано
NF-κB – енгл. Nuclear Factor κ-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells
NO – азот оксид
O₂ – молекулски кисеоник
O₂^{•-} – супероксид-анјон радикал
OH[•] – хидроксилни јон
П – екстракт маховине сакупљене у пролеће
П-1 – екстракт маховине сакупљене у пролеће добијен употребом воде
П-2 – екстракт маховине сакупљене у пролеће добијен употребом етанола

П-3 – екстракт маховине сакупљене у пролеће добијен употребом смеше воде и етанола

П-4 – екстракт маховине сакупљене у пролеће добијен употребом етил ацетата
р вредност – вредност вероватноће (енгл. probability value)

PBS – енгл. Phosphate-Buffered Saline

PDB – енгл. Protein Data Bank

pH– мера активности јона водоника

pNPG – *p*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид

PBK – реактивне врсте кисеоника

RMSD – енгл. Root Mean Square Deviation, вредност корена средњег квадрата одступања

RPMI – енгл. Roswell Park Memorial Institute

СДС – натријум додецил сулфат

SH-SY5Y – ћелијска линија неурона човека

СОД – супероксид дисмутаза

SPSS – енгл. Statistical Package for the Social Sciences

ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин

T25 флак – флак површине 25 cm²

T75 флак – флак површине 75 cm²

TLR4 – рецептор сличан Toll-у 4

TNF- α – фактор некрозе тумора- α

УРП – укупни редукциони потенцијал

УСФЈ – укупан садржај фенолних једињења

УСФК – укупан садржај фенолних киселина

УСФ – укупан садржај флавоноида

УСФЛ – укупан садржај флавонола

УСТ – укупан садржај тритерпеноида

УСК – укупан садржај кумарина

UFF – енгл. Universal Force Field

UHPLC – енгл. Ultra-High-Performance Liquid Chromatography

UV – енгл. UltraViolet

UV-Vis – енгл. UltraViolet-Visible

vs. – у односу на (енгл. versus)

w/v – енгл. weight/volume

2D – дводимензионално

3D – тродимензионално

ΔG – енергија везивања

Прилог 2

Списак слика

Слика 1. Имуностимулација и имуносупресија и њихов утицај на хомеостазу у различитим патолошким стањима.....	4
Слика 2. Изглед маховине <i>Hypnum cupressiforme</i>	7
Слика 3. Одабрани представници фенолних киселина у биљкама.....	12
Слика 4. Најзначајније класе флавоноида у биљкама.....	13
Слика 5. Најзначајније класе кумарина у биљкама.....	14
Слика 6. Одабрани представници терпена у биљкама и бриофитама.....	16
Слика 7. Одабрани секундарни метаболити детектовани у екстрактима бриофита и њихове потенцијалне биолошке активности.....	17
Слика 8. Механизам настајања и реакције одабраних РВК.....	18
Слика 9. Улоге и локације ензима α -амилазе и α -глукозидазе.....	22
Слика 10. Утицај модулације РВК у туморском окружењу.....	25
Слика 11. Утицај модулације концентрације NO у туморском окружењу.....	26
Слика 12. Приказ утицаја мирујуће и активиране микроглије на неуроне.....	30
Слика 13. Улога и локација ацетилхолинестеразе.....	32
Слика 14. Морфологија ћелија коришћених у докторској дисертацији.....	57
Слика 15. Ензимска редукција МТТ до формазана.....	60
Слика 16. Редукција NBT до формазана.....	61
Слика 17. Принцип Griess-ове реакције.....	62
Слика 18. 2D интеракције шест најбоље ранжираних представника из сваке класе секундарних метаболита (дефинисаних према њиховој хемијској структури) са активним местом ацетилхолинестеразе (обележено жуто).....	111
Слика 19. Приказ 3D интеракција најбоље ранжираног секундарног метаболита (ериодиктиол) са активним местом ацетилхолинестеразе.....	113
Слика 20. Модел тирозиназе човека добијен хомологним моделовањем.....	114
Слика 21. Рамачандранов дијаграм за моделовану тирозиназу човека.....	115
Слика 22. 2D интеракције шест најбоље ранжираних представника из сваке класе секундарних метаболита (дефинисаних према њиховој хемијској структури) са активним местом (обележено наранџасто) тирозиназе гљиве.....	119
Слика 23. Приказ 3D интеракција најбоље ранжираног секундарног метаболита (кверцетин-3- <i>O</i> -рутинозид) са активним местом тирозиназе гљиве.....	120

- Слика 24.** 2D интеракције шест најбоље ранжираних представника из сваке класе секундарних метаболита (дефинисаних према њиховој хемијској структури) са активним местом (обележено црвено) моделоване тирозиназе човека.....**121**
- Слика 25.** Приказ 3D интеракција најбоље ранжираног секундарног метаболита (кофеинска киселина) са активним местом моделоване тирозиназе човека.....**122**
- Слика 26.** Репрезентативне микрографије добијене за контролу (К) и етил-ацетатне екстракте маховине *H. cupressiforme* из лета (**Л-4**) и јесени (**Ј-4**) на месту огреботине ћелијског монослоја L929, током праћених временских интервала (0, 24 и 48 сати)...**123**

Прилог 3

Списак табела

Табела 1. Класификација терпена и терпеноида.....	15
Табела 2. Састав коришћених раствора, пуфера и медијума.....	43
Табела 3. Називи и произвођачи коришћених ELISA комплета.....	45
Табела 4. Ознаке и приноси екстракције за пролећни аспект маховине <i>H. cupressiforme</i>	73
Табела 5. Принос екстракције за летњи и јесењи аспект маховине <i>H. cupressiforme</i>	73
Табела 6. Укупни садржај различитих класа секундарних метаболита у екстрактима пролећног аспекта маховине <i>H. cupressiforme</i>	74
Табела 7. Фенолне киселине и флавоноиди (mg/100 g екстракта) детектовани LC-MS анализом у екстрактима пролећног аспекта маховине <i>H. cupressiforme</i>	76
Табела 8. Спектрофотометријско одређивање укупног садржаја различитих класа једињења у етил-ацетатним екстрактима летњег и јесењег аспекта маховине <i>H. cupressiforme</i>	79
Табела 9. Поређење укупног садржаја различитих класа једињења у етил-ацетатним екстрактима пролећног, летњег и јесењег аспекта маховине <i>H. cupressiforme</i>	80
Табела 10. Инхибиција ДППХ радикала екстрактима маховине <i>H. cupressiforme</i>	81
Табела 11. Укупни редукциони потенцијал (УРП) екстраката маховине <i>H. cupressiforme</i>	82
Табела 12. Инхибиција активности ензима α -амилазе екстрактима маховине <i>H. cupressiforme</i>	85
Табела 13. Цитокомпатибилност и ефекат различитих екстраката маховине <i>H. cupressiforme</i> (10 μ g/mL) сакупљене током пролећа на продукцију РВК и NO од стране MRC-5 ћелија.....	88
Табела 14. Ефекат различитих екстраката маховине <i>H. cupressiforme</i> (10 μ g/mL) сакупљене током пролећа на метаболичку активност и продукцију РВК и NO од стране НСТ-116 ћелија.....	92
Табела 15. Резултати докинг симулације и интеракције секундарних метаболита детектованих у екстрактима маховине <i>H. cupressiforme</i> са активним местом ацетилхолинестеразе.....	110

Табела 16. Резултати докинг симулације и интеракције секундарних метаболита детектованих у екстрактима маховине <i>H. cupressiforme</i> са активним местом тирозиназе гљиве.....	117
Табела 17. Резултати докинг симулације и интеракције секундарних метаболита детектованих у екстрактима маховине <i>H. cupressiforme</i> са активним местом моделоване тирозиназе човека.....	118
Табела 18. Просечна ширина повреде (μm) и стопа миграције ћелија (%) за контролу (К) и етил-ацетатне екстракте маховине <i>H. cupressiforme</i> из лета (Л-4) и јесени (Ј-4) на месту огреботине ћелијског монослоја L929, током праћених временских интервала (0, 24 и 48 сати).....	124

Прилог 4

Списак графика

- График 1.** Инхибиција обезбојавања β -каротена различитим екстрактима маховине *H. cupressiforme* сакупљене током пролећа (П), лета (Л) и јесени (Ј).....**83**
- График 2.** Поређење инхибиције обезбојавања β -каротена етил-ацетатним екстрактима маховине *H. cupressiforme* сакупљене током пролећа (П-4), лета (Л-4) и јесени (Ј-4)...**84**
- График 3.** Инхибиција α -глукозидазе различитим екстрактима маховине *H. cupressiforme* сакупљене током пролећа (П), лета (Л) и јесени (Ј).....**86**
- График 4.** Поређење инхибиције α -глукозидазе етил-ацетатним екстрактима маховине *H. cupressiforme* сакупљене током пролећа (П-4), лета (Л-4) и јесени (Ј-4).....**87**
- График 5.** Утицај испитиваних екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 $\mu\text{g/mL}$) сакупљене током пролећа на метаболичку активност MDA-MB-231 ћелија.....**89**
- График 6.** Утицај испитиваних екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 $\mu\text{g/mL}$) сакупљене током пролећа на продукцију супероксид-анјон радикала од стране MDA-MB-231 ћелија.....**90**
- График 7.** Утицај испитиваних екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 $\mu\text{g/mL}$) сакупљене током пролећа на продукцију NO (процењено на основу концентрације нитрита) од стране MDA-MB-231 ћелија.....**91**
- График 8.** Утицај испитиваних екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 $\mu\text{g/mL}$) сакупљене током пролећа на метаболичку активност ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.....**93**
- График 9.** Утицај испитиваних екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 $\mu\text{g/mL}$) сакупљене током пролећа на продукцију супероксид-анјон радикала од стране ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.....**94**
- График 10.** Утицај испитиваних екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 $\mu\text{g/mL}$) сакупљене током пролећа на продукцију NO (процењено на основу концентрације нитрита) од стране ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.....**95**
- График 11.** Утицај етил-ацетатних екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 $\mu\text{g/mL}$) сакупљене током лета и јесени на метаболичку активност ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.....**96**
- График 12.** Утицај етил-ацетатних екстраката маховине *H. cupressiforme* (10 $\mu\text{g/mL}$) сакупљене током лета и јесени на продукцију супероксид-анјон радикала од стране ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.....**97**

График 13. Утицај етил-ацетатних екстраката маховине <i>H. cupressiforme</i> (10 µg/mL) сакупљене током лета и јесени на продукцију NO (процењено на основу концентрације нитрита) од стране ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.....	98
График 14. Утицај етил-ацетатних екстраката маховине <i>H. cupressiforme</i> (10 µg/mL) сакупљене током лета и јесени на продукцију цитокина а) TNF-α и б) IL-6 од стране ЛПС-ом стимулираних BV2 ћелија.....	99
График 15. Утицај супернатаната ЛПС-ом стимулираних и екстрактима маховине <i>H. cupressiforme</i> третираних BV2 ћелија на метаболичку активност SH-SY5Y неурона.....	100
График 16. Утицај етил-ацетатних екстраката маховине <i>H. cupressiforme</i> (10 µg/mL) сакупљене током лета и јесени на метаболичку активност водоник-пероксидом стимулираних BV2 ћелија.....	102
График 17. Утицај етил-ацетатних екстраката маховине <i>H. cupressiforme</i> (10 µg/mL) сакупљене током лета и јесени на продукцију супероксид-анјон радикала од стране водоник-пероксидом стимулираних BV2 ћелија.....	103
График 18. Инхибиција ацетилхолинестеразе различитим екстрактима маховине <i>H. cupressiforme</i> сакупљене током пролећа (П), лета (Л) и јесени (Ј).....	104
График 19. Поређење инхибиције ацетилхолинестеразе етил-ацетатним екстрактима маховине <i>H. cupressiforme</i> сакупљене током пролећа (П-4), лета (Л-4) и јесени (Ј-4).	105
График 20. Инхибиција тирозиназе различитим екстрактима маховине <i>H. cupressiforme</i> сакупљене током пролећа (П), лета (Л) и јесени (Ј).....	106
График 21. Поређење инхибиције тирозиназе етил-ацетатним екстрактима маховине <i>H. cupressiforme</i> сакупљене током пролећа (П-4), лета (Л-4) и јесени (Ј-4).....	107

Биографија

Тања М. Лунић је рођена 1.1.1995. у Книну. Основну и средњу школу завршава у Сремској Митровици. Основне академске студије уписује 2013. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду, студијски програм Биохемија, а завршава их 2017. године, одбраном дипломског рада, под менторством др Владимира Бешкоског, са просечном оценом 8,65.

Мастер академске студије уписује 2018. године на Биолошком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Молекуларна биологија и физиологија – модул Имунобиологија. Студије завршава 2019. године одбраном мастер рада под називом „Карактеризација екстракта из маховине *Hypnum cupressiforme* Hedw. сакупљене на Вршачким планинама и испитивање њихових имуномодулаторних ефеката *in vitro*“, под менторством др Биљане Божић Недељковић и др Бојана Божића са просечном оценом 10.

Докторске академске студије студијски програм Биологија, модул Имунобиологија уписује 2019. године на Биолошком факултету.

Од 2020. године је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја. Од јануара 2022. године запослена је као истраживач приправник на Биолошком факултету Универзитета у Београду на Катедри за општу физиологију и биофизику, а од октобра 2022. године као истраживач сарадник. Од 2020. године учествује у извођењу практичне наставе у области Имунологије на Биолошком факултету. Школске 2020/21 је учесник пројекта „Развој високог образовања“ – Виртуелна експериментална имунологија и имуноинформатика. Од 2022. године је учесник међународног пројекта Министарства образовања и истраживања Немачке под називом „Rückstände aus der industriellen Teeproduktion als nachwachsende Rohstoffquelle für medizinische Wirkstoffe“.

Аутор је 8 научних радова у часописима међународног значаја, 10 саопштења на међународним, а 4 на националним скуповима.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Тања Лунић _____

Број индекса _____ Б3018/2019 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Испитивање имуномодулаторног потенцијала екстраката маховине
Hypnum cupressiforme Hedw. “**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора _____ Тања Лунић _____

Број индекса _____ Б3018/2019 _____

Студијски програм _____ Биологија _____

Наслов рада „Испитивање имуномодулаторног потенцијала екстраката маховине
Hypnum cupressiforme Hedw.“

Ментор _____ проф. др Биљана Божић Недељковић и др Бојан Божић _____

Потписани/а _____ Тања Лунић _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Испитивање имуномодуlatorног потенцијала екстраката маховине
Hypnum cupressiforme Hedw.“

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе 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 прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

Article

Extracts Characterization and In Vitro Evaluation of Potential Immunomodulatory Activities of the Moss *Hypnum cupressiforme* Hedw.

Tanja M. Lunić¹, Mariana M. Oalde² , Marija R. Mandić¹, Aneta D. Sabovljević², Marko S. Sabovljević² , Uroš M. Gašić³ , Sonja N. Duletić-Laušević², Bojan Dj. Božić^{1,*}  and Biljana Dj. Božić Nedeljковиć^{1,*} 

¹ Institute of Physiology and Biochemistry “Ivan Djaja”, Faculty of Biology, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia; b3018_2019@stud.bio.bg.ac.rs (T.M.L.); b3022_2019@stud.bio.bg.ac.rs (M.R.M.)

² Institute of Botany and Botanical Garden “Jevremovac”, Faculty of Biology, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia; mariano@bio.bg.ac.rs (M.M.O.); aneta@bio.bg.ac.rs (A.D.S.); marko@bio.bg.ac.rs (M.S.S.); sduletic@bio.bg.ac.rs (S.N.D.-L.)

³ Department of Plant Physiology, Institute for Biological Research “Sinisa Stankovic”, National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade, Bulevar Despota Stefana 142, 11060 Belgrade, Serbia; uros.gasic@ibiss.bg.ac.rs

* Correspondence: bbozic@bio.bg.ac.rs (B.D.B.); biljana@bio.bg.ac.rs (B.D.B.N.); Tel.: +381-11-303-23-56 (B.D.B.N.)

† These authors contributed equally to this study.

Academic Editor: Panagiotis Zoumpoulakis

Received: 4 July 2020; Accepted: 19 July 2020; Published: 23 July 2020



Abstract: Recently, there has been an increasing interest in the chemistry and biological potential of mosses, since a large number of biologically active compounds have been found within these species. This study aimed at examining the chemical composition and immunomodulatory potential (antioxidant, antidiabetic, anti-neuroinflammatory/antineurodegenerative, and antitumor activities) of moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. extracts. Corresponding extracts have been obtained applying Soxhlet extractor. The chemical characterization was performed using spectrophotometric assays and liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS). The extracts were analyzed for antioxidant activity and for inhibitory activities on α -glucosidase, α -amylase, acetylcholinesterase, and tyrosinase. Additionally, extracts were tested against four cell lines—MRC-5, BV2, HCT-116, and MDA-MB-231—for antitumor and anti-inflammatory activities. Chemical analysis of extracts revealed the presence of flavonoids, phenolic acids, and triterpenoids. Major compounds identified by LC-MS in *H. cupressiforme* were kaempferol and five phenolic acids: *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, *p*-coumaric, gallic, and caffeic acid. According to biochemical assays the investigated extracts exhibited significant immunomodulatory potential. Significant antiproliferative potential against MDA-MB-231 cells has been observed together with the promising anti-neuroinflammatory application. The obtained data suggest that moss *H. cupressiforme* is a valuable natural source of biologically active compounds with potential application in the pharmaceutical industry.

Keywords: moss extract; *Hypnum cupressiforme*; antioxidant; anti-neuroinflammatory/antineurodegenerative; antidiabetic; antitumor activity

1. Introduction

Bryophytes belong to the second largest group of plants with an estimated 23,000 species worldwide [1]. They are generally classified into three phyla: Bryophyta (mosses), Marchantiophyta (liverworts), and Anthocerotophyta (hornworts). The phylum Bryophyta consists of six classes

among which the most abundant is Bryopsida [2]. One of the moss species belonging to this class is *Hypnum cupressiforme* Hedw. (Hypnaceae, Hypnales), commonly known as the cypress-leaved plait-moss or simply hypnum moss. This moss can be found within almost all continents and terrestrial habitat types. It grows on versatile surfaces like logs, walls, or rocks. This moss is typically 2–10 cm long and pleurocarpous, with branched stems that are forming dense green mats. *H. cupressiforme* is a highly polymorphic species with a great number of varieties [3].

The representatives of bryophytes are commonly used in traditional medicine all over the world. A moss belonging to the Hypnaceae family, *Taxiphyllum taxirameum*, has been used in traditional Chinese medicine for the treatment of various inflammation-related conditions, ulcers, skin injuries, and for the treatment of bleeding [4]. Species from the genus *Hypnum* were used for stuffing pillows and mattresses [4], which can be related to effects such as influence on sleeping quality and may indicate the antimicrobial effect. There is evidence that *H. cupressiforme* expresses good antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative activities [5,6]. Additionally, *H. cupressiforme* was used in different parts of the world for decoration purposes and costume making [4,7].

The chemistry of bryophytes has been overlooked earlier due to their small dimensions, amount of available material, and difficulties with identification [8]. However, recently, with the development of analytical techniques, the interest in bryophyte chemistry has increased [9]. Studies about bryophyte chemical composition are usually focused on their secondary metabolites, which can be divided into two main groups: polyphenols and lipids [9]. The majority of secondary metabolites from mosses belong to flavonoids, terpenoids, and bibenzyls. In addition, there are also compounds such as fatty acids and acetophenols [10]. It is crucial to emphasize that the quantitative and even qualitative composition of the secondary metabolites may be influenced by the environment. It is therefore important to note that moss used in this study was collected from the Vršacke Planine Mts., that is an independent geomorphological unit in southeastern Banat representing a remnant block of the old Pannonian massif [11] with specific microenvironmental factors (the amount of incident light, the degree of moisture, and the range of temperatures). That is of additional specificity and significance in the study of chemical and biological properties of mosses from this area.

The pharmaceutical industry is constantly developing novel pharmacologically active compounds. Medicinal plants are widely used as alternative therapeutic tools for the prevention or adjuvant therapy of various diseases. Among many other plants, bryophytes are recognized as promising sources of new biologically active compounds [8,12,13]. Some of the bryophytes secondary metabolites exhibit diverse biological activities such as cytotoxicity, antimicrobial, antifungal, antitumor, antioxidant, anti-inflammatory, and many others [1,6]. The biological activity of a certain plant extract depends on several factors such as chemical composition and structural configuration of functional groups, but also on potential synergistic or antagonistic interactions between compounds within the extract [14].

The aim of this study was to examine the chemical composition, antioxidant, antidiabetic, anti-neuroinflammatory/antineurodegenerative, and antitumor potential of the moss *H. cupressiforme* extracts in vitro. Previous studies about the biological potential of *H. cupressiforme* are infrequent, reporting good antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative activities of this species [5,6]. Additionally, this is a complex and rather genetically variable species. Therefore, this investigation, to the best of our knowledge, is the first regarding the evaluation of potential biological activities of typical moss *H. cupressiforme* originated from the unique island low-mountain area, namely, the Vršacke Planine Mts., Serbia.

2. Results

2.1. Extraction and Chemical Characterization

In order to determine appropriate extraction time, the optimization of extraction was performed. During extraction in Soxhlet apparatus, the absorbance of the ethanolic extract was monitored every 2 h by UV spectrophotometry (UV-Vis 1700, Shimadzu, Kyoto, Japan). The maximum absorption

point was reached after 10 h of extraction. This time was set as the optimum time and was used for all other solvents. Table 1 presents the solvents used for the extraction process and weights of the dry moss and crude extracts (further extract). The percentage of extraction yield ranged from 0.6% for ethyl acetate extract to 26.3% for the aqueous one. The aqueous extract was found to have a higher yield in comparison with the other extracts.

Table 1. Extraction yield for *Hypnum cupressiforme* extracts.

Label	Solvent	Moss Weight (g)	Extract Weight (g)	Yield (%)
E1	Ethanol (96%)	10	0.42	4.2
E2	Water-ethanol (1:1, vol%)	10	0.80	8.0
E3	Ethyl-acetate	10	0.06	0.6
E4	Water	7.6	2.00	26.3

The results of Total Phenolic Content (TPC), Total Phenolic Acid Content (TPAC), Total Flavonoid Content (TFC), Total Flavonol Content (TFIC), and Total Triterpenoid Content (TTC) are presented in Table 2.

Table 2. Chemical characterization of *Hypnum cupressiforme* extracts.

Samples	TPC (mg GAE/g Extract)	TPAC (mg CAE/g Extract)	TFC (mg QE/g Extract)	TFIC (mg QE/g Extract)	TTC (mg UAE/g Extract)
E1	6.25 ± 0.48	67.41 ± 6.97	35.00 ± 1.34	ND ¹	88.37 ± 1.55
E2	7.38 ± 0.34	7.08 ± 2.36	12.43 ± 0.49	ND	75.93 ± 2.97
E3	15.33 ± 0.95	339.93 ± 14.03	58.86 ± 2.82	14.11 ± 1.33	235.95 ± 4.09
E4	18.21 ± 0.73	8.31 ± 3.48	2.04 ± 0.29	ND	43.33 ± 0.86

¹ not detected.

Among the tested extracts, E3 and E4 exhibited the highest TPC values—15.3 and 18.2 mg gallic acid equivalents (GAE) per g of extract. The results of the TPAC analysis indicated that the highest concentration of phenolic acids was present in E3—339.9 mg caffeic acid equivalents (CAE) per g of extract. Total Flavonoid Content (TFC) analysis of *H. cupressiforme* extracts showed the greatest flavonoid content in E3—58.9 mg quercetin equivalents (QE) per g of extract. Regarding TFIC, it was found that only ethyl acetate extract has a considerable amount of flavonols—14.1 mg QE/g extract. Extract E3 was found to possess the highest amount of TTC—236.0 mg ursolic acid equivalents (UAE) per g of extract. The other three extracts had lower TTC. The results from the determination of total coumarin content indicate that there is no considerable amount of these compounds in any of the investigated extracts (data not shown).

LC-MS Analysis

To identify the specific chemical profile of all examined moss extracts (E1—ethanolic extract, E2—aqueous-ethanolic extract, E3—ethyl acetate extract, and E4—aqueous extract.), LC-MS chromatography was applied. The analysis confirmed the presence of 14 compounds (Table 3), including six phenolic acids: gallic acid, protocatechuic acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, and eight flavonoids: quercetin 3-*O*-rutinoside, quercetin 3-*O*-glucoside, isorhamnetin 3-*O*-glucoside, eriodictyol, apigenin, naringenin, kaempferol, and acacetin.

The predominant compounds of E1 extract were kaempferol, *p*-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid, and *p*-coumaric acid. Phytochemical characteristics of E2 extract proved to be very similar to the ones of the E1 extract. However, concentrations of the compounds in the E2 extract were slightly lower than in the E1 extract. On the contrary, E3 and E4 extracts demonstrated different phenolic profiles, compared to E1 and E2 extracts, but also compared to each other. Compounds with the highest concentrations in E3 extract were *p*-hydroxybenzoic acid and protocatechuic acid, while gallic acid and *p*-coumaric acid were found in lower concentrations. Extract E4 contained

high concentrations of *p*-hydroxybenzoic and *p*-coumaric acids, followed by protocatechuic, gallic, and caffeic acids.

Table 3. Concentrations (mg/100 g extract) of compounds in investigated extracts of the *Hypnum cupressiforme* according to the LC-MS analysis.

mg/100 g Extract	E1	E2	E3	E4
Gallic acid	0.62	0.70	0.50	1.21
Protocatechuic acid	3.75	2.89	2.39	3.91
5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	0.14	0.07	0.02	0.04
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	4.56	3.17	5.78	4.62
Caffeic acid	0.65	0.42	0.13	1.10
Quercetin 3- <i>O</i> -rutinoside	0.09	0.06	0.01	0.03
<i>p</i> -Coumaric acid	2.60	2.33	0.46	4.40
Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside	0.27	0.21	0.02	0.04
Isorhamnetin 3- <i>O</i> -glucoside	0.12	0.06	0.02	0.04
Eriodictyol	0.13	0.11	0.05	0.07
Apigenin	0.51	0.47	0.11	0.11
Naringenin	0.57	0.62	0.12	0.08
Kaempferol	7.35	6.60	0.21	0.47
Acacetin	0.21	0.15	0.09	0.02

2.2. Biochemical Analysis of Moss Extracts

2.2.1. Evaluation of Antioxidant Activity

The radical scavenging activity of moss extracts, measured with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, was lower than the activity of all standard substances. According to the results, E3 and E4 extracts at the concentration of 1000 µg/mL had moderate scavenging activity (23.8 and 19.2%, respectively) compared to standard substances 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene (BHT), 2-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), and ascorbic acid (84.1, 85.2, and 88.1%, respectively). The other extracts had low or no scavenging activity (Table S1). Considering the total reducing power (TRP) assay, the moss extracts examined in this research showed no considerable activity compared to standard substances (Table S1).

The results of the β-carotene bleaching assay are shown in Figure 1A. According to the results, E3 and E4 extracts at the concentrations of 100, 50, and 10 µg/mL displayed significant β-carotene bleaching inhibitory activities compared with the same concentrations of standard substance ascorbic acid. The percentage of inhibition of these extracts was approximately four fold higher than the standard substance ascorbic acid.

The activity of the same extracts at the concentrations of 1000 and 500 µg/mL was similar to the activity of ascorbic acid at the same concentrations. According to the results, E3 and E4 extracts have shown high inhibition percentage of β-carotene bleaching compared to ascorbic acid. In comparison with BHT and BHA, E3 and E4 extracts have shown moderate activity. Extracts E1 and E2 have shown low to moderate inhibitory activity compared with the standard substances.

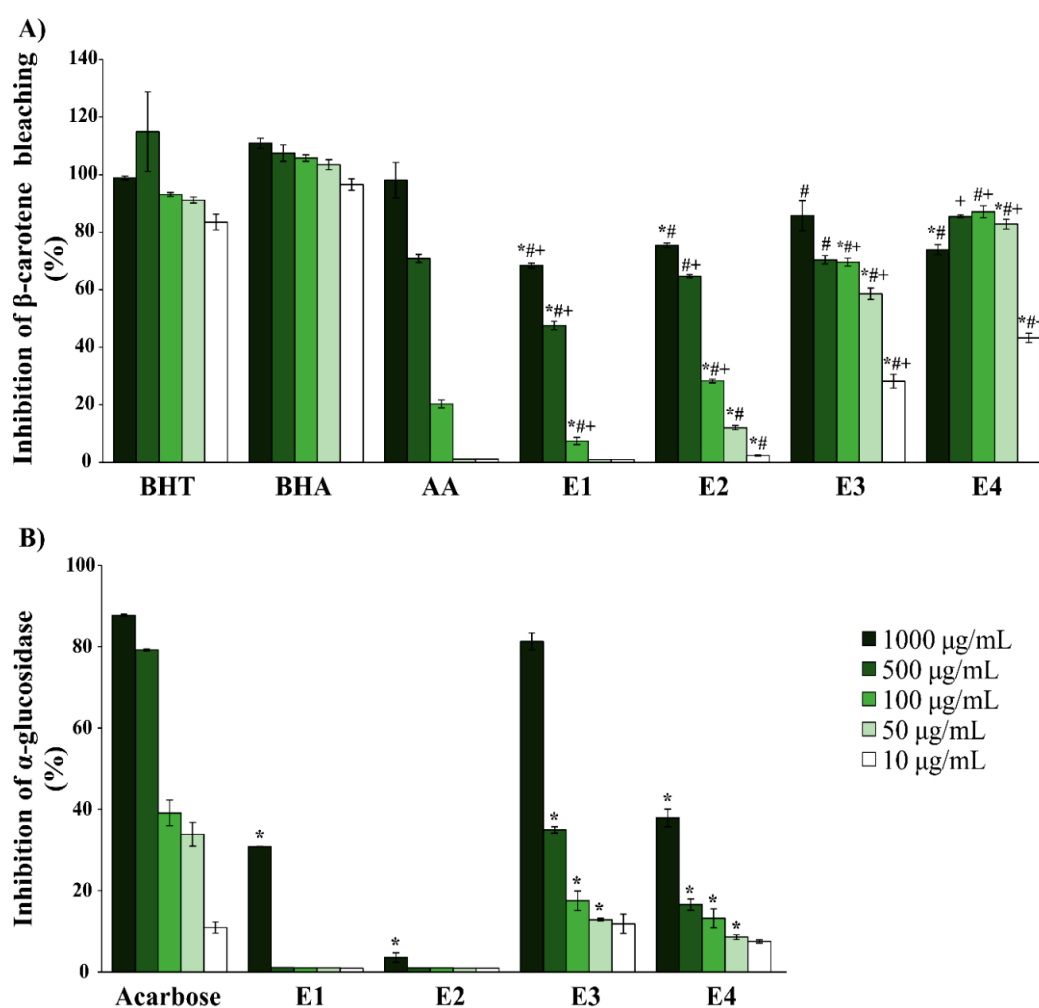


Figure 1. Biochemical analysis of *Hypnum cupressiforme* extracts as (A) antioxidant and (B) antidiabetic agents. The results are expressed as the mean \pm standard error from an experiment performed in triplicate (#, +, * $p < 0.05$ different moss extracts vs. different standard substances. Symbols # and + were used for standards BHA and AA (ascorbic acid), while * was used for all the other standards).

2.2.2. Evaluation of Antidiabetic Activity

Considering α -amylase inhibitory activity, the results have shown that the investigated extracts do not possess inhibitory activity against the α -amylase enzyme, compared to acarbose (Table S2). The results of α -glucosidase inhibitory activity (Figure 1B), however, have shown that the investigated extracts possess certain inhibitory potential against the α -glucosidase enzyme. The most active was the E3 extract, followed by the E4 extract. Both of the extracts have shown a similar percentage of inhibition to the standard substance at the concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$. According to these results, the E3 extract has shown high inhibition of α -glucosidase, while the E4 extract exhibited moderate inhibition of this enzyme. Nevertheless, it is important to point out that both extracts displayed high inhibition properties at the lowest tested concentration (10 $\mu\text{g/mL}$).

2.2.3. Evaluation of Antineurodegenerative Activity

The results for the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and tyrosinase are presented in Figure 2, respectively.

The highest AChE inhibition was achieved with E3 and E4, followed by E2 and E1 extracts. Although galantamine inhibited AChE in a concentration-dependent manner, the extracts performed the strongest activity at 10 $\mu\text{g/mL}$, except the E3 extract which performed the strongest activity at the highest

tested concentration (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), followed by the lowest tested concentration (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Galantamine did not show inhibition of AChE at the concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, while the extracts at the same concentration inhibited the enzyme. According to the obtained results, extracts have shown significantly higher inhibition activity at lower concentrations, when compared to the standard substance.

The evaluation of tyrosinase inhibitory effects showed that all four of the investigated moss extracts exhibit a high percentage of tyrosinase inhibition when compared to kojic acid. At the lowest applied concentration (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), all of the investigated extracts exhibited approximately 2.5-fold higher percentages of inhibition than kojic acid. Moreover, all investigated extracts at the remaining concentrations (50, 100, 500, and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) exhibited similar or even higher inhibition activity than kojic acid at the same concentrations.

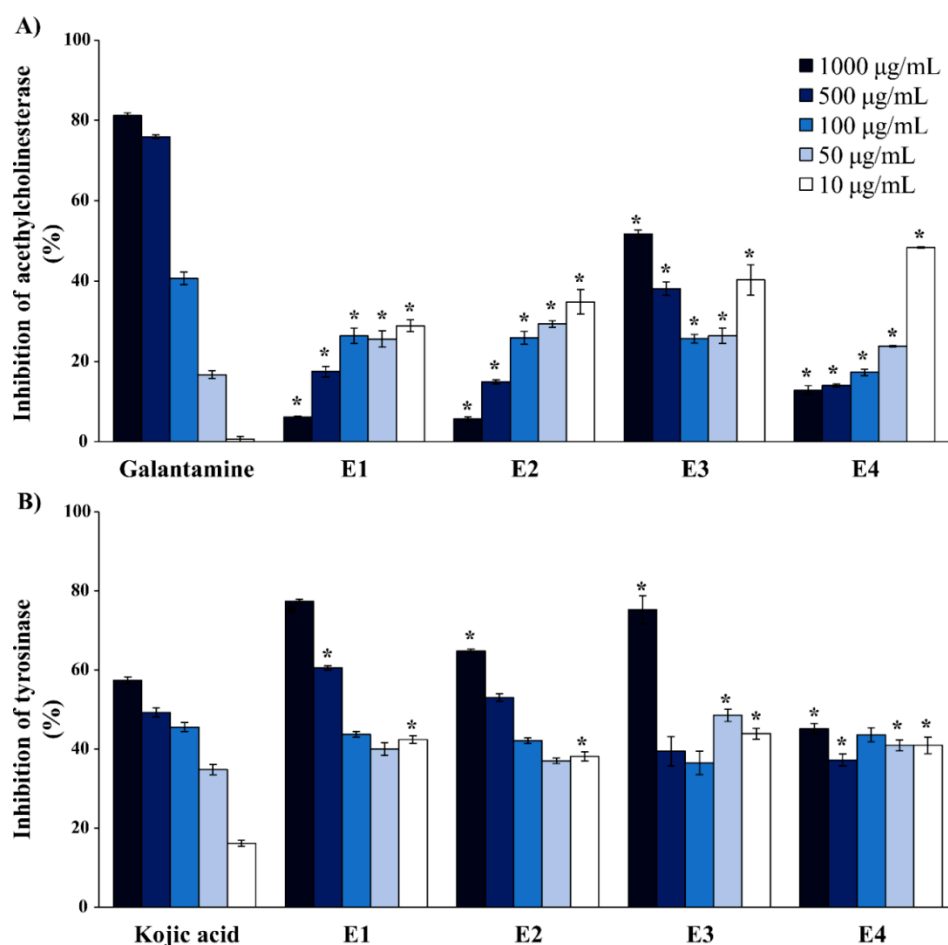


Figure 2. Biochemical analysis of *Hypnum cupressiforme* extracts as (A) antiacetylcholinesterase and (B) antityrosinase agents. The results are expressed as the mean \pm standard error from an experiment performed in triplicate (* $p < 0.05$ different moss extracts vs. different standard substances).

2.3. Immunomodulatory Activities of the Extracts

2.3.1. Evaluation of Biocompatibility of *Hypnum cupressiforme* Extracts (MTT Assay)

The effect of investigated moss extracts on the proliferation potential of the normal human fibroblast cell line, MRC-5, during 24 h was measured by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test. This test was used to estimate the biocompatibility of the extracts. The results have shown statistically significant biocompatibility of E1, E2, and E3 extracts (Table S3). Biocompatibility is expressed as a high percentage of viable normal human fibroblasts after the treatment with investigated moss extracts for 24 h. The viability of MRC-5 cells after the treatment with all moss extracts was

higher than 85%. This biocompatibility analysis demonstrates that the tested extracts do not exhibit any nonspecific toxic effect to normal human fibroblast cells, thus qualifying them as suitable for further investigation in the in vitro model systems for the treatment of some pathological conditions in humans.

2.3.2. Anti-Neuroinflammatory Potential of *Hypnum cupressiforme* Extracts

Due to the good biocompatibility of the investigated extracts and potent anti-inflammatory activity of different moss extracts shown in the existing literature [1,15], the anti-neuroinflammatory activity of the investigated extracts against microglia cell line BV2 has been tested. The results are presented in Figure 3.

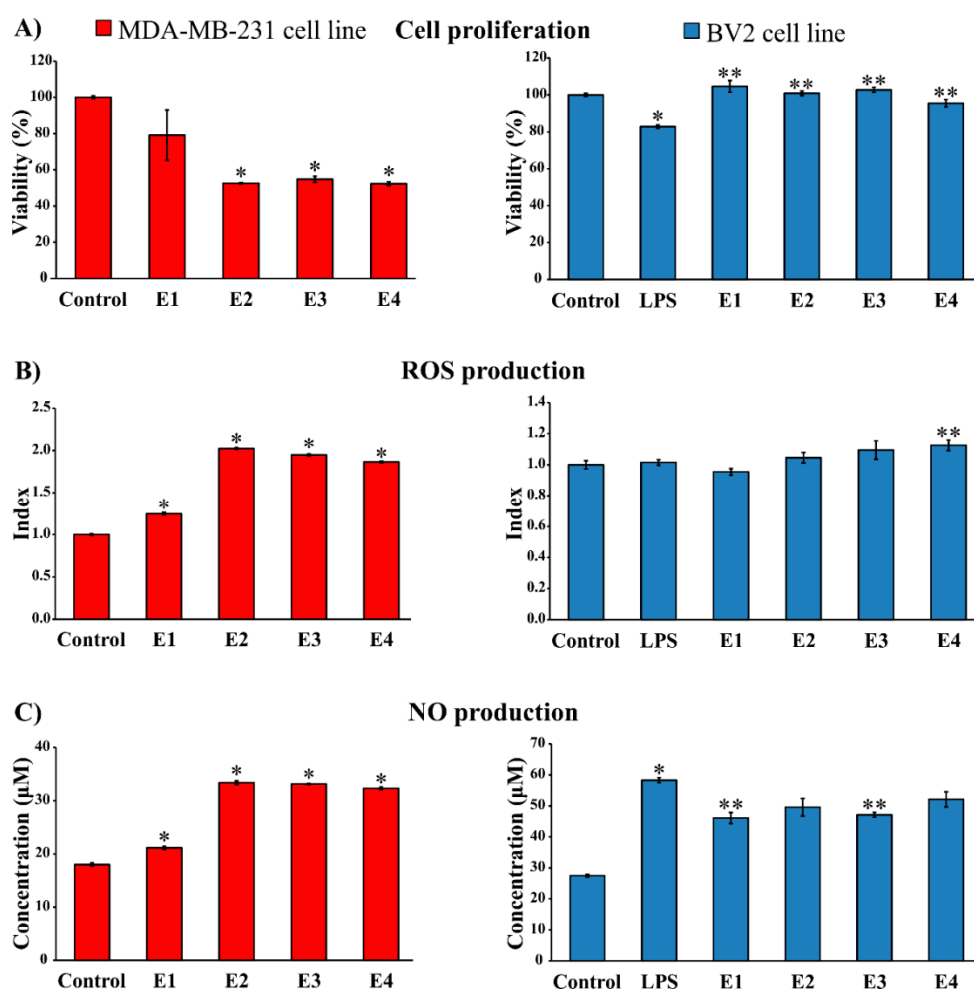


Figure 3. Immunomodulatory potential of *Hypnum cupressiforme* extracts (final concentration 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on (A) cell proliferation, (B) ROS production, and (C) NO production. The results are expressed as mean \pm standard error of a representative experiment performed in quadruplicate. (* $p < 0.05$ different moss extracts and LPS-stimulated control cells vs. non-stimulated control cells; ** $p < 0.05$ different moss extracts vs. only LPS-stimulated control cells).

The viability of BV2 microglia cells was evaluated using MTT assay (Figure 3A, right). The results have shown that, compared with the control cells, lipopolysaccharide (LPS) significantly reduced the viability of BV2 cells. Furthermore, treatment with all investigated moss extracts has led to a significant recovery of the viability of LPS-stimulated BV2 cells.

The potential of all moss extracts to modulate reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) production was further evaluated, as significant microglia inflammatory mechanisms. The treatment

with moss extracts E1, E2, and E3 did not affect the production of superoxide anion radical (O_2^-) by BV2 cells, while E4 extract increased the production of ROS in these cells, compared to untreated cells (Figure 3B, right).

The results presented in Figure 3C, right, show that *H. cupressiforme* extracts lead to a decrease in NO production of LPS-stimulated BV2 cells. Extracts E1 and E3 significantly inhibited NO production of LPS-treated BV2 cells measured by nitrite level in cell-free supernatants. This indicates that extracts E1 and E3 have the potential to suppress high NO production, which is an important inflammatory mechanism mediated by inflammatory microglia.

2.3.3. Antiproliferative Potential of *Hypnum cupressiforme* Extracts

According to the good biocompatibility of the investigated extracts and potent antitumor activity of different moss extracts shown in the existing literature [6,16], the antiproliferative activity of the investigated extracts against cancer cell lines, HCT-116 and MDA-MB-231, has been tested.

The data presented in Figure 3A, left, shows that the investigated moss extracts exhibit potent and selective antiproliferative activity against human breast cancer cell line MDA-MB-231. Extracts E2, E3, and E4 showed statistically significant inhibition of proliferation compared to untreated cells (control). On the other hand, against human colon cancer cell line HCT-116, the tested moss extracts did not express an antiproliferative effect (Table S4).

In the nitro blue tetrazolium (NBT) assay, the effects of *H. cupressiforme* extracts on superoxide anion radical (O_2^-) production by HCT-116 and MDA-MB-231 cells after 24 h have been evaluated.

All of the investigated moss extracts have led to a significant increase in O_2^- production by MDA-MB-231 cells, compared to the production of control cells (Figure 3B, left). Extracts E2, E3, and E4 displayed a higher increase in O_2^- production than extract E1. However, the investigated extracts did not express any effect on ROS production by HCT-116 cells (Table S4).

Further antiproliferative potential was evaluated through the effect of extracts on nitrite concentration in supernatants of HCT-116 and MDA-MB-231 cells, tested by Griess assay. The concentration of nitrites was used as an indicator of the nitric oxide (NO) level in the investigated cell-free supernatants.

Treatment with moss extracts significantly increased the production of NO by MDA-MB-231 cells, compared to the level of NO in supernatants of untreated cells (Figure 3C, left). As in the case of the impact of moss extracts on ROS production, the investigated extracts did not express an effect on NO production by HCT-116 cells (Table S4).

3. Discussion

In the present paper, the focus was on the chemical characterization as well as on antioxidant, antidiabetic, anti-neuroinflammatory/antineurodegenerative, and antitumor effects of four extracts (ethanolic, aqueous-ethanolic, ethyl acetate, and aqueous) of *H. cupressiforme* from Vršacke Planine Mts. Nature Park, Serbia.

The chemical characterization of moss extracts was performed using spectrophotometric assays (total phenolic, total phenolic acid, total flavonoid, total flavonol, total triterpenoid, and total coumarin contents) and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). Literature data of the chemical composition of *H. cupressiforme* are scarce, reporting the presence of n-alkanes, triglycerides, and sterols [17]. Moreover, the isolation of several new to science flavonoid constituents (five new biflavonoids and a 3'-phenylaromadendrin) from this moss has been previously reported [17,18]. Based on the results of spectrophotometric assays, it can be concluded that the highest concentration of the investigated secondary metabolites of *H. cupressiforme* was obtained when ethyl acetate was used as solvent. A previous report [12] on the total phenolic content in *H. cupressiforme* ethanolic extract revealed a lower concentration of phenols than the one found in the current study. The content of phenolic compounds in a certain plant depends on several factors such as substrate type; altitude; climate; as well as habitat, environmental condition, or geo-/geno-type [19], which could have influenced the

differences in the obtained phenolic contents of the extracts. Using LC-MS analysis made it possible to identify 14 phenolic compounds in *H. cupressiforme* extracts. The major phenolic compounds present in this moss were kaempferol and five phenolic acids: *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, *p*-coumaric, gallic acid, and caffeic acid. These compounds were distributed unevenly among the investigated moss extracts, leading to the conclusion that they have different solubility in the used solvents. The presence of kaempferol in *H. cupressiforme* has already been reported earlier [18]. Some of the compounds identified in *H. cupressiforme* by LC-MS, including *p*-hydroxybenzoic, 5-*O*-caffeoylquinic, caffeic, *p*-coumaric, protocatechuic acids, and apigenin, were previously revealed in other moss species [9].

The chemical characterization of *H. cupressiforme* extracts presented in this study has shown that various phenolic acids, flavonoids, and terpenoids can be found in this moss. These compounds exhibit a range of biological activities and can be useful in treating various pathological conditions in humans [1,16], so further part of this research was based on the evaluation of antioxidant, antidiabetic, anti-neuroinflammatory/antineurodegenerative, and antitumor potential of the investigated extracts.

The examined moss extracts showed low radical scavenging activity compared to standard substances evaluated by the DPPH method. A previous study on radical scavenging activity demonstrated high antioxidant activity of *H. cupressiforme* methanolic extract [6]. This discrepancy in the obtained results could be explained by different extraction solvent and extraction procedure overall, different radical final concentration, or contrasting ecological conditions of the growth site such as season and climate [20]. For instance, it has been shown that the content of secondary metabolites in mosses depends on the season, with the greatest number of biochemical features manifested in the summer [21]. The probable explanation is that biological activities in mosses during summer are more intense than during other seasons, with more protective substances that help tolerate droughts. The moss samples examined in this study were collected during springtime, so it may be expected that they show different potential in terms of some biochemical features, such as radical scavenging activity.

Regarding radical scavenging activity, it is known that the most effective compounds are phenols, which are capable of donating a hydrogen atom from their hydroxyl group [22]. Although mosses are rich in phenolic compounds, their radical scavenging activity seems to be lower than that in vascular plants. In vascular plants, the phenolic and flavonoid contents usually directly correlate with the radical scavenging capacity of the plant [23]. However, in mosses, there is no direct correlation between these terms [9]. This may be the reason why the investigated extracts did not exhibit high radical scavenging activity despite the presence of phenolic compounds in them. Furthermore, numerous triterpenoids have demonstrated significant radical scavenging activity [24]. The correlation between the triterpenoids in *H. cupressiforme* and its radical scavenging activity needs to be further investigated.

It has been reported that anthocyanins and flavonols possess high activity in the β -carotene bleaching test, followed by flavanols and phenolic acids [25]. Some of the compounds that may express this activity are kaempferol, gallic acid, and caffeic acid [25], and they are identified in the investigated *H. cupressiforme* extracts by LC-MS. Therefore, these compounds may contribute to the β -carotene bleaching inhibitory activity of the investigated moss. To the best of our knowledge, there is no previous report on the β -carotene bleaching activity of the investigated extracts of *H. cupressiforme*. The antioxidant activity obtained for ethyl acetate and aqueous extracts in the β -carotene bleaching method was significant, while the antioxidant activities measured by the DPPH and TRP methods were quite low. One of the main reasons for this result is the fact that these methods are based on different reaction mechanisms. The DPPH assay is based on a hydrogen radical donating to a certain substance, the TRP assay is based on electron transfer between the substrate and tested sample, while the β -carotene bleaching assay is based on spearing the already present antioxidant [26]. These results clearly demonstrate the significance of applying more than one analytical method when assessing the antioxidant activity of some new extracts.

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease characterized by insulin deficiency and/or insulin insensitivity which leads to chronic hyperglycemia and disturbance of carbohydrate, lipid, and protein metabolism. One of the therapeutic approaches for DM therapy is inhibition of carbohydrate

hydrolyzing enzymes, α -amylase and α -glucosidase. Although synthetic inhibitors of carbohydrate hydrolyzing enzymes are in clinical use, their prices are usually high and they have many side effects. Inhibitors isolated from medicinal plants are considered as an alternative due to fewer side effects and greater efficiency of these compounds. Phenolic compounds, especially flavonoids, phenolic acids, and tannins, apart from being effective antioxidants, have been reported as potent inhibitors of α -glucosidase and α -amylase [27]. The mechanism of this inhibition depends on the type of polyphenols, as well as their concentration. Monomeric polyphenols inhibit enzyme activity by blocking the catalytic sites, while polymeric polyphenols can form a non-digestible complex with the enzyme [28]. Some of the compounds previously reported to inhibit α -glucosidase and α -amylase are gallic, caffeic, 5-*O*-caffeoylquinic acids, kaempferol, quercetin, naringenin, and apigenin [29]. The presence of these compounds in the examined *H. cupressiforme* extracts, confirmed by LC-MS, could explain their significant inhibitory effect on α -glucosidase and α -amylase activity which was noticed in the study. Although studies have shown the antidiabetic potential of bryophytes [1], no previous report has been given on the antidiabetic potential of the *H. cupressiforme*. It has been reported that an ideal inhibitor of α -amylase and α -glucosidase could exhibit specificity for the respective enzyme, effectively reducing the postprandial hyperglycemia, without showing cytotoxic activity to target cells. Furthermore, a better effect could be achieved if the examined compound would mildly inhibit α -amylase and strongly inhibit α -glucosidase [30]. The investigated extracts of *H. cupressiforme* have demonstrated these properties and therefore could be considered for potential therapeutic application to delay postprandial hyperglycemia, although further in vivo research is required.

The inhibitory potential of the investigated moss extracts against AChE and tyrosinase, which are associated with the development of various neurodegenerative disorders that are mostly mediated by neuroinflammation, was evaluated. AChE is an enzyme that catalyzes the breakdown of a neurotransmitter called acetylcholine, thus regulating its levels in the synapses. One of the main characteristics of Alzheimer's disease (AD) is memory loss caused by reduced levels of acetylcholine. Therefore, the inhibition of AChE is an effective therapeutic approach in treating AD [31]. On the other hand, tyrosinase is a key enzyme involved in the production of melanin in both skin and hair and may contribute to neuromelanin formation in the central nervous system. The production and accumulation of neuromelanin and the damage of neurons associated with Parkinson's disease (PD) have been extensively studied [32]. The inhibition of tyrosinase has become a prominent target in drug development and research of PD. Due to high prices and the side effects of current treatment strategies for neurodegenerative diseases, there is an increased need for the development of novel therapeutic strategies [33].

This is the first report on the antineurodegenerative activity of the *H. cupressiforme*. An opposite dose–response observed in the AChE inhibition assay may be caused by mutual interaction between compounds at higher concentrations, which could prevent their inhibitory potential. Moreover, studies have shown that some extracts show the greatest AChE inhibitory potential at lower concentrations when occupying only a small number of AChE receptors [34]. The majority of phytochemicals with AChE and tyrosinase inhibitory potential belong to flavonoids, alkaloids, and terpenoids [35]. Some of the flavonoids identified in the examined *H. cupressiforme* extracts, such as naringenin, apigenin, kaempferol, and quercetin, were previously reported to possess AChE and tyrosinase inhibitory potential [36]. In addition, some of the phenolic acids present in investigated extracts, such as *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, *p*-coumaric, and caffeic acids, have been investigated for their tyrosinase inhibition potential [37].

Microglia represent a specialized population of macrophages extensively distributed in the brain. They mediate immune responses in the central nervous system and remove damaged neurons and cellular debris through the process of phagocytosis [38]. When microglia are activated, in response to pathogens or brain injury, they can enhance neuroinflammation by secreting various proinflammatory mediators, including NO and ROS. These molecules are associated with neurodegenerative diseases such as AD, PD, multiple sclerosis, and cerebral ischemia [39]. Therefore, the reduction of

proinflammatory mediators production by microglia is considered to be an essential therapeutic strategy for the prevention or treatment of these disorders [38].

As the antineurodegenerative effect of analyzed extracts was shown, the survey of the anti-neuroinflammatory potential of the extracts on LPS-stimulated BV2 microglial cells was performed. The obtained results suggest that *H. cupressiforme* extracts possess the ability to diminish the production of NO by activated microglia that participate in the majority of neurodegenerative diseases. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is an enzyme that catalyzes the production of NO. Various compounds from plants have been proven to inhibit the expression of iNOS in LPS-activated macrophages. Most of the herbal medicines reduce iNOS-mediated NO production through the inactivation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) [40]. It has been reported that flavonoids exhibit strong inhibitory activity on LPS-induced NO production [41]. Kaempferol, quercetin, and naringenin were among the most efficient flavonoids regarding the inhibition of NO production. Additionally, caffeic acid has also shown potent inhibitory activity on NO production [41]. Some of these compounds, identified in *H. cupressiforme* extracts by LC-MS, may contribute to the anti-neuroinflammatory activity of this moss. Altogether these anti-neuroinflammatory findings with considerable AChE and tyrosinase inhibitory potentials of these moss extracts highly suggest that the extracts of *H. cupressiforme* may be potential therapeutic candidates for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders, although further investigation is necessary to confirm their anti-inflammatory activities.

Antitumor agents are one of the most important research topics in drug development. The successful treatment of several tumor types is still a challenge and there are many research studies focused on finding new therapies with fewer side effects. Plants continue to play a major role in drug discovery due to their antiproliferative and proapoptotic properties [42]. Various studies have reported significant cytotoxic activity in the extracts of bryophytes [15,16]. The antitumor activity in the investigated extracts was tested as their ability to inhibit the proliferation of two tumor cell lines, HCT-116 and MDA-MB-231. All of the investigated moss extracts, except ethanolic, exerted strong antiproliferative activity against MDA-MB-231 cells, with an inhibition rate of approximately 50%. On the other hand, there was no significant antiproliferative effect on HCT-116 cells. Based on these results, it can be concluded that *H. cupressiforme* extracts exhibit selectivity in the inhibition of the cell cycle between different tumor cells. This is in line with literature data, where it can be seen that *H. cupressiforme* methanolic extracts exhibit a strong antiproliferative effect on HeLa cancer cells and a moderate antiproliferative effect on lung cancer A549 cells [6]. An extensive literature survey showed that there is no previous report on the antiproliferative activity against the MDA-MB-231 cell line of *H. cupressiforme*.

Phenolic compounds and terpenoids possess the ability to prevent tumor cell progression by different antitumor mechanisms [16,43]. Generally, these compounds can modulate the redox status and act on cellular processes such as cell proliferation, differentiation, inflammation, apoptosis, and angiogenesis. They have the ability to regulate cell signal transduction and gene expression, thus controlling tumor development [43]. Flavonoids, among many other compounds, have been investigated for potential antitumor activity. In human breast cancer cell lines, such as MDA-MB-231, flavonoids have been reported to downregulate the expression of mutant p53 protein to almost undetectable levels and to inhibit the production of heat shock proteins [44]. Furthermore, it has been experimentally proven that flavonoids apigenin, quercetin, kaempferol, and quercetin 3-O-rutinoside (rutin) are potent inhibitors of the transcription factor NF- κ B, responsible for the activation of many genes involved in cell proliferation, thus acting as antiproliferative agents [44]. Given that the moss extracts investigated in this study contain certain amounts of phenolic compounds and terpenoids, these compounds might contribute to a significant antiproliferative activity of all extracts, except the ethanolic one.

ROS and NO are essential for maintaining cell homeostasis, but can also be involved in the development of different pathologies. The roles of ROS and NO in cancer cells are controversial, with some reports indicating their antitumor potential, while others suggest they have a role in

tumor promotion [45,46]. Tumor cells generally demonstrate a constant increase in the generation of ROS, which in turn makes these cells more vulnerable to further oxidative stress. This biochemical characteristic has been used to selectively kill tumor cells by further elevation of cellular ROS. Increased ROS production in tumor cells may induce cell death through the induction of apoptosis via death signaling pathways [45]. NO was reported to inhibit cell proliferation and induce cell death by affecting apoptosis-related mitochondrial proteins [47]. It was shown that breast cancer cells treated with various apoptotic agents have shown an increased production of NO [48]. All four extracts tested in this study have led to a significant increase in ROS production by breast cancer MDA-MB-231 cells. All examined extracts significantly increased the production of NO by MDA-MB-231 cells, as well. The significant antiproliferative potential of *H. cupressiforme* extracts demonstrated against MDA-MB-231 cells could be mediated via increased ROS and NO production. However, the exact mechanism remains to be further explored.

4. Materials and Methods

4.1. Reagents and Standards

Acarbose, acetylcholine iodide, and acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* Linnaeus, 1766, and aluminum chloride (AlCl_3), ascorbic acid, BHA (2-tert-butyl-4-hydroxyanisole), BHT (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene), protocatechuic acid, 5-O-caffeoylquinic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, quercetin 3-O-rutinoside, quercetin 3-O-glucoside, isorhamnetin 3-O-glucoside, eriodictyol, apigenin, naringenin, kaempferol, acacetin, coumarin, disodium hydrogen phosphate dodecahydrate, DMSO (dimethyl sulfoxide), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), DTNB (5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)), Folin-Ciocalteu reagent, galantamine natural for system suitability, gallic acid, iron(III) chloride (FeCl_3), kojic acid, L-DOPA (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine), LPS (lipopolysaccharide), Lugol's solution, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), pNPG (4-nitrophenyl β -D-glucopyranoside), phosphoric acid, potassium dihydrogen phosphate, quercetin, sodium acetate (CH_3COONa), sodium bicarbonate (NaHCO_3), sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3), sodium chloride (NaCl), sodium dihydrogen phosphate, sodium hydrogen phosphate, sodium nitrite (NaNO_2), sodium phosphate monobasic dihydrate, sulfanilamide, sulfanilic acid, Trizma base, tyrosinase from *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach, ursolic acid, vanillin, α -amylase, α -glucosidase (from *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen) type I, and β -carotene were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Chloroform, ethanol, glacial acetic acid and hydrochloric acid were obtained from Zorka Pharma, Šabac, Serbia. Sodium molybdate dihydrate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) was obtained from Dispo-chem, Romsey, UK. Sodium hydroxide (NaOH) was purchased from NRK inženjering, Belgrade, Serbia. Aluminum nitrate nonahydrate ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) and potassium acetate (CH_3COOK) were obtained from Carlo Erba Reagents, Barcelona, Spain. Dipotassium phosphate, methanol, and perchloric acid were purchased from VWR, Radnor, PA, USA. Lead acetate trihydrate ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3(\text{H}_2\text{O})$), potassium ferricyanide(III), and trichloroacetic acid were obtained from Superlab, Belgrade, Serbia. Linoleic acid and Tween 40 were purchased from Acros Organics, Geel, Belgium, while 1% starch solution was purchased from Carl Roth, Karlsruhe, Germany. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), FBS (Fetal Bovine Serum), and PBS (Phosphate-Buffered Saline) were obtained from GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. NBT (Nitro Blue Tetrazolium) was obtained from SERVA, Heidelberg, Germany.

4.2. Plant Material

4.2.1. Moss Material Collection

Moss material was collected in Vršacke Planine Mts. (Serbia) (N45.128208, E21329945, 370 m a.s.l.), from the siliceous rock outcrops within the forest openings in May 2019 (leg./det. M. S. Sabovljevic and

A. D. Sabovljevic, 11th May 2019; voucher BEOU bryo collection *s/n*). Mosses were placed in paper bags and kept at room temperature. The room-dried and cleaned material (i.e., green tips with no older parts and substrate remnants) was then lyophilized and ready for extraction. The whole study flow (except biological evaluation) is presented in Figure 4.

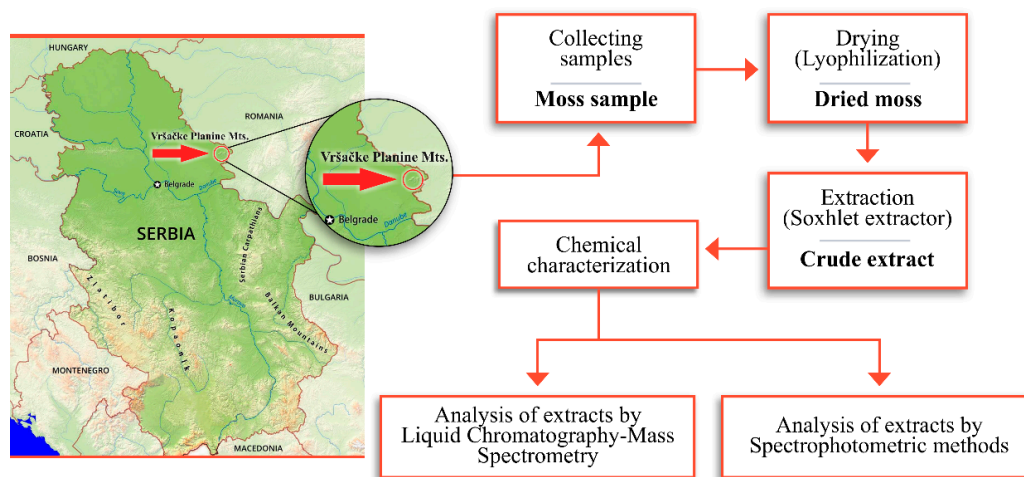


Figure 4. The position of the investigated collection area (Vršacke Planine Mts.) in Serbia with illustrated steps in the preparation and characterization of the extracts.

4.2.2. Preparation of the Extracts

The plant material was dried, and the extraction was performed with different solvents in the Soxhlet apparatus for 10 h. Four different solvents were used: 96% ethanol, a mixture of water and ethanol in 1:1 ratio, ethyl acetate, and water. The extracts were labeled as follows; E1 for ethanolic extract, E2 for aqueous-ethanolic extract, E3 for ethyl acetate extract, and E4 for aqueous extract. The extracts were concentrated in vacuum (Buchi R-210 Rotavapor System, Marshall Scientific, Hampton, NH, USA) and stored at + 4 °C.

4.3. Chemical Characterization

4.3.1. Total Phenolic Content

Total Phenolic Content (TPC) of the extracts was determined using the Folin–Ciocalteu method [49]. Briefly, 20 μ L of each extract (1 mg/mL) was mixed with 100 μ L of 10% Folin–Ciocalteu reagent and kept for 6 min at room temperature. After that, 80 μ L of 7.5% sodium carbonate anhydrous was added to the reaction mixture and kept for 120 min in the dark at room temperature. The absorbance was measured at 740 nm, using Multiskan Sky Thermo Scientific microtiter plate reader, Vantaa, Finland. The negative control contained distilled water instead of the sample. TPC was calculated from the curve equation of gallic acid and the results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry extract (mg GAE/g dry extract).

4.3.2. Total Phenolic Acid Content

Total Phenolic Acid Content (TPAC) of the extracts was determined using a modified procedure [50]. For the determination of TPAC in extracts, 10 μ L of extract (1 mg/mL) was mixed with 20 μ L of Arnou reagent (10% *w/v* of sodium molybdate and 10% *w/v* sodium nitrite), 20 μ L 0.1 M hydrochloric acid, and 20 μ L 1 M sodium hydroxide. After adding 100 μ L of distilled water to the obtained mixture, the absorbance was measured immediately at 490 nm, using Multiskan Sky Thermo Scientific microtiter plate reader, Vantaa, Finland. The control contained 50% ethanol instead of the sample. TPAC was calculated from the curve equation of caffeic acid in 50% ethanol. The results were expressed as milligrams of caffeic acid equivalents per gram of dry extract (mg CAE/g dry extract).

4.3.3. Total Flavonoid Content

Determination of Total Flavonoid Content (TFC) was performed by spectrophotometric method [51]. Each well was filled with 50 μL of extracts (1 mg/mL), 205 μL 80% ethanol, 5 μL 10% aluminum nitrate nonahydrate, and 5 μL 1 M potassium acetate solution. After 40 min of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 415 nm, using Multiskan Sky Thermo Scientific microtiter plate reader, Vantaa, Finland. The negative control contained 96% ethanol instead of the sample. The calibration curve for TFC was made using a quercetin standard solution under the same procedure as earlier described. TFC was calculated from the curve equation of quercetin and the results were expressed as milligrams of quercetin equivalents per gram of dry extract (mg QE/g dry extract).

4.3.4. Total Flavonol Content

The Total Flavonol Content (TFIC) of the extracts was determined using a modified procedure [50]. Briefly, 40 μL of methanolic solutions of extracts (1 mg/mL) was mixed with the same volume of aluminum chloride (20 mg/mL) solution in methanol and 120 μL (50 mg/mL) methanolic solution of sodium acetate. The absorbance of the resulting yellow complex at 440 nm was read after 2.5 h, using Multiskan Sky Thermo Scientific microtiter plate reader, Vantaa, Finland. The negative control contained 100% methanol instead of the sample. Series of quercetin in 100% methanol were prepared for the calibration curve. TFIC was calculated from the curve equation of quercetin and the results were expressed as milligrams of quercetin equivalents per gram of dry extract (mg QE/g dry extract).

4.3.5. Total Triterpenoid Content

Total Triterpenoid Content (TTC) was determined according to a previously reported method [52]. Briefly, all extracts were individually dissolved in 100% methanol at concentrations 1 and 10 mg/mL. Then, 10 μL of each of these sample solutions was mixed with 15 μL of vanillin-glacial acetic acid solution (5% *w/v*) and 50 μL of perchloric acid solution. The sample solutions were incubated for 45 min at 60 °C and then cooled to the ambient temperature. The negative control contained 100% methanol instead of the sample. After the addition of glacial acetic acid (225 μL), each sample solution's absorbance was measured at 548 nm, using Multiskan Sky Thermo Scientific microtiter plate reader, Vantaa, Finland. Ursolic acid dissolved in 100% methanol and was used for making the calibration curve. TTC was calculated from the curve equation of ursolic acid, and the results were expressed as milligrams of ursolic acid equivalents per gram of dry extract (mg UAE/g dry extract).

4.3.6. Total Coumarin Content

Total Coumarin Content (TCC) of the extracts was performed according to a slightly modified procedure [53]. Each well was filled with 2 μL of extract dissolved in 80% methanol (10 mg/mL), 8 μL of distilled water, and 2 μL of lead-acetate solution (5% *w/v*). Another 28 μL of distilled water was added to each well, followed by 160 μL of hydrochloric acid (0.1 M). The reaction mixture was incubated for 30 min at ambient temperature. The absorbance was measured at 320 nm, using Multiskan Sky Thermo Scientific microtiter plate reader, Vantaa, Finland. The negative control contained 100% methanol instead of the sample. Coumarin dissolved in methanol was used for the calibration curve. TCC was calculated from the curve equation of coumarin and the results were expressed as milligrams of coumarin equivalents per gram of the dry extract (mg CE/g dry extract).

4.3.7. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry

Separation of compounds of interest was performed using a Dionex Ultimate 3000 UHPLC system equipped with a diode array detector (DAD) that was connected to TSQ Quantum Access Max triple-quadrupole mass spectrometer equipped with heated electrospray ionization probe (HESI-II, ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) in negative ionization mode.

A Synchronis C18 column (100 × 2.1 mm, 1.7 μm particle size) at 40 °C was used for compound separation: Flow rate was set to 0.3 mL/min and the mobile phase consisted of (A) water + 0.1% formic acid and (B) acetonitrile. Linear gradient program was used as follows; 0.0–1.0 min 5% B, 1.0–14.0 min from 5% to 95% (B), 14.0–14.1 min from 95% to 5% (B), and 5% (B) for 6 min.

The parameters of the ion source and the other MS data necessary for quantification were as previously described in the literature [54]. ThermoFisher Scientific Xcalibur software (version 2.1) was used for instrument control, data acquisition, and data analysis.

4.4. Biochemical Assays

4.4.1. DPPH Assay

The scavenging activity of moss extracts was evaluated using DPPH assay [55] with slight modifications. Briefly, 20 μL of sample solutions in appropriate solvents (concentrations of 10, 50, 100, 500, and 1000 μg/mL) and 180 μL of fresh methanolic solution of DPPH (40 μg/mL) were added to each well of a microtiter plate. Methanol dissolved in DPPH solution was used as a negative control. Butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), and ascorbic acid were used as positive controls (standards). The absorbance of the reaction mixture was measured after 30 min in the dark at room temperature at 517 nm, using Multiskan Sky Thermo Scientific Microtiter plate reader, Vantaa, Finland.

The decrease of absorption of DPPH radical at 517 nm was calculated using the following equation,

$$\text{Inhibition of DPPH radical (\%)} = [(A_c - A_s)/A_c] \times 100 \quad (1)$$

where A_c represents the absorbance of the negative control and A_s represents the absorbance of the test samples at different concentrations.

4.4.2. Total Reducing Power Assay

The ability of the extracts to reduce iron(III) was assessed by the slightly modified method [56], and following a previous procedure [57]. Briefly, 20 μL of each extract in an appropriate solvent (concentrations of 10, 50, 100, 500, and 1000 μg/mL) was mixed with 40 μL of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 40 μL of 1% potassium ferricyanide(III) solution. The mixture was incubated for 20 min at 45 °C, after which 40 μL of trichloroacetic acid (10%, *w/v*), 40 μL of distilled water, and 8 μL of 0.1% iron(III) chloride were added. After an incubation of 10 min at room temperature, the absorbance was measured at 700 nm minutes, using Multiskan Sky Thermo Scientific, Vantaa, Finland microtiter plate reader. The negative control was prepared in the same manner as the reaction mixture, with 20 μL of appropriate solvent instead of the sample. BHT, BHA, and ascorbic acid were used as positive controls (standards) and data are presented only against ascorbic acid as the same results were obtained. The Total Reducing Power (TRP) of the samples is expressed as μmol of Ascorbic Acid Equivalents (AAE) per gram of dry extract (μmol AAE/g dry extract).

4.4.3. β-Carotene Bleaching Assay

β-carotene bleaching assay was performed according to a slightly modified procedure [58]. The emulsion was prepared by adding linoleic acid (6.25 μL) and Tween 40 (50 mg) into a solution of β-carotene in chloroform (125 μL, 4 mg/mL). Moreover, 125 μL of chloroform was added to the prepared emulsion. Chloroform was removed using a rotary evaporator (Buchi rotavapor R-114, Marshall Scientific, Hampton, NH, USA) at 40 °C, after which 25 mL of distilled water was added with vigorous shaking. The solutions of samples (concentrations of 10, 50, 100, 500, and 1000 μg/mL) and standards BHT, BHA, and ascorbic acid were prepared in appropriate solvents. Afterward, 200 μL of emulsion and 28 μL of the test substance (extracts, standards, 100% methanol – as negative control) were mixed.

The absorbance was measured immediately ($t_0 = 0$ min) and after 2 h of incubation ($t_{120} = 120$ min) at 490 nm, using Multiskan Sky Thermo Scientific Microtiter plate reader, Vantaa, Finland.

The antioxidant activity of the samples was evaluated in terms of inhibition of β -carotene bleaching using the following equation,

$$\text{Inhibition of } \beta\text{-carotene bleaching (\%)} = [(A_{120} - C_{120}) / (C_0 - C_{120})] \times 100 \quad (2)$$

where A_{120} and C_{120} symbolize the absorbances measured after 120 min for the sample and negative control, respectively, while C_0 symbolizes the absorbance of the negative control immediately after the addition of all the reaction components.

4.4.4. α -Amylase Inhibition Assay

In vitro determination of α -amylase inhibition activity was performed using the slightly modified Caraway–Somogyi iodine/potassium iodide method, according to Zengin et al. [59]. In brief, 25 μ L of properly diluted extracts (concentrations of 10, 50, 100, 500, and 1000 μ g/mL) were mixed with 50 μ L of 0.5 mg/mL α -amylase enzyme solution. The solutions were prepared by dissolving the extracts and enzyme in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8 with 6 mM sodium chloride). After 10 min of pre-incubation at 37 $^{\circ}$ C, 50 μ L of 0.2% starch dissolved in phosphate buffer was added, and incubation continued for another 10 min at 37 $^{\circ}$ C. After that, 25 μ L of 1 M hydrochloric acid was added to terminate the reaction, and 100 μ L of Lugol's solution was added to visualize the reaction. The absorbance was measured at 630 nm, using Multiskan Sky Thermo Scientific, Vantaa, Finland microtiter plate reader. Acarbose was used as a positive control (standard).

The percentage inhibition of α -amylase enzyme activity was calculated according to the following equation,

$$\text{Inhibition of } \alpha\text{-amylase (\%)} = [(A_s - A_{c1}) / A_{c2}] \times 100 \quad (3)$$

where A_s represents the absorbance of the reaction mixture with the test sample, A_{c1} is the absorbance of enzyme control (contained buffer instead of the sample), and A_{c2} is the absorbance of substrate control (contained buffer instead of enzyme).

4.4.5. α -Glucosidase Inhibition Assay

Determination of α -glucosidase inhibitory activity was performed according to a previously reported method [60]. Briefly, 120 μ L of extract (concentrations of 10, 50, 100, 500, and 1000 μ g/mL) and 20 μ L of enzyme solution (0.5 units/mL) in potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) were added to microtiter plate and pre-incubated for 5 min at 37 $^{\circ}$ C. Moreover, 20 μ L of 5 mM pNPG as a substrate was added to the mixture and incubation continued for another 20 min at 37 $^{\circ}$ C. Finally, the reaction was stopped by adding 80 μ L of 0.2 M sodium carbonate anhydrous dissolved in a buffer, and the absorbance was measured at 405 nm, using Multiskan Sky Thermo Scientific microtiter plate reader, Vantaa, Finland. Acarbose was used as a positive control (standard).

The percentage of α -glucosidase activity inhibition was calculated according to the following equation,

$$\text{Inhibition of } \alpha\text{-glucosidase (\%)} = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100 \quad (4)$$

where A_c stands for the absorbance of the negative control (contained buffer instead of the sample), while A_s represents the absorbance of the reaction mixture with the test sample.

4.4.6. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity Assay

Acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity assay was performed according to the slightly modified method [61]. The test reaction mixture was prepared by adding 140 μ L of sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0), 20 μ L of DTNB, 20 μ L of sample dissolved in buffer containing 5% DMSO

(concentrations of 10, 50, 100, 500, and 1000 µg/mL), and 20 µL of AChE solution (5 units/mL) in Tris-HCl buffer (20 mM, pH 7.5). The negative control mixture contained sodium phosphate buffer instead of a sample. After incubation (15 min, 25 °C), the colorimetric reaction was initiated with the addition of 10 µL of acetylcholine iodide and the absorbance was measured at a wavelength of 412 nm, using a Multiskan Sky Thermo Scientific, Vantaa, Finland microtiter plate reader. Galantamine was used as a positive control (standard).

The percentage of inhibition of AChE by the sample was determined using the formula,

$$\text{Inhibition of AChE (\%)} = [(Ac - As)/Ac] \times 100 \quad (5)$$

where *Ac* symbolizes the absorbance of the negative control, while *As* represents the absorbance of the test sample.

4.4.7. Tyrosinase Inhibitory Activity Assay

Tyrosinase inhibitory activity assay was performed according to a slightly modified method [62] using 96-well plates. The test reaction mixture was prepared by adding 80 µL of sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7), 40 µL of tyrosinase solution (46 units/L), and 40 µL of the sample (concentrations of 10, 50, 100, 500, and 1000 µg/mL). After adding 40 µL of L-DOPA in buffer and incubation (30 min, 25 °C), the absorbances were measured at 475 nm, using Multiskan Sky Thermo Scientific, Vantaa, Finland microtiter plate reader. The negative control contained sodium buffer instead of the sample. Kojic acid was used as a positive control (standard).

The percentage of inhibition of tyrosinase activity was determined using the following formula,

$$\text{Inhibition of tyrosinase (\%)} = [(Ac - As)/Ac] \times 100 \quad (6)$$

where *Ac* stands for the absorbance of the negative control and *As* stands for the absorbance of the test sample.

4.5. Biological Assays

4.5.1. Cell Culture

Human embryonic lung fibroblast cell line MRC-5, murine microglial cell line BV2, human colon cancer cell line HCT-116, and human breast cancer cell line MDA-MB-231 were used in this study. All cells were obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

All cells were cultivated in DMEM and supplemented with 10% FBS, 1% glucose, and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin). The cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Near-confluent cells (100 µL) were seeded in 96-well microplate (10,000 per well for MRC-5, BV2, and MDA-MB-231 cells; 50,000 per well for HCT-116 cells). After 24 h of cell incubation, 100 µL of medium containing adequate investigated extract (50 µL of medium + 50 µL of extract) was added in each well of the microplate. For BV2 cells, 100 µL of LPS containing the investigated extracts (50 µL of LPS 1 µg/mL culture + 50 µL of extract) was added in each well. The incubation was continued for an additional 24 h. Untreated cells were used as control. The treatment concentration (10 µg/mL) was obtained by serial dilution of the stock solution, thus DMSO concentration decreased continuously.

4.5.2. Determination of Cell Proliferation/Metabolic Viability (MTT Assay)

The antiproliferative properties of the prepared extracts were tested utilizing the MTT assay [63] after 24 h of treatment. This colorimetric assay is based on the reduction of a yellow tetrazolium salt to formazan, an insoluble crystalline product with a deep purple color. Viable cells contain NAD(P)H-dependent oxidoreductase enzymes which are capable of this reduction.

After 24 h of cell incubation with extracts, 100 µL of medium was removed, and 10 µL of MTT solution (5 mg/mL final concentration in PBS) was added to each well and incubated at 37 °C in 5%

CO₂ for 3 h. The produced formazan was dissolved by overnight incubation by adding 100 µL of SDS-HCl (10% SDS in 0.1% 1N hydrochloric acid). Finally, the reduced MTT was assayed at 540 nm using a microplate reader (LKB 5060–006, LKB Instruments, Vienna, Austria). The results are expressed as the percentage of viable cells, calculated as the ratio between the absorbance of treated cells and the absorbance of the untreated control multiplied by 100.

4.5.3. Determination of Superoxide Anion Radical (NBT Assay)

The concentration of superoxide anion radical (O₂^{•−}) in the sample was determined by the NBT assay [64]. Nitro Blue Tetrazolium (NBT) undergoes reduction by O₂^{•−} to form diformazan, a dark blue insoluble precipitate. Levels of O₂^{•−} generated by the tissue can be quantified by measuring the absorbance of blue formazan.

After 24 h of cell incubation with extracts, 100 µL of medium was removed, and 10 µL of NBT solution (5 mg/mL in PBS) was added to each well, followed by the cell incubation for 3 h at 37 °C in 5% CO₂. To quantify the formazan production, formazan was solubilized in 100 µL SDS-HCl (10% SDS in 0.1% 1 N hydrochloric acid). The results are expressed as NBT index, calculated as the ratio between the absorbance of treated cells and the absorbance of the untreated control.

4.5.4. Determination of Nitrites Level in Supernatants (Griess Assay)

The determination of nitrites (NO₂[−]) as an indicator of NO level was performed using the spectrophotometric method [65]. The Griess reagent consists of two components: *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride in distilled water and 1% sulfanilamide (or sulfanilic acid) in 5% phosphoric acid. Equal volumes of the two components were mixed together to form the Griess reagent immediately prior to their application on the plate. The Griess reaction is based on the two-step reaction in which acidified NO₂[−] produces a nitrosating agent which subsequently reacts with sulfanilic acid to produce the diazonium ion. This ion is later coupled to *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine to form the chromophoric azo-derivative which absorbs light at 540 nm.

After 24 h of cell incubation with extracts, 50 µL of medium from each well was transferred to an empty microplate. After that, 50 µL of prepared Griess reagent was added to each well. After 10 min incubation in the dark, the absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader (LKB 5060–006, LKB Instruments, Vienna, Austria). The concentration of nitrites was calculated from the standard curve for nitrite and expressed in µmol/L (µM).

4.6. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0., IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Statistical evaluation was carried out by Independent Samples *t*-test. For all comparisons, *p* < 0.05 for control vs. extract was considered significant. All measurements were performed at least in triplicate and values are expressed as mean ± standard error.

5. Conclusions

In this study, four extracts of moss *H. cupressiforme* from the Vršačke Planine Mts., Serbia were evaluated for their potential antioxidant, antidiabetic, anti-neuroinflammatory/antineurodegenerative, and antitumor activities. The phytochemical analysis of the extracts has shown the presence of biologically active compounds such as flavonoids, phenolic acids, and triterpenoids distributed unevenly among the extracts. The investigated extracts have shown high antioxidant activity regarding the prevention of β-carotene bleaching, high tyrosinase inhibitory effect, and high α-glucosidase and AChE inhibitory activities at lower tested concentrations. The most potent were ethyl acetate and aqueous extracts. Additionally, ethanolic and ethyl acetate extracts manifested anti-inflammatory potential by reducing the production of NO by LPS-stimulated BV2 cells. All extracts, except the ethanolic one, have shown significant antiproliferative potential against MDA-MB-231 cancer cells, and also satisfying biocompatibility with normal cells.

Based on the presented data, it can be concluded that moss *H. cupressiforme* from the Vršacke Planine Mts. (Serbia) is a promising candidate that may be useful in the prevention or treatment of various pathological conditions such as diabetes, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and breast cancer. Further in vitro and in vivo studies should focus on the mechanisms underlying the observed activities, all with the aim of developing new, more effective, green-factory made, and less toxic drugs for potential application in humans.

Supplementary Materials: The following are available online, Table S1: Biochemical analysis of *Hypnum cupressiforme* extracts as antioxidant agents. Table S2: Biochemical analysis of *Hypnum cupressiforme* extracts as antidiabetic agents. Table S3: Immunomodulatory potential of *Hypnum cupressiforme* extracts on MRC-5 cells. Table S4: Immunomodulatory potential of *Hypnum cupressiforme* extracts on HCT-116 cells.

Author Contributions: Conceptualization, B.D.B. and B.D.B.N.; validation, T.M.L., M.S.S., B.D.B., and B.D.B.N.; formal analysis, T.M.L.; investigation, T.M.L., M.M.O., M.R.M., B.D.B., A.D.S., M.S.S., and U.M.G. (LC-MS); resources, S.N.D.-L. and B.D.B.N.; writing—original draft preparation, T.M.L.; writing—review and editing, T.M.L., A.D.S., M.S.S., S.N.D.-L., B.D.B., and B.D.B.N.; visualization, T.M.L., M.M.O., M.R.M., and B.D.B.; supervision, B.D.B. and B.D.B.N.; project administration, B.D.B.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the grant of the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia (Contract numbers: 451-03-68/2020-14/200178 and 451-03-68/2020-14/200007).

Acknowledgments: The authors would like to thank Katarina Milićević, PhD student from the Faculty of Biology, University of Belgrade, for her help in the experiments with cell culture.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Asakawa, Y.; Ludwiczuk, A. Chemical constituents of bryophytes: Structures and biological activity. *J. Nat. Prod.* **2017**, *81*, 641–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Buck, W.R. Morphology and classification of mosses. *Bryophyt. Biol.* **2001**, 71–123.
3. Vujičić, M.; Sabovljević, A.; Sabovljević, M. Axenically culturing the bryophytes: Establishment and propagation of the moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. (Bryophyta, Hypnaceae) in in vitro conditions. *Bot. Serb.* **2011**, *35*, 71–77.
4. Harris, E.S. Ethnobotany: Traditional uses and folk classification of bryophytes. *Bryologist* **2008**, *111*, 169–217. [[CrossRef](#)]
5. Veljić, M.; Đurić, A.; Soković, M.; Ćirić, A.; Glamočlija, J.; Marin, P. Antimicrobial activity of methanol extracts of *Fontinalis antipyretica*, *Hypnum cupressiforme*, and *Ctenidium molluscum*. *Arch. Biol. Sci.* **2009**, *61*, 225–229. [[CrossRef](#)]
6. Yayıntaş, O.T.; Yılmaz, S.; Sökmen, M. Determination of antioxidant, antimicrobial and antitumor activity of bryophytes from Mount Ida (Canakkale, Turkey). *Indian J. Tradit. Knowl.* **2019**, *18*, 395–401.
7. Nelson, T.C.; Carpenter, I. The use of moss in the decorative industry. *Econ. Bot.* **1965**, *19*, 70. [[CrossRef](#)]
8. Sabovljević, M.S.; Sabovljević, A.D.; Ikram, N.K.K.; Peramuna, A.; Bae, H.; Simonsen, H.T. Bryophytes—an emerging source for herbal remedies and chemical production. *Plant Genet. Resour.* **2016**, *14*, 314–327. [[CrossRef](#)]
9. Klavina, L.; Springe, G.; Nikolajeva, V.; Martsinkevich, I.; Nakurte, I.; Dzabijeva, D.; Steinberga, I. Chemical composition analysis, antimicrobial activity and cytotoxicity screening of moss extracts (moss phytochemistry). *Molecules* **2015**, *20*, 17221–17243. [[CrossRef](#)]
10. Gahtori, D.; Chaturvedi, P. Bryophytes: A potential source of antioxidants. In *Bryophytes*; IntechOpen: London, UK, 2019.
11. Papp, B.; Sabovljević, M. Contribution to the bryophyte flora of the Vršacke Planine Mts., Serbia. *Bot. Serb.* **2010**, *34*, 107–110.
12. Ertürk, Ö.; Sahin, H.; Ertürk, E.Y.; Hotaman, H.E.; Koz, B.; Özdemir, Ö. The antimicrobial and antioxidant activities of extracts obtained from some moss species in Turkey. *Herba Pol.* **2015**, *61*, 52–65. [[CrossRef](#)]
13. Sabovljevic, A.; Sabovljevic, M. Bryophytes, a source of bioactive and new compounds. *Recent Prog. Med. Plants* **2008**, *22*, 9–25.

14. Aslanbaba, B.; Yilmaz, S.; Yayintas, Ö.T.; Özyurt, D.; Özturk, B.D. Total phenol content and antioxidant activity of mosses from Yenice forest (Ida mountain). *J. Sci. Perspect.* **2017**, *1*, 1–12. [[CrossRef](#)]
15. Mishra, R.; Pandey, V.K.; Chandra, R. Potential of bryophytes as therapeutics. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2014**, *5*, 3584–3593.
16. Dey, A.; Mukherjee, A. Therapeutic potential of bryophytes and derived compounds against cancer. *J. Acute Dis.* **2015**, *4*, 236–248. [[CrossRef](#)]
17. Sievers, H.; Burkhardt, G.; Becker, H.; Zinsmeister, H.D. Hypnogenols and other dihydroflavonols from the moss *Hypnum cupressiforme*. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3233–3237. [[CrossRef](#)]
18. Asakawa, Y.; Ludwiczuk, A.; Nagashima, F. Chemical constituents of bryophyta. In *Chemical Constituents of Bryophytes*; Springer: Vienna, Austria, 2013; Volume 95, pp. 563–605.
19. Veličković, J.M.; Dimitrijević, D.S.; Mitić, S.S.; Mitić, M.N.; Kostić, D.A. The determination of the phenolic composition, antioxidative activity and heavy metals in the extracts of *Calendula officinalis* L. *Adv. Technol.* **2014**, *3*, 46–51. [[CrossRef](#)]
20. Becker, M.M.; Nunes, G.S.; Ribeiro, D.B.; Silva, F.E.; Catanante, G.; Marty, J.-L. Determination of the antioxidant capacity of red fruits by miniaturized spectrophotometry assays. *J. Braz. Chem. Soc.* **2019**, *30*, 1108–1114. [[CrossRef](#)]
21. Peters, K.; Gorzalka, K.; Bruelheide, H.; Neumann, S. Seasonal variation of secondary metabolites in nine different bryophytes. *Ecol. Evol.* **2018**, *8*, 9105–9117. [[CrossRef](#)]
22. Indrianingsih, A.W.; Tachibana, S.; Itoh, K. In vitro evaluation of antioxidant and α -glucosidase inhibitory assay of several tropical and subtropical plants. *Procedia Env. Sci.* **2015**, *28*, 639–648. [[CrossRef](#)]
23. Bakari, S.; Hajlaoui, H.; Daoud, A.; Mighri, H.; Ross-Garcia, J.M.; Gharsallah, N.; Kadri, A. Phytochemicals, antioxidant and antimicrobial potentials and LC-MS analysis of hydroalcoholic extracts of leaves and flowers of *Erodium glaucophyllum* collected from Tunisian Sahara. *Food Sci. Technol.* **2018**, *38*, 310–317. [[CrossRef](#)]
24. Eom, H.J.; Kang, H.R.; Kim, H.K.; Jung, E.B.; Park, H.B.; Kang, K.S.; Kim, K.H. Bioactivity-guided isolation of antioxidant triterpenoids from *Betula platyphylla* var. *japonica* bark. *Bioorg. Chem.* **2016**, *66*, 97–101. [[CrossRef](#)]
25. Fukumoto, L.; Mazza, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3597–3604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Aminjafari, A.; Miroliaei, M.; Angelova, V.T.; Emamzadeh, R.; Djukic, M.M.; Djuric, A.; Saso, L. Antioxidant activity and protective role on protein glycation of synthetic aminocoumarins. *Electron. J. Biotechnol.* **2016**, *19*, 43–48. [[CrossRef](#)]
27. Lin, D.; Xiao, M.; Zhao, J.; Li, Z.; Xing, B.; Li, X.; Kong, M.; Li, L.; Zhang, Q.; Liu, Y. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules* **2016**, *21*, 1374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kan, L.; Oliviero, T.; Verkerk, R.; Fogliano, V.; Capuano, E. Interaction of bread and berry polyphenols affects starch digestibility and polyphenols bio-accessibility. *J. Funct. Foods* **2020**, *68*, 103924. [[CrossRef](#)]
29. Kalita, D.; Holm, D.G.; LaBarbera, D.V.; Petrash, J.M.; Jayanty, S.S. Inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and aldose reductase by potato polyphenolic compounds. *PLoS ONE* **2018**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Krentz, A.J.; Bailey, C.J. Oral antidiabetic agents. *Drugs* **2005**, *65*, 385–411. [[CrossRef](#)]
31. Ahmed, F.; Ghalib, R.M.; Sasikala, P.; Ahmed, K.M. Cholinesterase inhibitors from botanicals. *Pharm. Rev.* **2013**, *7*, 121–130. [[CrossRef](#)]
32. Carballo-Carbajal, I.; Laguna, A.; Romero-Giménez, J.; Cuadros, T.; Bové, J.; Martínez-Vicente, M.; Parent, A.; Gonzalez-Sepulveda, M.; Peñuelas, N.; Torra, A. Brain tyrosinase overexpression implicates age-dependent neuromelanin production in Parkinson's disease pathogenesis. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–19. [[CrossRef](#)]
33. Hussain, R.; Zubair, H.; Pursell, S.; Shahab, M. Neurodegenerative diseases: Regenerative mechanisms and novel therapeutic approaches. *Brain Sci.* **2018**, *8*, 177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Owokotomo, I.; Ekundayo, O.; Abayomi, T.; Chukwuka, A. In-vitro anti-cholinesterase activity of essential oil from four tropical medicinal plants. *Toxicol. Rep.* **2015**, *2*, 850–857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Cespedes, C.L.; Balbontin, C.; Avila, J.G.; Dominguez, M.; Alarcon, J.; Paz, C.; Burgos, V.; Ortiz, L.; Peñaloza-Castro, I.; Seigler, D.S. Inhibition on cholinesterase and tyrosinase by alkaloids and phenolics from *Aristolotelia chilensis* leaves. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *109*, 984–995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Neagu, E.; Paun, G.; Albu, C.; Radu, G.-L. Assessment of acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of *Alchemilla vulgaris* and *Filipendula ulmaria* extracts. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2015**, *52*, 1–6. [[CrossRef](#)]

37. Zolghadri, S.; Bahrami, A.; Hassan Khan, M.T.; Munoz-Munoz, J.; Garcia-Molina, F.; Garcia-Canovas, F.; Saboury, A.A. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2019**, *34*, 279–309. [[CrossRef](#)]
38. Jung, W.K.; Lee, D.Y.; Park, C.; Choi, Y.H.; Choi, I.; Park, S.G.; Seo, S.K.; Lee, S.W.; Yea, S.S.; Ahn, S.C. Cilostazol is anti inflammatory in BV2 microglial cells by inactivating nuclear factor kappaB and inhibiting mitogen activated protein kinases. *Br. J. Pharm.* **2010**, *159*, 1274–1285. [[CrossRef](#)]
39. Gonzalez-Scarano, F.; Baltuch, G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu. Rev. Neurosci.* **1999**, *22*, 219–240. [[CrossRef](#)]
40. Kang, C.-H.; Choi, Y.H.; Moon, S.-K.; Kim, W.-J.; Kim, G.-Y. Quercetin inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 microglial cells by suppressing the NF- κ B pathway and activating the Nrf2-dependent HO-1 pathway. *Int. Immunopharmacol.* **2013**, *17*, 808–813. [[CrossRef](#)]
41. Jeong, E.J.; Yang, H.; Kim, S.H.; Kang, S.Y.; Sung, S.H.; Kim, Y.C. Inhibitory constituents of *Euonymus alatus* leaves and twigs on nitric oxide production in BV2 microglia cells. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 1394–1398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Pucci, C.; Martinelli, C.; Ciofani, G. Innovative approaches for cancer treatment: Current perspectives and new challenges. *Ecancermedalscience* **2019**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Basli, A.; Belkacem, N.; Amrani, I. Health benefits of phenolic compounds against cancers. In *Phenolic Compounds—Biological Activity*; Intechopen: London, UK, 2017; pp. 193–210.
44. Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Sci. World J.* **2013**, *2013*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wang, J.; Yi, J. Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol.* **2008**, *7*, 1875–1884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Wink, D.A.; Vodovotz, Y.; Laval, J.; Laval, F.; Dewhirst, M.W.; Mitchell, J.B. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* **1998**, *19*, 711–721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Snyder, C.M.; Shroff, E.H.; Liu, J.; Chandel, N.S. Nitric oxide induces cell death by regulating anti-apoptotic BCL-2 family members. *PLoS ONE* **2009**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Reveneau, S.; Arnould, L.; Jolimoy, G.; Hilpert, S.; Lejeune, P.; Saint-Giorgio, V.; Belichard, C.; Jeannin, J.-F. Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade, proliferation rate, and expression of progesterone receptors. *Lab. Invest.* **1999**, *79*, 1215–1225. [[PubMed](#)]
49. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
50. Mihailović, V.; Kreft, S.; Benković, E.T.; Ivanović, N.; Stanković, M.S. Chemical profile, antioxidant activity and stability in stimulated gastrointestinal tract model system of three *Verbascum* species. *Ind. Crop. Prod.* **2016**, *89*, 141–151. [[CrossRef](#)]
51. Park, Y.K.; Koo, M.H.; Ikegaki, M.; Contado, J.L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **1997**.
52. Chang, C.L.; Lin, C.S.; Lai, G.H. Phytochemical Characteristics, Free Radical Scavenging Activities, and Neuroprotection of Five Medicinal Plant Extracts. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* **2012**, *2012*. [[CrossRef](#)]
53. De Amorim, E.C.; de Castro, V.D.A.; de Melo, J.; Corrêa, A.; Sobrinho, T.D.S.P. Standard operating procedures (SOP) for the spectrophotometric determination of phenolic compounds contained in plant samples. In *Latest Research into Quality Control*; InTech: Rijeka, Croatia, 2012.
54. Mišić, D.; Šiler, B.; Gašić, U.; Avramov, S.; Živković, S.; Nestorović Živković, J.; Milutinović, M.; Tešić, Ž. Simultaneous UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS/MS analysis of phenolic acids and nepetalactones in methanol extracts of *Nepeta* species: A possible application in chemotaxonomic studies. *Phytochem. Anal.* **2015**, *26*, 72–85. [[CrossRef](#)]
55. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200. [[CrossRef](#)]
56. Oyaizu, M. Studies on products of browning reaction. *Jpn. J. Nutr. Diet.* **1986**, *44*, 307–315. [[CrossRef](#)]
57. Tusevski, O.; Kostovska, A.; Iloska, A.; Trajkovska, L.; Simic, S.G. Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. *Cent. Eur. J. Biol.* **2014**, *9*, 888–900. [[CrossRef](#)]

58. Dapkevicius, A.; Venskutonis, R.; van Beek, T.A.; Linssen, J.P. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *77*, 140–146. [[CrossRef](#)]
59. Zengin, G.; Uysal, A.; Gunes, E.; Aktumsek, A. Survey of phytochemical composition and biological effects of three extracts from a wild plant (*Cotoneaster nummularia* Fisch. et Mey.): A potential source for functional food ingredients and drug formulations. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [[CrossRef](#)]
60. Wan, L.-S.; Min, Q.-X.; Wang, Y.-L.; Yue, Y.-D.; Chen, J.-C. Xanthone glycoside constituents of *Swertia kouitchensis* with α -glucosidase inhibitory activity. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1248–1253. [[CrossRef](#)]
61. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V., Jr.; Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharm.* **1961**, *7*, 88–95. [[CrossRef](#)]
62. Masuda, T.; Yamashita, D.; Takeda, Y.; Yonemori, S. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 197–201. [[CrossRef](#)]
63. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63. [[CrossRef](#)]
64. Auclair, C.; Voisin, E. Nitroblue tetrazolium reduction. In *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*; BokaratonCrc Press: Boca Raton, FL, USA, 1985; pp. 123–132.
65. Griess, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt “Ueber einige Azoverbindungen”. *Ber. Der Dtsch. Chem. Ges.* **1879**, *12*, 426–428. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples E1, E2, and E4 of the *H. cupressiforme* are available, while the sample E3 is available at a smaller quantity from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

The Influence of Seasonality on Secondary Metabolite Profiles and Neuroprotective Activities of Moss *Hypnum cupressiforme* Extracts: In Vitro and In Silico Study

Tanja M. Lunić¹, Marija R. Mandić¹, Mariana M. Oalđe Pavlović², Aneta D. Sabovljević², Marko S. Sabovljević^{2,3}, Biljana Đ. Božić Nedeljković^{1,*†} and Bojan Đ. Božić^{1,*†}

¹ Institute of Physiology and Biochemistry “Ivan Đaja”, Faculty of Biology, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia; lunictanja@hotmail.com (T.M.L.); mandicmarija5@gmail.com (M.R.M.)

² Institute of Botany and Botanical Garden “Jevremovac”, Faculty of Biology, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia; mariano@bio.bg.ac.rs (M.M.O.P.); aneta@bio.bg.ac.rs (A.D.S.); marko@bio.bg.ac.rs (M.S.S.)

³ Department of Botany, Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science, Pavol Jozef Šafárik University in Kosice, Mánesova 23, 040 01 Kosice, Slovakia

* Correspondence: biljana@bio.bg.ac.rs (B.Đ.B.N.); bbozic@bio.bg.ac.rs (B.Đ.B.); Tel.: +381-11-303-23-56 (B.Đ.B.N.)

† These authors contributed equally to this work.

Citation: Lunić, T.M.; Mandić, M.R.; Oalđe Pavlović, M.M.; Sabovljević, A.D.; Sabovljević, M.S.; Božić Nedeljković, B.Đ.; Božić, B.Đ. The Influence of Seasonality on Secondary Metabolite Profiles and Neuroprotective Activities of Moss *Hypnum cupressiforme* Extracts: In Vitro and In Silico Study. *Plants* **2022**, *11*, 123. <https://doi.org/10.3390/plants11010123>

Academic Editors: Jana Šic Žlabur, Sanja Radman and Martina Skendrović Babojelić

Received: 17 December 2021

Accepted: 29 December 2021

Published: 1 January 2022

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Numerous representatives of mosses, including *Hypnum cupressiforme*, have been used to alleviate different inflammation-related conditions. However, the mode of action underlying this anti-inflammatory potential has been poorly understood. Moreover, the influence of seasonality on the chemical composition and biological activity of mosses is generally overlooked. This study aimed to investigate the influence of seasonal changes (spring, summer, and autumn) on secondary metabolite composition and biological activities of ethyl acetate *H. cupressiforme* extracts. Antioxidant activity was measured using β -carotene bleaching assay, while MTT, NBT, ELISA, and Griess assays were carried out to explore the anti-neuroinflammatory and neuroprotective potential of extracts. Inhibitory activities on acetylcholinesterase and tyrosinase were assessed experimentally and by docking analysis. The highest content of secondary metabolites and antioxidant activity were observed in moss during the summer. Extracts inhibited the secretion of ROS, NO, TNF- α , and IL-6, alleviating the inflammatory potential of H₂O₂ and LPS in microglial and neuronal cells. Strong inhibitory effects on acetylcholinesterase and tyrosinase were observed in vitro. Docking analyses revealed high-affinity interactions of secondary metabolites present in *H. cupressiforme* with important enzyme residues. Altogether, these results reveal the neuroprotective potential and the significance of seasonal fluctuations on secondary metabolite content and biological activities in moss *H. cupressiforme*.

Keywords: bryophytes; moss extract; *Hypnum cupressiforme*; seasonal changes; secondary metabolites; anti-inflammatory; anti-neurodegenerative; neuroprotection; molecular docking

1. Introduction

Mosses are small, non-vascular plants that belong to the second-largest group of terrestrial plants, bryophytes [1]. They occur in a wide range of habitats and form an essential component of numerous ecosystems, thus contributing to their proper functioning. Among other things, mosses have found application in biomonitoring of air pollutants and ethnopharmacology [2,3]. They have been used in traditional medicine for the treatment of skin infections, wounds, and burns, as well as different inflammation-related conditions (fever, adenotonsillitis, rhinitis, and pneumonia) [3]. Moreover, mosses exhibit well-known antitumor, antimicrobial, and antifungal activities [4–6]. In the present study,

we have focused on *Hypnum cupressiforme* Hedw., a pleurocarpous moss species. This moss can be found in nearly all continents and climate zones, while in Serbia it is one of the most common moss species [7,8]. Despite the prevalence of this moss, studies regarding *H. cupressiforme*'s chemical composition and biological activities are rare, while biological assays usually involve the analysis of its antioxidant, antimicrobial, and antitumor potential [9,10].

Nowadays, a great biological interest is brought to bryophytes since they contain a broad spectrum of secondary metabolites, which are produced to combat different biotic and abiotic stress (microorganisms, insects, UV radiation, and different environmental conditions). The majority of stress factors have a clear seasonal pattern, which implies that the total content and relative proportions of secondary metabolites in plants oscillate depending on seasonal i.e., environmental changes. Consequently, these changes influence the therapeutic efficacy of the particular plant, as well. Several studies have been conducted to investigate the time and season of harvesting different medicinal plants and their parts [11]. However, when it comes to bryophytes, only a few studies analyzed the chemical and biochemical responses of bryophytes to seasonal changes [12–14]. For instance, a study about the lipid composition in *Sphagnum* mosses revealed a clear seasonal pattern in the total lipid content of this moss [13]. A different study investigated the chemical composition and concentration of particular metabolites in four different moss species during the seasons and found seasonal variations within the major groups of moss secondary metabolites [12]. Additionally, a study about different liverwort species has shown seasonal variation in total phenolic and flavonoid content, as well as in antioxidant and polyphenol oxidase enzymes [14]. Since there is no general rule about the harvesting time for better yield and ratio of specific secondary metabolites [11], studies regarding the seasonal variation of moss secondary metabolites and biological potential are useful to find the optimal conditions for harvesting of a particular moss species.

In our recently published paper [10], the ethyl acetate extract of *H. cupressiforme* exhibited a significant anti-neuroinflammatory activity by reducing the production of NO in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated BV2 microglial cells, along with potent activities to inhibit tyrosinase and acetylcholinesterase (AChE). LPS-induced stimulation of microglial cells is a well-known and extensively employed model for the study of neuroinflammation, which underlies the pathogenesis of neurological disorders such as Alzheimer's (AD) and Parkinson's disease (PD) [15]. Activated microglial cells release diverse pro-inflammatory cytokines and neurotoxic mediators including nitric oxide (NO), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and reactive oxygen species (ROS) [16]. The accumulation of these factors inevitably leads to inflammation and consequent neuronal damage. Therefore, the inhibition of excessive and prolonged microglial activation may alleviate neurodegeneration. Additionally, the inhibition of enzymes, such as AChE and tyrosinase, involved in the pathogenesis of AD and PD represents a promising pathway in the treatment of these neurological disorders [10].

Based on our previously published data [10], the next objective was to investigate whether the change of season has an impact on the secondary metabolite composition and biological activities of moss *H. cupressiforme*. For this purpose, five selected classes of secondary metabolites, as well as antioxidant, anti-neuroinflammatory, anti-neurodegenerative, and neuroprotective potential of moss *H. cupressiforme*, have been examined. Finally, docking studies have been performed with the aim to identify the extract constituents from *H. cupressiforme*, which contribute the most to the corresponding anti-neurodegenerative effect.

2. Results

2.1. (Bio)Chemical Evaluation

The relative ratios of total phenolic content (TPC), total phenolic acid content (TPAC), total flavonoid content (TFC), total flavonol content (TFIC), and total triterpenoid content

(TTC) for three seasonal aspects (spring [10], summer, and autumn) of moss *H. cupressiforme* ethyl acetate extracts are presented in Figure 1A. The absolute values with corresponding statistics are given in Table S1. It should be noted that the data obtained for the spring aspect, although already published in our previous study [10], are also presented in Table S1, together with summer and autumn results in order to compare the chemical composition of moss extracts from three different investigated seasons.

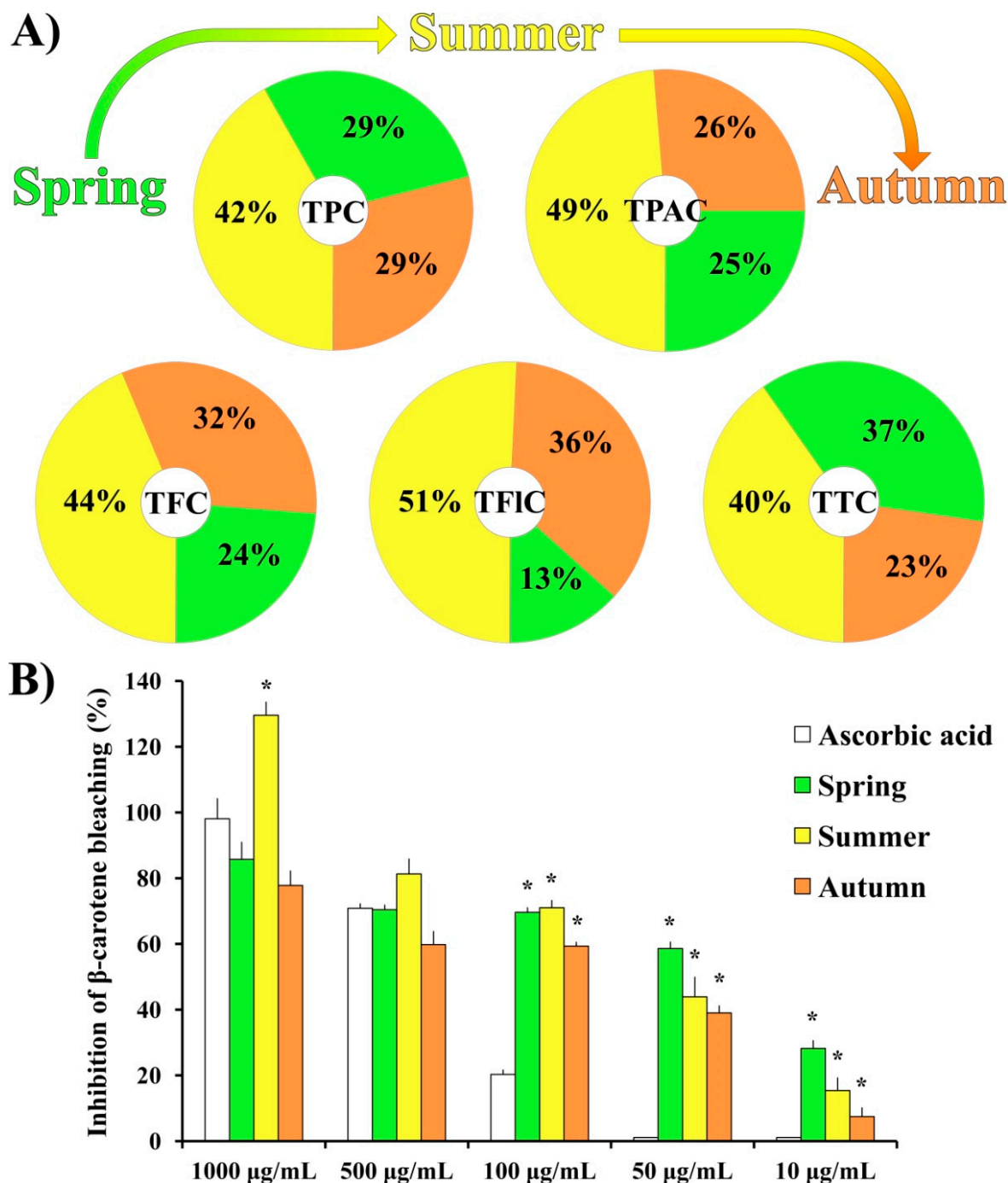


Figure 1. (A) Chemical composition and (B) antioxidant activity of *H. cupressiforme* ethyl acetate extracts from different seasonal aspects (spring, summer, and autumn). The results are presented as the mean \pm standard error (* $p < 0.05$ different seasons vs. standard substance ascorbic acid).

As shown in Figure 1A, the chemical analysis of *H. cupressiforme* ethyl acetate extracts revealed an unequal distribution of secondary metabolites among different seasonal aspects. The highest concentrations of all investigated secondary metabolites were found in

the summer aspect and they were significantly higher compared to both spring and autumn seasons (Table S1). The only exception was TTC, where the summer aspect of the moss was statistically significant regarding the autumn aspect only.

The results of the β -carotene bleaching assay (Figure 1B) showed that, at the lower tested concentrations (100, 50, and 10 $\mu\text{g/mL}$), investigated extracts from all seasonal aspects exhibited significantly higher activity than standard natural antioxidant—ascorbic acid. Moreover, at the highest applied concentration (1000 $\mu\text{g/mL}$), extract from the summer aspect exhibited a significantly better inhibition rate in comparison to the same concentration of the standard substance (129.6 % for the summer season vs. 98.1% for the AA). Calculated IC50 values for ascorbic acid, spring, summer, and autumn aspects are as follows: 250.88 $\mu\text{g/mL}$; 54.45 $\mu\text{g/mL}$; 36.01 $\mu\text{g/mL}$; 63.53 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

2.2. Anti-Neuroinflammatory Potential of *H. cupressiforme* Extracts

2.2.1. H_2O_2 -Stimulated BV2 Microglial Cells

Extracts of moss *H. cupressiforme* from summer and autumn seasons were evaluated for their effects on the metabolic activity and ROS production of H_2O_2 -stimulated murine BV2 microglial cells, and the results are presented in Figure 2.

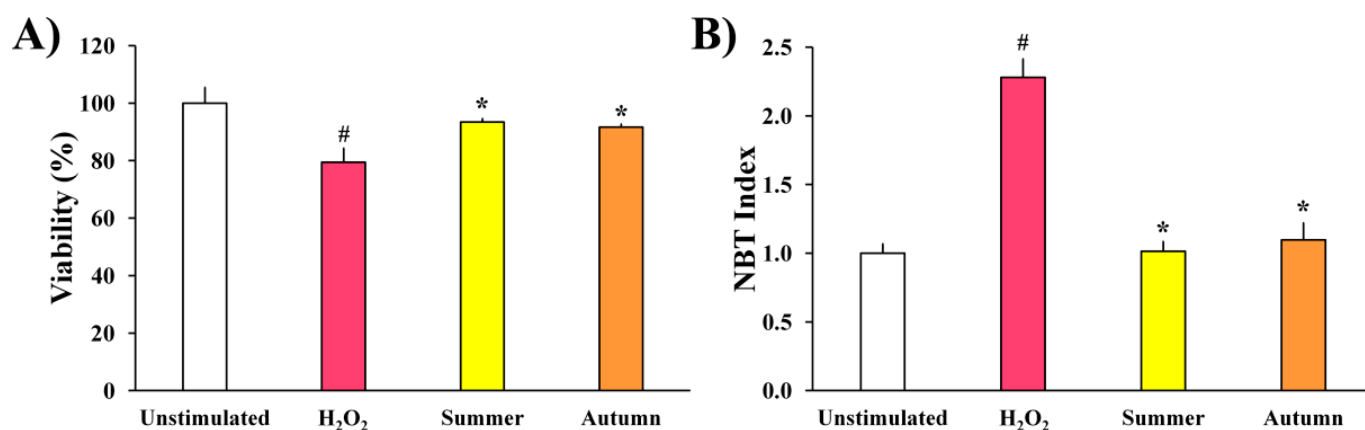


Figure 2. The effects of *H. cupressiforme* ethyl acetate extracts from different seasonal aspects (summer and autumn) on (A) metabolic activity and (B) ROS production in H_2O_2 -stimulated BV2 microglial cells. The results are presented as the mean \pm standard error (# $p < 0.05$ unstimulated cells vs. H_2O_2 -stimulated; * $p < 0.05$ H_2O_2 -stimulated vs. moss-treated and H_2O_2 -stimulated cells).

As shown in Figure 2A, the metabolic activity of BV2 cells treated only with H_2O_2 was significantly reduced when compared to the control, unstimulated cells. However, after simultaneous treatment with H_2O_2 and extracts, a significant recovery of metabolic activity of BV2 cells was detected, in comparison to the cells treated only with H_2O_2 . Extracts from both seasons exhibited similar activities and did not differ statistically.

As expected, in comparison to unstimulated cells, the production of ROS by BV2 cells increased after stimulation with H_2O_2 (Figure 2B). However, investigated extracts significantly reduced ROS production (H_2O_2 -induced), expressed as NBT index, from 2.3 to 1 and 1.1 (summer and autumn aspects, respectively) bringing them to the level of unstimulated cells. These results indicate that the investigated extracts possess a strong and significant antioxidant potential in the investigated cell model.

2.2.2. LPS-Stimulated BV2 Microglial Cells

The influence of moss extracts on LPS-stimulated BV2 cells was determined by measuring the metabolic activity of the cells, production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) and pro-inflammatory mediators (ROS and NO), and the results are presented in Figure 3.

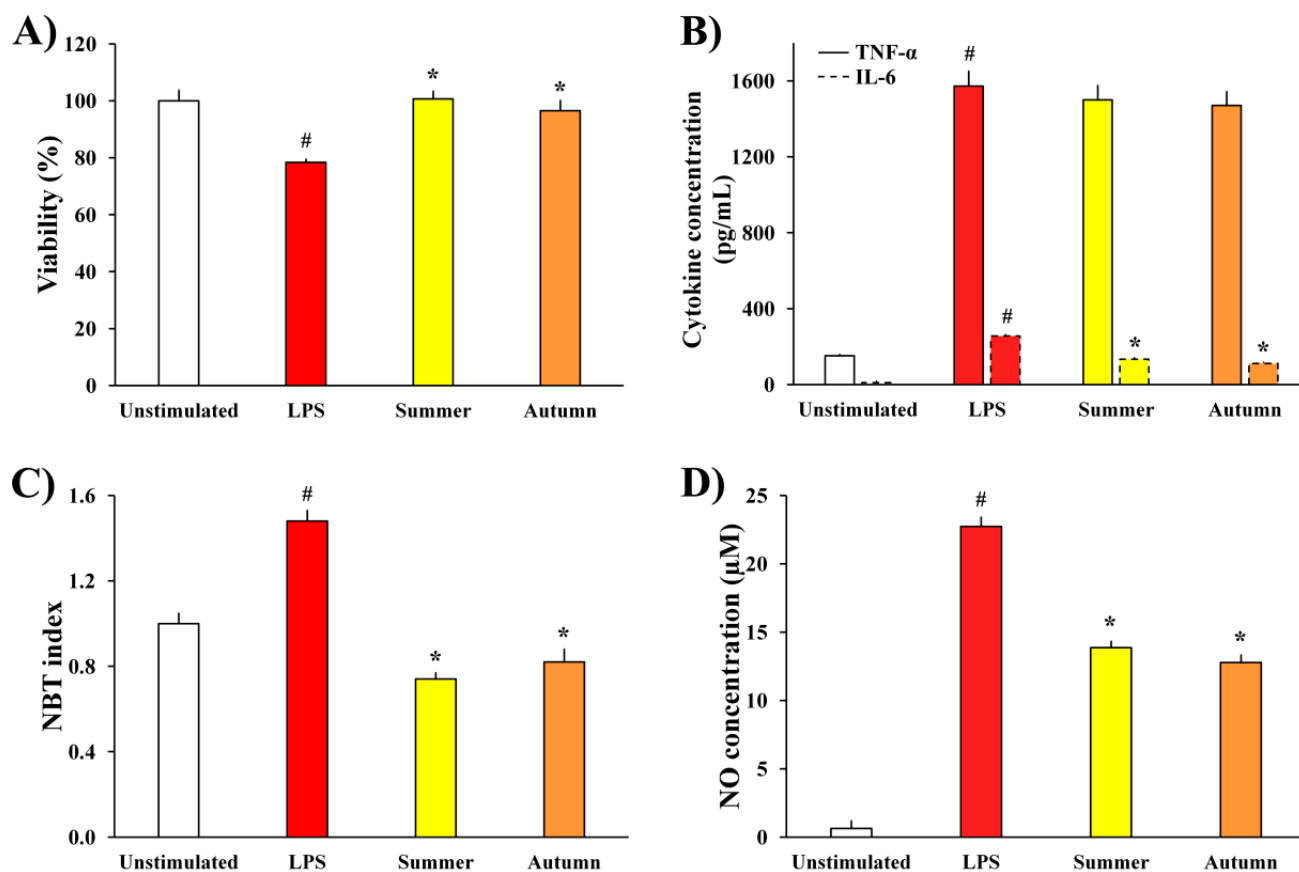


Figure 3. The effects of *H. cupressiforme* ethyl acetate extracts from different seasonal aspects (summer and autumn) on (A) metabolic activity, (B) cytokine production, (C) ROS production, and (D) NO production by LPS-stimulated BV2 microglial cells. The results are presented as the mean \pm standard error (# $p < 0.05$ unstimulated cells vs. LPS-stimulated; * $p < 0.05$ LPS-stimulated vs. moss-treated and LPS-stimulated cells).

The data presented in Figure 3A show that the metabolic activity of LPS-treated BV2 cells was significantly reduced compared to unstimulated cells, as a consequence of LPS stimulation. Simultaneous treatment of cells with LPS and extracts of moss *H. cupressiforme* from summer and autumn seasons normalized the metabolic activity of LPS-stimulated BV2 cells, thus leading to their full recovery.

Extracts from summer and autumn seasons were further evaluated for their effects on the production of inflammatory cytokines, TNF- α and IL-6, by BV2 microglial cells. As it is presented in Figure 3B, LPS stimulation significantly increased the levels of both cytokines in the cell supernatants, while treatment with moss extracts significantly reduced the levels of IL-6 compared to the level in supernatants of only LPS-treated control cells. On the other hand, although the TNF- α production was not significantly reduced by treatment with *H. cupressiforme*, it was diminished by a certain percentage (4.5% for summer and 6.5% for autumn season).

Moreover, as a response to LPS stimulation, there was a significant increase in the production of inflammatory molecules (ROS and NO, Figure 3C,D, respectively) in comparison to unstimulated cells. Nevertheless, investigated moss extracts significantly diminished the production of ROS and NO, bringing them to the level of non-stimulated controls and thus reducing inflammation.

2.3. Neuroprotective Potential of *H. cupressiforme* Extracts

With the aim to determine whether moss extracts can inhibit the neuronal death caused by LPS-induced BV2 neurotoxicity, the metabolic activity of SH-SY5Y neurons was

assessed. The influence of BV2 supernatants treated with LPS and moss extracts on SH-SY5Y neurons is shown in Figure 4.

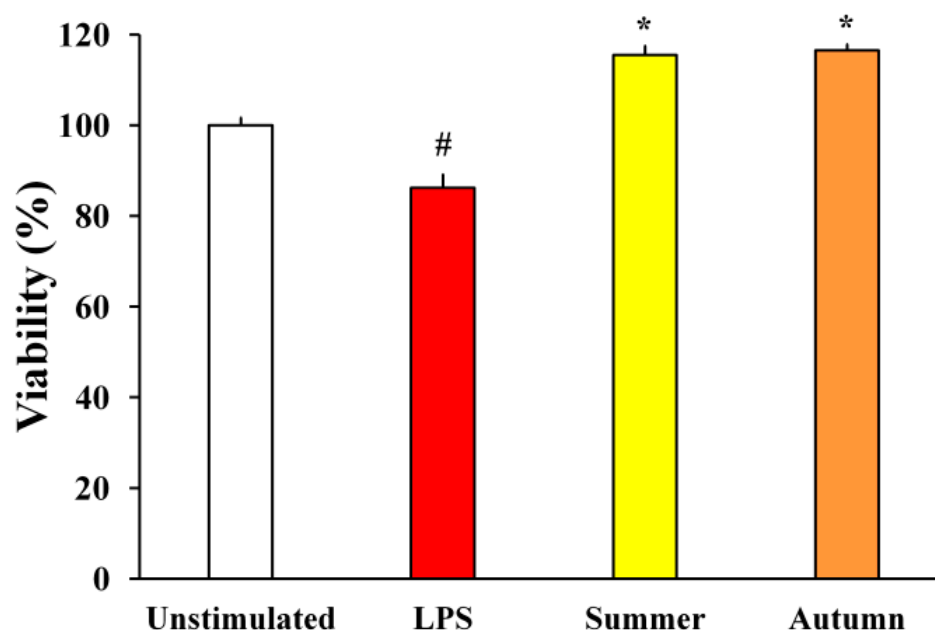


Figure 4. The effects of LPS-stimulated and moss-treated supernatants of BV2 cells on SH-SY5Y metabolic activity. The results are presented as the mean \pm standard error (# $p < 0.05$ unstimulated cells vs. LPS-stimulated; * $p < 0.05$ LPS-stimulated vs. moss-treated and LPS-stimulated cells).

The results presented in Figure 4 show that supernatants of BV2 cells treated only with LPS have led to a reduction in the metabolic activity of SH-SY5Y cells. On the other hand, the metabolic activity of SH-SY5Y treated with supernatants of BV2 cells simultaneously treated with LPS and moss extracts was significantly higher. Supernatants of BV2 cells treated with moss extracts increased SH-SY5Y cell viability by 29.3% (summer aspects) and 30.3% (autumn aspect) compared to media collected from cells treated only with LPS. This data reveals that moss extracts can provide neuroprotection of SH-SY5Y neurons induced by microglia-mediated LPS neurotoxicity.

2.4. Anti-Neurodegenerative Potential of *H. cupressiforme* Extracts

The results obtained regarding the AChE and mushroom tyrosinase (mTyr) inhibitory activities are presented in Figures 5A and 5B, respectively.

In terms of AChE inhibition, the extracts exhibited moderate activities at the highest tested concentration, while on the lower concentrations the inhibition percentages were high and statistically significant in comparison with the positive control, galantamine (Figure 5A). Interestingly, while the control displayed a concentration-dependent inhibition of AChE, the inhibition values for investigated moss extracts increased proportionally with the decreasing of sample concentration. Thus, the highest inhibition value of AChE was noted at the concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for both summer and autumn samples. Regarding investigated seasonal aspects, the trends of enzyme inhibition are similar for both summer and autumn aspects of the tested moss species. Furthermore, the inhibition of mTyr followed the same trend as the previously described inhibition of AChE, with a notable increase of the enzyme inhibition percentage as the concentration of moss extract decreased (Figure 5B). Moss extracts at concentrations of 100, 50, and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ exhibited higher inhibition percentages than those of the standard inhibitor substance, kojic acid. Regarding seasonal aspects, summer and autumn aspects displayed a similar trend towards the inhibition of mTyr at all investigated concentrations, although at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

extract from autumn season exhibited considerably higher (but not statistically significant) inhibition percentage than the summer aspect (64.5 vs. 21.2% for autumn and summer, respectively).

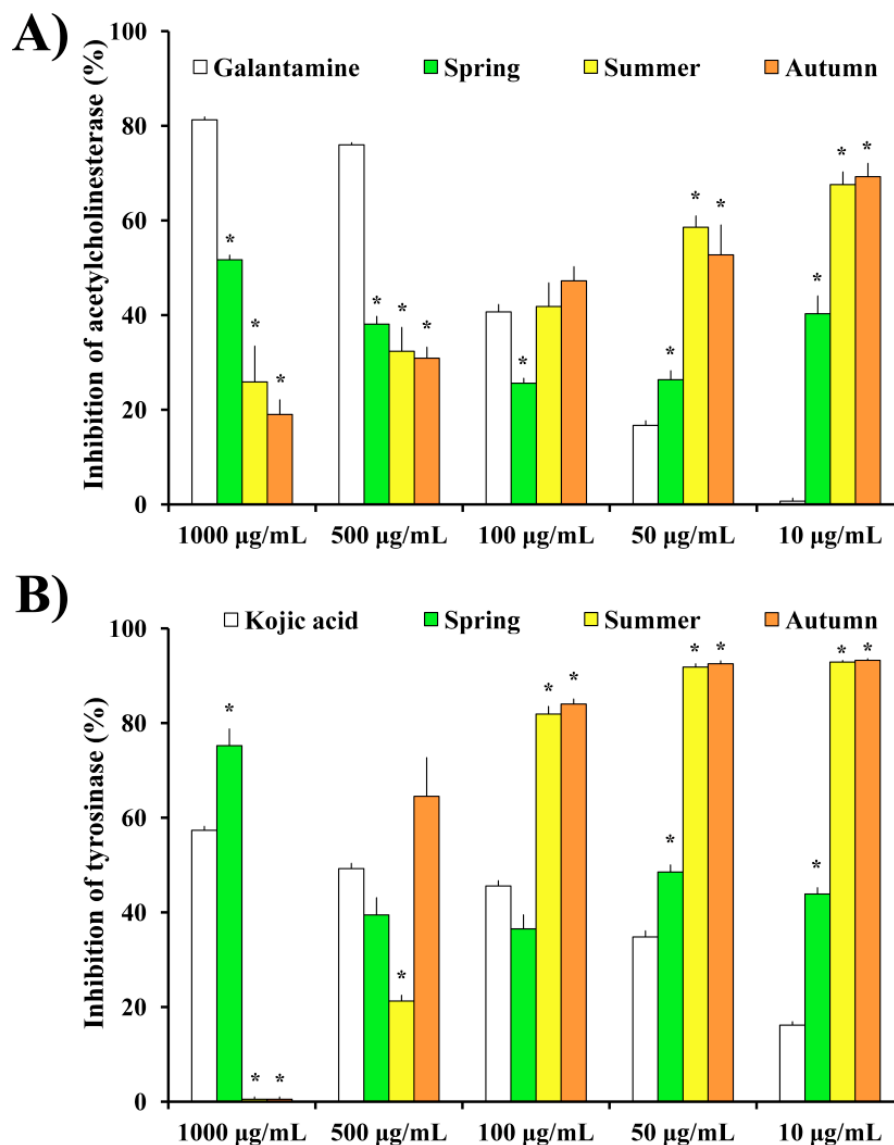


Figure 5. The inhibitory potential of *H. cupressiforme* ethyl acetate extracts from different seasonal aspects (spring, summer, and autumn) on (A) AChE and (B) mTyrosinase. The results are expressed as the mean \pm standard error (* $p < 0.05$ different seasonal aspects vs. corresponding standard substances).

2.5. In Silico Molecular Docking

Molecular docking was performed on the 14 compounds that were previously identified as secondary metabolites in *H. cupressiforme* extract using LC-MS [10]. AutoDock 4.2.6 simulation was employed to define the binding affinity and potential binding mode of the compounds that could explain AChE and tyrosinase (mushroom and human—hTyrosinase) inhibitory activities. Control docking procedure was performed using the co-crystallized control ligands in order to validate the docking simulation, while galantamine and kojic acid were employed as the experimentally used standard inhibitors towards the AChE and mTyrosinase enzymes, respectively.

With the aim to evaluate whether the docking protocol and parameters used in this simulation can predict the native conformations of the investigated compounds, validation was carried out by re-docking the AChE and mTyr receptors with ligands bis(7)-tacrine and tropolone, respectively. Precisely, the root mean square deviation (RMSD) value of the re-docked bis(7)-tacrine was found to be 0.83 Å, while for the tropolone the RMSD value was 1.30 Å, suggesting the efficiency and validity of the docking protocol used in the present study. Generally, the docking parameters are considered to be acceptable if the RMSD value of the re-docked ligand, with respect to the crystallized one, is less or equal to 2 Å.

Moreover, it should be noticed that all compounds docked on AChE, mTyr, and hTyr active sites were classified into six groups, according to their chemical structures. Within each of these groups, the compounds with the best docking scores were selected, and their interactions with the corresponding enzymes are presented in Figure 6 (AChE) and Figure 7 (hTyr). In addition, docking energies, inhibition constants, and ligand efficiencies, together with all the interactions of investigated enzymes with compounds identified in *H. cupressiforme* are given in Tables S2, S3 and S4, for AChE, mTyr, and hTyr, respectively.

2.5.1. AChE Docking

Molecular docking results for the six best-ranked representatives from each compound class (defined according to their chemical structure) docked into the active site of AChE from *Torpedo californica* Ayres, 1855 are presented in Figure 6.

Based on docking results presented in Figure 6, it can be observed that compounds selected within each of six groups as best-docked to AChE active site are: eriodictyol (−8.80 kcal/mol), isorhamnetin-3-*O*-glucoside (−7.34 kcal/mol), 5-*O*-caffeoylquinic acid (−5.86 kcal/mol), caffeic acid (−5.32 kcal/mol), quercetin-3-*O*-rutinoside (−4.79 kcal/mol), and gallic acid (−4.67 kcal/mol). The selected compounds are mainly involved in conventional hydrogen, Pi–Pi, and van der Waals interaction types with Ser200 and His440, important members of the catalytic triad of AChE. In addition to the mentioned types of interactions, carbon–hydrogen, Pi–anion, Pi–lone pair, and Pi–alkyl interactions were also realized with Asp72, Gly80, Ser81, Trp84, Gly118, Glu199, Tyr121, Ser122, Trp279, Ser286, Phe288, Arg289, Phe290, Phe330, Phe331, Tyr334, Gly441, and Tyr442 amino acid residues in the AChE enzyme (Table S2).

Galantamine, used as a positive control in the enzyme inhibition assay, showed a docking score of −8.99 kcal/mol to the active site of AChE. This docking score suggests a higher binding affinity of galantamine in comparison to investigated compounds from *H. cupressiforme*. The network of hydrogen bonding, van der Waals, carbon–hydrogen, and Pi–alkyl interactions was observed between galantamine and amino acids from AChE, precisely with Trp84, Glu199, Phe288, Phe290, Phe330, Phe331, and His440 (Table S2).

The group of compounds that exhibited the best binding affinity for the enzyme are flavonoids. This group included five compounds—eriodictyol, acacetin, apigenin, naringenin, and kaempferol, with their corresponding docking scores of −8.80, −8.72, −8.59, −8.52, and −8.39 kcal/mol, respectively. All these compounds interacted with His 440, as well as with Asp72, Gly119, Phe330, and Tyr442, while some of these compounds also interacted with Trp84, Gly118, Gly119, Ala201, Trp233, Phe290, and Tyr334 (Table S2).

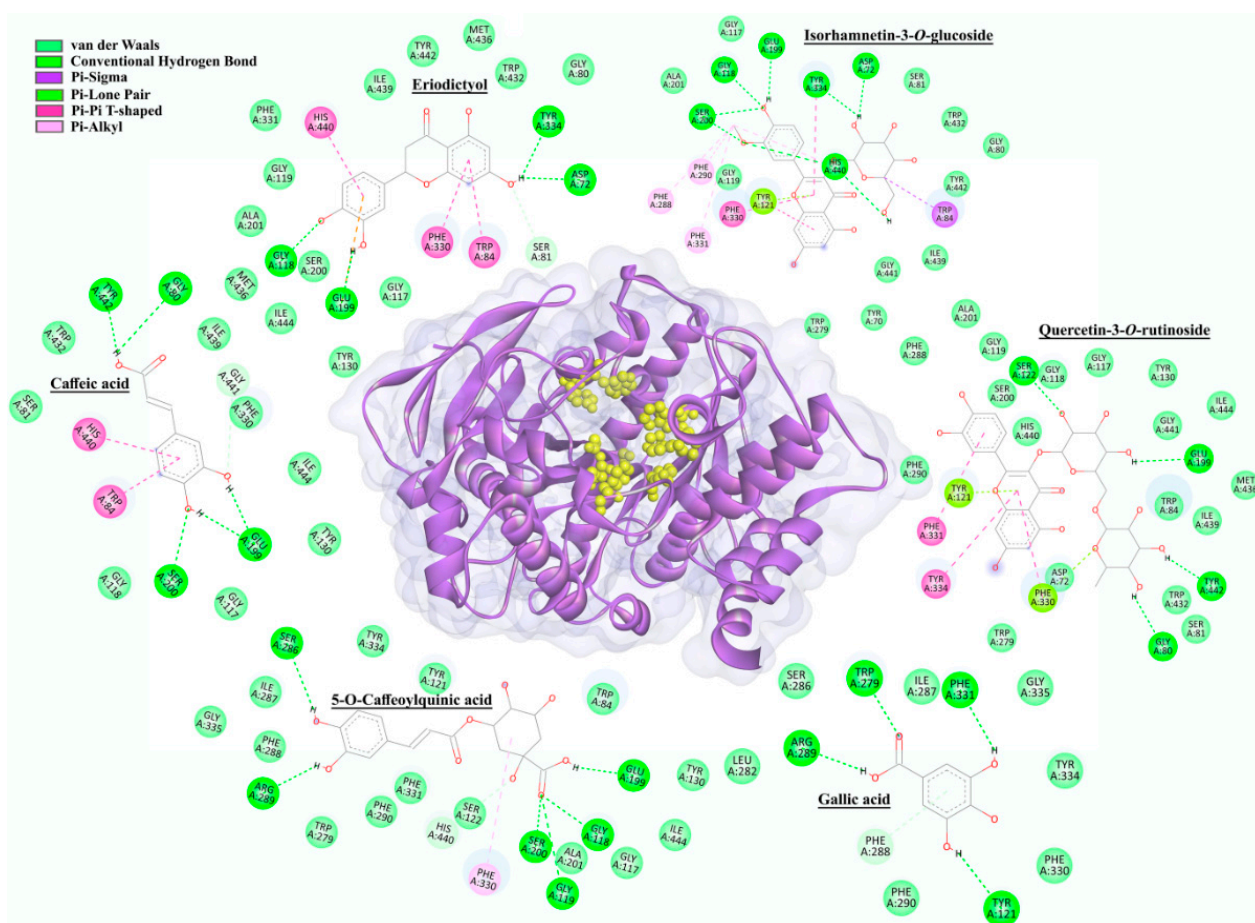


Figure 6. The 2D intermolecular interactions of selected representatives within the active site (marked with yellow) of AChE (2CKM).

2.5.2. Tyrosinase (mTyr and hTyr) Docking

Based on the docking results (Table S3), there were certain differences between mTyr and hTyr when it comes to the affinity of the investigated compounds for the active site of an enzyme. Compounds with the highest inhibitory activity against mTyr within each of six groups were quercetin-3-O-rutinoside (−7.72 kcal/mol), *p*-coumaric acid (−6.81 kcal/mol), protocatechuic acid (−6.47 kcal/mol), 5-*O*-Caffeoylquinic acid (−6.42 kcal/mol), apigenin (−5.73 kcal/mol), and isorhamnetin 3-*O*-glucoside (−5.71 kcal/mol). The main types of interactions between the selected compounds and enzyme residues were conventional hydrogen, carbon–hydrogen, alkyl, Pi–Pi, Pi–sigma, Pi–sulfur, Pi–alkyl, and van der Waals interactions. In addition to amino acids from the mTyr active site (His61, His85, His94, His259, His263, and His296), the following residues also participated in the building of mentioned interactions: His244, Val248, Glu256, Met257, Asn260, Thr261, Phe264, Arg268, Pro277, Met280, Gly281, Ser282, Val283, and Ala286. Kojic acid, as a positive standard used in the enzyme inhibition assay, had a docking score of −4.52 kcal/mol, which was weaker than all the compounds investigated in this study. These results also showed that some of the compounds formed Pi–alkyl interactions with Cu400 and Cu401 (Table S3).

Since there is no currently available crystal structure of hTyr on PDB, a homology modeling-based approach was used to predict the 3D structure of this enzyme. Due to the highest sequence identity with hTyr (43.32 %), the crystal structure of human tyrosinase-related protein 1 (hTyrP1, PDB ID: 5M8L) was used as the protein template. The full sequence of hTyr (P14679) was obtained from the UniProt database. Zinc ions were kept in the constructed homology model of hTyr.

3. Discussion

In the search for novel, naturally occurring bioactive compounds from plants, bryophytes, especially mosses, have been relatively overlooked for a quite long time. However, due to the remarkable structural and chemical diversity of compounds identified in mosses, much more attention has been given to these plants recently. In our previously published paper [10], different extracts of *H. cupressiforme* samples collected during the spring season have been (bio)chemically and biologically evaluated. The results of that investigation served as the starting point in this research since promising biological potential has been observed. Additionally, knowing that the content of secondary metabolites in plants can vary depending on the season, in the present paper, the ethyl acetate extract of moss *H. cupressiforme* (previously proved as biologically most prominent) was chemically characterized throughout three different seasons (spring, summer, and autumn) and screened for its antioxidant, anti-neuroinflammatory, anti-neurodegenerative, and neuroprotective potential. Because winter is generally considered as a dormant season for plants, including some bryophytes [14,17] the winter aspect of moss *H. cupressiforme* was not included in the present study.

All moss samples (parts of the huge mats covering rock outcrops) were collected at the same location and from the same population (Vršačke Planine Mts., Serbia), while the regeneration is documented by the absence of sex organs as vegetative (implying to same genetic structure). Thus, the variation in extract secondary metabolite content can only be attributed to seasonal climatic characteristics, such as fluctuations in temperature, precipitation, air humidity, and/or duration and intensity of sun radiation. The results presented in Figure 1A revealed that moss *H. cupressiforme* produced the highest content of all investigated secondary metabolites (TPC, TPAC, TFC, TFIC, and TTC) during the summer season. These compounds are likely elevated during summer to enable the moss to cope with abiotic stress such as high temperatures and droughts. In the literature, however, contrasting tolerance patterns were observed on a seasonal level among different bryophytes. While in some studies the majority of protective substances such as polyphenols were exhibited during the summer, in others, the concentration of phenolic substances was the highest in spring and gradually decreased during the season [12,18]. These data suggest that bryophytes respond species-specifically to different seasonal conditions. Additionally, the assumption on synergisms and antagonisms should be considered as well. Bearing in mind all previously stated, studies about seasonal variation in moss chemical composition are essential to determine the season that is the most productive for a particular species of interest. Moreover, it can be regionally depending. For *H. cupressiforme*, based on the results from this study, the season with the highest content of secondary metabolites of interest locally proved to be summer.

Since different classes of polyphenolic compounds with antioxidant properties have been identified in *H. cupressiforme*, our next goal was to examine the antioxidant potential of this moss. The β -carotene assay was used as a model system, where the capacity of extracts for the inhibition of lipid peroxidation was evaluated. The results of the β -carotene assay (Figure 1B) revealed that all three seasonal aspects of moss *H. cupressiforme* performed the same or even better activities than natural antioxidant ascorbic acid. Among investigated seasons, the summer aspect exhibited the best activity at all tested concentrations, except the lowest. The probable explanation for the highest activity in summer aspect is that exposure to higher temperatures during the summer is linked to a higher need for antioxidant protection in tested moss. This is in accordance with the existing literature data, where it can be found that mosses exhibit higher antioxidant enzymatic activity during the summer [19]. Nevertheless, it should be noted that this is the first study that evaluated the seasonal change of antioxidant activity in mosses by using the β -carotene bleaching assay.

The antioxidant and anti-neuroinflammatory potential of examined moss extracts was further examined on BV2 microglial cells, where oxidative stress induced by H_2O_2

served as the main trigger of inflammation. The treatment of BV2 cells with H₂O₂ significantly reduced cell viability and increased the oxidative stress in cells through the production of ROS. The same observations have been reported in several studies where BV2 cells were exposed to H₂O₂ and activated by direct oxidation, leading to the subsequent production of ROS [20–22]. Although ROS are essential for maintaining neuronal cell functions, excessive oxidative stress can cause protein oxidation and lipid peroxidation, thus promoting neuronal damage and degeneration. Given that moss extracts normalized the viability of H₂O₂-stimulated microglia cells and diminished their production of ROS (Figure 2), bringing them to the level of untreated controls, investigated moss extracts can be considered as potent antioxidants and anti-neuroinflammatory agents. The observed antioxidant activity in cells could be mediated through the capacity of extracts to protect against lipid peroxidation, such as previously shown in β -carotene bleaching assay, using a cell-free model system. Extracts from both investigated seasons (summer and autumn) performed similar activities, without significant differences between them, suggesting that both aspects of moss *H. cupressiforme* might carry therapeutic potential against neurodegenerative diseases that have been associated with oxidative stress [23].

Another potent trigger for the activation of BV2 cells and secretion of inflammatory mediators is LPS, an endotoxin produced by Gram-negative bacteria. In our previous study, we already established the potential of *H. cupressiforme* extracts from the spring season to act as anti-neuroinflammatory agents against BV2 cells activated by LPS [10]. Therefore, the goal of the present study was to find out the potential of extracts from summer and autumn seasons to act as anti-inflammatory agents in the same model system. The results presented in Figure 3 have shown that LPS stimulation significantly decreased the metabolic activity of BV2 cells and increased the production of inflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) as well as inflammatory mediators (ROS and NO), causing inflammation as a protective response of the immune system. Sometimes, this response may be so strong and uncontrolled that it leads to chronic inflammation, which is associated with the development of different neurodegenerative pathologies [24]. Therefore, it is very important to limit the production of inflammatory cytokines and mediators by microglia and to keep the inflammatory response under control. In this study, we found that *H. cupressiforme* extract reduced the production of cytokines and mediators by LPS-activated microglia cells. Additionally, extracts normalized the metabolic activity of LPS-treated cells, recovering and bringing them to the level of untreated, control cells. Both investigated seasons (summer and autumn) exhibited significant anti-neuroinflammatory activities, which is additional evidence of *H. cupressiforme*'s applicability in the prevention and treatment of neuroinflammatory and neurodegenerative disorders.

The neuroprotective potential of *H. cupressiforme* extracts was evaluated using the microglial culture supernatant transfer model. In this model system, we examined how soluble molecules released by BV2 microglial cells (LPS-stimulated and treated with investigated moss extract) affect neuronal cells and their metabolic activity. As observed in previous studies [25,26], supernatants from LPS-stimulated BV2 microglial cells have induced toxicity to SH-SY5Y neuronal cells. However, treatment of BV2 cells with moss extracts upon LPS stimulation significantly increased metabolic activity in SH-SY5Y cells, bringing them to the level of control cells (Figure 4). These results suggest that summer and autumn aspects of moss *H. cupressiforme* possess a significant capacity to protect neuronal cells against neurotoxicity induced by LPS. Therefore, extracts of moss *H. cupressiforme* have a promising potential for preventing and treating neurodegenerative diseases associated with excessive microglial activation, neuroinflammation, and subsequent neurotoxic consequences.

With the aim to examine the neuroprotective effects of *H. cupressiforme* extracts, we also evaluated AChE and tyrosinase inhibitory potential. AChE is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine to acetate and choline. Although AChE is essential for the proper functioning of the nervous system, increased activity of this enzyme can lead to problems in synaptic integrity, neurite outgrowth, and

neurodevelopment [27]. Moreover, low levels of acetylcholine in the synapses due to increased AChE activity have been linked to memory loss commonly seen in Alzheimer's disease (AD) [28]. Furthermore, we investigated the inhibition of tyrosinase, an enzyme related to another neurodegenerative disease, Parkinson's disease (PD). It has been reported that tyrosinase is a key enzyme involved in the formation of neuromelanin in the central nervous system [29]. As the accumulation of neuromelanin is associated with the damage of neurons observed in PD, the inhibition of tyrosinase is a promising approach for PD treatment [30]. In the present study, AChE and mTyr inhibitory potential of *H. cupressiforme* from summer and autumn seasons were investigated, while the inhibitory potential for the spring aspect was published recently [10]. The obtained results (Figure 5) show that extracts from summer and autumn seasons strongly inhibit both AChE and mTyr, performing better activities at the lower concentrations. Interestingly, in both AChE and mTyr inhibition assays, opposite dose-responses were observed. These phenomena can be addressed to different intermolecular interactions at higher concentrations, which finally decreased the total amount of available molecules for the interaction with enzymes. Consequently, the inhibitory potential of extracts is reduced at high concentrations, while prominent activates are observed at lower concentrations.

Molecular docking studies of the 14 compounds previously identified in *H. cupressiforme* ethyl acetate extract [10] to enzymes AChE and tyrosinase have been performed. The 3D structure of AChE is evolutionary conserved, so AChE's from different species are generally very similar [31]. Thus, we expect that the structure of AChE employed for the docking simulation in this study is comparable to the human and should possess identical properties of the active site. Accordingly, the obtained results for *Torpedo californica* AChE could be translated to human AChE. On the other hand, due to differences in activities and substrate specificities between mTyr and hTyr, compounds that are potent inhibitors of mTyr are not always effective against hTyr, as previously reported [32]. As the final goal of this research was to define the most efficient secondary metabolites from moss extracts in terms of potential human application, the docking on hTyr was also performed.

Regarding AChE (Figure 6), it has been observed that all investigated compounds bind in close proximity of the AChE active site, which includes the catalytic site (Ser200, His 440, and Glu327) as well as many additional subsites also important for the catalytic process. In the anionic subsite (Trp84, Tyr130, Tyr330, and Phe331) the choline moiety of the substrate is bound and positioned for hydrolysis. The acyl pocket (Phe288 and Phe290) binds the acetyl group of the substrate, while the oxyanion hole (Gly118, Gly119, and Ala 201) is included in the stabilization of the substrate transition state [33]. Among the investigated ligands, the strongest binding affinity toward AChE was obtained for eryodictiol and, generally, for all flavonoids. These compounds have shown interactions (Pi–Pi and van der Waals) with important amino acid residues, His440 and Ser200, within the catalytic site of AChE. In addition, flavonoids realized several interactions with prominent amino acid residues of an anionic subsite of AChE, namely Pi–Pi interactions with Trp84 and Tyr330, as well as van der Waals interactions with Tyr130 and Phe331. These interactions are similar to those of galantamine, the standard substance used for AChE inhibition. In light of present results, flavonoids identified in *H. cupressiforme* exhibited a great inhibitory potential towards AChE, which has been reported in the literature as well [34].

Docking simulations for both mTyr and hTyr confirmed that all previously identified compounds in *H. cupressiforme* extracts bind to the active site of tyrosinase more strongly than standard, kojic acid. This is in agreement with in vitro tyrosinase inhibition assay where the results suggested that moss extracts have higher inhibitory potential against the enzyme in comparison to kojic acid, especially at lower concentrations, due to a smaller chance for intermolecular formations. The best docking score for the mTyr was obtained for a flavonoid glycoside (quercetin-3-O-rutinoside), while hydroxycinnamic acid derivative (caffeic acid), showed the highest binding affinity toward hTyr. This suggests that compounds similar to caffeic acid in structure might be effective in the inhibi-

tion of the human enzyme. Namely, hydroxycinnamic acid derivatives have been previously reported as successful compounds in the inhibition of human tyrosinase [35,36]. Finally, as there is evidence in the literature about the diverse inhibition profiles of hTyr and mTyr [32], the establishment of intercorrelation between available experimental models (not human) and in silico data is a useful approach for the translation of in silico results obtained for human proteins into the expected experimental results.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material

Specimens of moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. (summer and autumn aspects) were collected in the Vršacke Planine Mts., Serbia (N45.128208, E21329945, 370 m a.s.l.) and prepared as previously described for the spring aspect [10]. Moss material was sampled from the siliceous rock outcrops within the forest openings from the same population in different seasons according to the local climatic conditions adjusted by average values for the seasonal mean temperatures and precipitates. Thus, the collection dates were chosen as follows: spring-time (11 May 2019), summer-time (20 August 2020), and autumn-time (1 December 2020) (leg./det. M. S. Sabovljevic and A. D. Sabovljevic, vouchers BEOU bryo collection s/n). Permission for the plant material collection was provided by the Serbian Ministry of Environment (No. 353-01-798/2020-04).

Mosses were further placed in paper bags and kept at room temperature. The room-dried and cleaned materials (i.e., green tips with no older parts and substrate remnants) were then lyophilized and ready for extraction. Moss material (5 g dry weight) was ground into small pieces in a cylindrical crusher and extracted with 100 mL of ethyl acetate for 10 h, using Soxhlet apparatus. The extracts were concentrated under reduced pressure with a rotary evaporator at 40 °C (Buchi R-210 Rotavapor System, Marshall Scientific, Hampton, NH, USA) and finally stored in dark at 4 °C.

4.2. Determination of Selected Classes of Secondary Metabolites

Total phenolic (TPC), phenolic acid (TPAC), flavonoid (TFC), flavonol (TFIC), and triterpenoid contents (TTC) were measured as described previously [10] using Multiskan Sky Thermo Scientific microtiter plate reader, Vantaa, Finland. The phenolic content of extracts was calculated from the gallic acid curve equation and expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry extract (mg GAE/g dry extract). The phenolic acid content of extracts was calculated from the curve equation of caffeic acid in 50% ethanol and expressed as milligrams of caffeic acid equivalents per gram of dry extract (mg CAE/g dry extract). Flavonoid and flavonol contents of extracts were calculated from the curve equation of quercetin and expressed as milligrams of quercetin equivalents per gram of dry extract (mg QE/g dry extract). Triterpenoid content of extracts was calculated from the ursolic acid curve equation and expressed as milligrams of ursolic acid equivalents per gram of dry extract (mg UAE/g dry extract).

4.3. Antioxidant Activity

Linoleic acid/ β -carotene bleaching assay was performed according to a method [37] described previously [10]. The absorbance was measured using the Multiskan Sky Thermo Scientific Microtiter plate reader, Vantaa, Finland. The results are expressed as the percentage of β -carotene bleaching inhibition. Ascorbic acid (AA) was used as an antioxidant standard (positive control). The concentrations of investigated moss extracts and standard were 1000, 500, 100, 50, and 10 μ g/mL.

4.4. Anti-Neuroinflammatory Activity

4.4.1. Cell Culture

Human embryonic lung fibroblast cell line (MRC-5), murine microglial cell line (BV2), and human neurons (SH-SY5Y) were used in the present study. The cells were obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

All cells were cultivated in RPMI-1640 and supplemented with 10% FBS, 1% glucose, and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin). The cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Confluent cells were seeded in a 96-well microplate. After 24 h of cell incubation, 100 µL of medium containing investigated moss extract was added to each well of the microplate. Untreated cells were used as control. The treatment concentration (10 µg/mL) was obtained by serial dilution of the stock solution (prepared in DMSO) with full medium, thus the concentration of DMSO decreased continuously and was under 0.05%.

4.4.2. Stimulation of BV2 Microglial Cells

Murine microglial BV2 cells were seeded into 96-well plates at a concentration of 10⁴ cells per well and allowed to grow for 24 h. After reaching confluency, the following stimuli were added to the cells at concentrations determined in preliminary experiments: LPS at 10 µg/mL and H₂O₂ at 30 µM, while the investigated moss extracts were added at final concentration of 10 µg/mL of cell culture. Precisely, 100 µL of LPS or H₂O₂ containing the investigated extracts was added to each well. The incubation was continued for an additional 48 h after which the cells were subjected to MTT, NBT, and Griess assays.

4.4.3. Microglial Culture Supernatant Transfer Model

To test the neurotoxic effects of activated microglia, human neurons SH-SY5Y were plated in 96-well plates at a concentration of 2 × 10⁴ cells per well in full medium. After 24 h incubation, supernatants (100 µL) of LPS-stimulated BV2 cells treated with moss extracts were added to a 96-well microplate seeded with SH-SY5Y neurons, and incubation continued for another 24 h. The metabolic activity of the SH-SY5Y cells was then measured using the MTT assay.

4.4.4. MTT Assay

The effects of moss extracts on cell metabolic activity were evaluated utilizing the MTT assay [38] as described in our previous study [10]. The absorbance of the reduced MTT was measured at 540 nm using a microplate reader (LKB 5060-006, LKB Instruments, Vienna, Austria). The results are presented as the metabolic viability of cells, calculated as the ratio between the absorbance of treated cells and the absorbance of the untreated control cells multiplied by 100.

4.4.5. NBT Assay

The influence of investigated moss extracts on the production of superoxide anion radical (O₂⁻) by BV2 cells was evaluated via NBT assay [39]. The experimental protocol was described with details in our recently published study [10]. The absorbance of the generated formazan solution was measured at 540 nm using a microplate reader LKB 5060-006, LKB Instruments, Vienna, Austria. The results are presented as the mean values of the ROS index, calculated as the ratio between the absorbance of treated cells and the untreated control cells.

4.4.6. Griess Assay

The determination of the nitric oxide (NO) production was performed by using the spectrophotometric method based on the Griess reaction [40] which is with details described in the following study [9]. The absorbance of the solution was measured at 540 nm using a LKB 5060-006, LKB Instruments, Vienna, Austria LKB 5060-006, LKB Instruments, Vienna, Austria microplate reader. The results are calculated from the nitrite standard

curve and presented as nitrite concentration (μM) which is equivalent to the NO concentration in the samples.

4.4.7. Measurement of Cytokine Levels in Cell Supernatants

Supernatants of LPS-stimulated BV2 cells from the experiments above were collected and concentrations of cytokines IL-6 and TNF- α were determined. Quantification of cytokines was carried out using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits according to the manufacturer's suggestions (R&D Systems). The results are expressed in pg/mL.

4.5. Anti-Neurodegenerative Activity

AChE [41] and tyrosinase [42] inhibitory activity assays were performed according to a protocol described previously [10]. Moss extracts and standards (galantamine and kojic acid) were investigated at following concentrations 1000, 500, 100, 50, and 10 $\mu\text{g/mL}$ using Multiskan Sky Thermo Scientific Microtiter plate reader, Vantaa, Finland. The results are presented as a percentage of enzyme inhibition in comparison to the corresponding standard substances (galantamine and kojic acid for AChE and tyrosinase, respectively).

4.6. Molecular Docking

Molecular docking studies were carried out in order to examine the binding modes of AChE and tyrosinase with 14 compounds previously identified in *H. cupressiforme* extracts by LC-MS [10]. All investigated structures of proteins were retrieved in pdb format from the RCSB Protein Data Bank database of biological macromolecules, or when the corresponding crystal structure was not available, a homology model was constructed using SWISS-MODEL server [43]. The proteins were prepared for molecular docking by removing co-crystallized ligands, water molecules, and cofactors (BIOVIA Discovery Studio 2021 [44]). Missing amino acid residues were added using Modeller 10.1 [45]. The AutoDockTools (ADT, [46]) graphical interface was used to add polar hydrogen, adjust protonation states of histidine amino acid residues, and to add Kollman charges to proteins.

AChE from *Torpedo californica* was chosen for molecular docking studies due to the previously confirmed homology with AChE from *Electrophorus electricus* [47], and better resolution of the *Torpedo californica* AChE. The three-dimensional (3D) crystal structure of *Torpedo californica* AChE complexed with bis(7)-tacrine (PDB ID: 2CKM) was retrieved with a resolution of 2.15 Å.

Tyrosinase from *Agaricus bisporus* was selected as the protein model for the present study since the mushroom tyrosinase (mTyr) enzyme was used in the inhibition assay. The 3D crystal structure of tyrosinase from *Agaricus bisporus* in complex with the inhibitor tropolone (PDB ID: 2Y9X) was retrieved with a resolution of 2.78 Å. Additionally, the human tyrosinase (hTyr) 3D structure has been predicted based on amino acid sequence obtained from UniProt and homology modeling was performed on SWISS-MODEL.

Ligand structures were retrieved from the PubChem Compound database in sdf formats and energy minimized using the UFF (Universal Force Field) implemented in the Avogadro software [48]. Gasteiger charges were assigned to the ligands using the ADT graphical interface.

Docking Procedure

Docking studies were carried out using AutoDock software (version 4.2.6 [46]) which is equipped with ADT graphical interface. The size of the grid box was set to be 60 Å \times 60 Å \times 60 Å in the x, y, and z directions with a default grid point spacing of 0.375 Å. The center of the box was determined by the coordinates of the amino acids in the active site of an enzyme. Precisely, the exact coordinates used for AChE were X = 11.513, Y = 67.693, Z = 62.518; the coordinates for mTyr were as following X = -10.044, Y = -28.706, Z = -43.443; and the coordinates for hTyr were X = 36.339, Y = 140.689, Z = 215.645. The Lamarckian genetic algorithm (LGA) was employed to generate ligand orientation within the active

site. Docking of each ligand to protein was performed with 200 iterations. The conformations were manually checked and the ones with the lowest energies in the highest numbered population size of cluster were selected for further analysis and representation. Visualization and analysis of the docking results were carried out by means of ADT and BIOVIA Discovery Studio 2021.

Before screening the compounds of interest, the docking protocol was validated by re-docking the ligands extracted from the crystal structures of AChE and tyrosinase (bis(7)-tacrine and tropolone, respectively). The docking protocol that is previously described was used in the re-docking process. The RMSD of all heavy atoms between the docked and crystal conformations of ligands were computed.

4.7. Statistical Analysis

The statistical analysis of the data was performed using the Statistical Package for Social Sciences program (SPSS) (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0., IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Statistical evaluation was performed by Independent Samples t-test, while the minimum probability value taken as statistically significant was $p < 0.05$. All measurements were carried out at least in triplicate, and results were presented as mean \pm standard error.

5. Conclusions

The results of the present study demonstrate a significant variation in the total amount of secondary metabolites in moss *H. cupressiforme* extracts throughout different seasons, with the highest content of all investigated compounds produced during the summer season. Accordingly, the moss from the summer season also expressed the highest antioxidant activity, as evaluated by β -carotene assay. Extracts from summer and autumn seasons have shown the ability to reduce oxidative and inflammatory stresses in murine BV2 microglial cells and human SHSY-5Y neuronal cells by inhibiting the production of inflammatory mediators such as ROS, NO, IL-6, and TNF- α . This evidence of anti-neuroinflammatory and neuroprotective properties of *H. cupressiforme* was further confirmed by examination of the inhibitory potential toward AChE and tyrosinase, where extracts at low concentrations exhibited better inhibition rates than corresponding standard substances. Finally, docking simulations revealed that, among the compounds identified in the extract, flavonoids exhibited the strongest inhibition potential by making interactions with the active site of AChE, while hydroxycinnamic acid derivatives showed the best affinity toward the hTyr. Finally, the results from the present study significantly enlighten the traditional usage of *H. cupressiforme*, establishing its therapeutic efficacy as an anti-inflammatory source, and revealing its neuroprotective properties. Special attention should be addressed to seasonal variation of *H. cupressiforme* secondary metabolites, where the summer aspect was found as the most prominent.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/article/10.3390/plants11010123/s1, Table S1: Chemical characterization of examined seasonal aspects of moss *H. cupressiforme* ethyl acetate extracts. Table S2: Docking results and interactions between the compounds identified in *H. cupressiforme* docked into AChE active site. Table S3: Docking results and interactions between the compounds identified in *H. cupressiforme* docked into mushroom tyrosinase active site. Table S4: Docking results and interactions between the compounds identified in *H. cupressiforme* docked into human tyrosinase active site.

Author Contributions: Conceptualization, B.Đ.B. and B.Đ.B.N.; formal analysis, T.M.L. and B.Đ.B.; investigation, T.M.L., M.R.M., M.M.O.P., A.D.S., M.S.S., and B.Đ.B.; resources B.Đ.B.N.; writing—original draft preparation, T.M.L.; writing—review and editing, T.M.L., M.R.M., M.M.O.P., A.D.S., M.S.S., B.Đ.B., and B.Đ.B.N.; visualization, T.M.L. and B.Đ.B.; supervision, B.Đ.B. and B.Đ.B.N.; project administration, B.Đ.B.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Grant of the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Contract number: 451-03-9/2021-14/200178). B.Đ.B.N. is the author who received the Grant.

Acknowledgments: The authors would like to thank Sonja Duletić-Laušević for the chemicals provided for biochemical assays.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Klavina, L.; Springe, G.; Nikolajeva, V.; Martsinkevich, I.; Nakurte, I.; Dzabijeva, D.; Steinberga, I. Chemical composition analysis, antimicrobial activity and cytotoxicity screening of moss extracts (moss phytochemistry). *Molecules* **2015**, *20*, 17221–17243.
2. Bargagli, R.; Monaci, F.; Borghini, F.; Bravi, F.; Agnorelli, C. Mosses and lichens as biomonitors of trace metals. A comparison study on *Hypnum cupressiforme* and *Parmelia caperata* in a former mining district in Italy. *Environ. Pollut.* **2002**, *116*, 279–287.
3. Glime, J. Medical Uses: Medical Conditions. *Bryophyt. Ecol.* **2017**, *5*, 1–25.
4. Glime, J.M. Medical Uses: Biologically Active Substances. *Bryophyt. Ecol.* **2017**, *5*, 517.
5. Sabovljević, M.S.; Sabovljević, A.D.; Ikram, N.K.K.; Peramuna, A.; Bae, H.; Simonsen, H.T. Bryophytes—an emerging source for herbal remedies and chemical production. *Plant Genet. Resour.* **2016**, *14*, 314–327.
6. Mandić, M.R.; Oalđe, M.M.; Lunić, T.M.; Sabovljević, A.D.; Sabovljević, M.S.; Gašić, U.M.; Duletić-Laušević, S.N.; Božić, B.D.; Božić Nedeljković, B.D. Chemical characterization and in vitro immunomodulatory effects of different extracts of moss *Hedwigia ciliata* (Hedw.) P. Beauv. from the Vršacke Planine Mts., Serbia. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0246810.
7. Ros, R.M.; Mazimpaka, V.; Abou-Salama, U.; Aleffi, M.; Blockeel, T.L.; Brugués, M.; Cros, R.M.; Dia, M.G.; Dirkse, G.M.; Draper, I. Mosses of the Mediterranean, an annotated checklist. *Cryptogam. Bryol.* **2013**, *34*, 99–283.
8. Pantović, J.; Veljić, M.; Grdović, S.; Sabovljević, M.S. An annotated list of moss species of Serbia. *Phytotaxa* **2021**, *479*, 207–249.
9. Yayıntaş, O.T.; Yılmaz, S.; Sökmen, M. Determination of antioxidant, antimicrobial and antitumor activity of bryophytes from Mount Ida (Canakkale, Turkey). *Indian J. Tradit. Knowl.* **2019**, *18*(2), 395–401.
10. Lunić, T.M.; Oalđe, M.M.; Mandić, M.R.; Sabovljević, A.D.; Sabovljević, M.S.; Gašić, U.M.; Duletić-Laušević, S.N.; Božić, B.D.; Božić Nedeljković, B.D. Extracts Characterization and *In Vitro* Evaluation of Potential Immunomodulatory Activities of the Moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. *Molecules* **2020**, *25*, 3343.
11. Soni, U.; Brar, S.; Gauttam, V.K. Effect of seasonal variation on secondary metabolites of medicinal plants. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2015**, *6*, 3654–3662.
12. Klavina, L.; Springe, G.; Steinberga, I.; Mezaka, A.; Ievinsh, G. Seasonal changes of chemical composition in boreonemoral moss species. *Environ. Exp. Biol.* **2018**, *16*, 9–19.
13. Karunen, P. Seasonal changes in lipids of photosynthetically active and senescent parts of *Sphagnum fuscum*. *Lindbergia* **1982**, *8*, 35–44.
14. Thakur, S.; Kapila, S. Seasonal changes in antioxidant enzymes, polyphenol oxidase enzyme, flavonoids and phenolic content in three leafy liverworts. *Lindbergia* **2017**, *40*, 39–44.
15. Batista, C.R.A.; Gomes, G.F.; Candelario-Jalil, E.; Fiebich, B.L.; De Oliveira, A.C.P. Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2293.
16. Zhang, C.; Hu, L.; Liu, D.; Huang, J.; Lin, W. Circumdatin D Exerts Neuroprotective Effects by Attenuating LPS-Induced Pro-Inflammatory Responses and Downregulating Acetylcholinesterase Activity In Vitro and In Vivo. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 760.
17. Perera-Castro, A.V.; Waterman, M.J.; Turnbull, J.D.; Ashcroft, M.B.; McKinley, E.; Watling, J.R.; Bramley-Alves, J.; Casanova-Katny, A.; Zuniga, G.; Flexas, J. It is hot in the sun: Antarctic mosses have high temperature optima for photosynthesis despite cold climate. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 1178.
18. Peters, K.; Gorzolka, K.; Bruelheide, H.; Neumann, S. Seasonal variation of secondary metabolites in nine different bryophytes. *Ecol. Evol.* **2018**, *8*, 9105–9117.
19. Kashyap, R.; Csintalan, Z.; Veres, K.; Péli, E.R. Seasonal variation of antioxidant enzymatic responses in the desiccation-tolerant bryophyte *Syntrichia ruralis* (Hedw.) Web. & Mohr. *Columella J. Agric. Environ. Sci.* **2021**, *8*, 37–50.
20. Cobourne-Duval, M.K.; Taka, E.; Mendonca, P.; Bauer, D.; Soliman, K.F. The antioxidant effects of thymoquinone in activated BV-2 murine microglial cells. *Neurochem. Res.* **2016**, *41*, 3227–3238.
21. Awada, R.; Rondeau, P.; Grès, S.; Saulnier-Blache, J.S.; d’Hellencourt, C.L.; Bourdon, E. Autotaxin protects microglial cells against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52*, 516–526.
22. Khalil, M.; Bazzi, A.; Zeineddine, D.; Jomaa, W.; Daher, A.; Awada, R. Repressive effect of *Rhus coriaria* L. fruit extracts on microglial cells-mediated inflammatory and oxidative stress responses. *J. Ethnopharmacol.* **2021**, *269*, 113748.
23. Simonian, N.; Coyle, J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1996**, *36*, 83–106.

24. Chen, L.; Deng, H.; Cui, H.; Fang, J.; Zuo, Z.; Deng, J.; Li, Y.; Wang, X.; Zhao, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **2018**, *9*, 7204.
25. Liu, Y.; Fu, Y.; Zhang, Y.; Liu, F.; Rose, G.M.; He, X.; Yi, X.; Ren, R.; Li, Y.; Zhang, Y. Butein attenuates the cytotoxic effects of LPS-stimulated microglia on the SH-SY5Y neuronal cell line. *Eur. J. Pharmacol.* **2020**, *868*, 172858.
26. Lin, Y.-C.; Uang, H.-W.; Lin, R.-J.; Chen, J.; Lo, Y.-C. Neuroprotective effects of glyceryl nonivamide against microglia-like cells and 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *323*, 877–887.
27. Lee, H.J.; Spandidos, D.A.; Tsatsakis, A.; Margina, D.; Izotov, B.N.; Yang, S.H. Neuroprotective effects of *Scrophularia buergeriana* extract against glutamate-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Int. J. Mol. Med.* **2019**, *43*, 2144–2152.
28. Ahmed, F.; Ghalib, R.M.; Sasikala, P.; Ahmed, K.M. Cholinesterase inhibitors from botanicals. *Pharmacogn. Rev.* **2013**, *7*, 121.
29. Carballo-Carbajal, I.; Laguna, A.; Romero-Giménez, J.; Cuadros, T.; Bové, J.; Martínez-Vicente, M.; Parent, A.; Gonzalez-Sepulveda, M.; Peñuelas, N.; Torra, A. Brain tyrosinase overexpression implicates age-dependent neuromelanin production in Parkinson's disease pathogenesis. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–19.
30. Hussain, R.; Zubair, H.; Pursell, S.; Shahab, M. Neurodegenerative diseases: Regenerative mechanisms and novel therapeutic approaches. *Brain Sci.* **2018**, *8*, 177.
31. Wiesner, J.; Kříž, Z.; Kuča, K.; Jun, D.; Koča, J. Acetylcholinesterases—the structural similarities and differences. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22*, 417–424.
32. Mann, T.; Gerwat, W.; Batzer, J.; Eggers, K.; Scherner, C.; Wenck, H.; Stüb, F.; Hearing, V.J.; Röhm, K.-H.; Kolbe, L. Inhibition of human tyrosinase requires molecular motifs distinctively different from mushroom tyrosinase. *J. Investig. Dermatol.* **2018**, *138*, 1601–1608.
33. Johnson, G.; Moore, S. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: Structure, functions and potential role in rational drug design. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 217–225.
34. Uriarte-Pueyo, I.; Calvo, M.I. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 5289–5302.
35. Taofiq, O.; González-Paramás, A.M.; Barreiro, M.F.; Ferreira, I.C. Hydroxycinnamic acids and their derivatives: Cosmeceutical significance, challenges and future perspectives, a review. *Molecules* **2017**, *22*, 281.
36. Boo, Y.C. p-Coumaric acid as an active ingredient in cosmetics: A review focusing on its antimelanogenic effects. *Antioxidants* **2019**, *8*, 275.
37. Dapkevicius, A.; Venskutonis, R.; van Beek, T.A.; Linsen, J.P. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *77*, 140–146.
38. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
39. Auclair, C.; Voisin, E. Nitroblue tetrazolium reduction. In *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*; 1985; Volume 123, CRC Press, Boca Raton, Florida.
40. Griess, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt "Ueber einige Azoverbindungen". *Ber. Der Dtsch. Chem. Ges.* **1879**, *12*, 426–428.
41. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V., Jr.; Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.
42. Masuda, T.; Yamashita, D.; Takeda, Y.; Yonemori, S. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 197–201.
43. Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F.T.; de Beer, T.A.P.; Rempfer, C.; Bordoli, L. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W296–W303.
44. Biovia, D.S. *Discovery Studio, Version 21.1.0*; Dassault Systèmes: San Diego, CA, USA, 2021.
45. Webb, B.; Sali, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinform.* **2016**, *54*, 5.6.1–5.6.37.
46. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.
47. Sepsova, V.; Karasova, J.Z.; Korabecny, J.; Dolezal, R.; Zemek, F.; Bennion, B.J.; Kuca, K. Oximes: Inhibitors of human recombinant acetylcholinesterase. A structure-activity relationship (SAR) study. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 16882–16900.
48. Hanwell, M.D.; Curtis, D.E.; Lonie, D.C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G.R. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminform.* **2012**, *4*, 1–17.