



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Јовица М. Томовић**

**ИСПИТИВАЊЕ АНТИОКСИДАТИВНЕ И АНТИТУМОРСКЕ**  
**АКТИВНОСТИ ЕКСТРАКТА ТРИ ОДАБРАНЕ ВРСТЕ**  
**ЛИШАЈЕВА *CLADONIA SUBULATA*, *PLEUROSTICTA ACETABULUM***  
**И *PHYSICIA SEMIPINNATA***

**Докторска дисертација**

**Ментор: др Недељко Т. Манојловић, редовни професор**

**Крагујевац, 2019. године**

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I. Аутор</i></b>
Име и презиме: Јовица Томовић
Датум и место рођења: 20.01.1987. Пећ, Република Србија
Садашње запослење: Асистент, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
<b><i>II. Докторска дисертација</i></b>
Наслов: Испитивање антиоксидативне и антитуморске активности екстраката три одабране врсте лишажева <i>Cladonia subulata</i> , <i>Pleurosticta acetabulum</i> и <i>Physcia semipinnata</i>
Број страница: 150
Број слика: 30 слика и 25 графикана
Број библиографских података: 192
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: др Недељко Т. Манојловић, редовни професор
<b><i>III. Оцена и одбрана</i></b>
Датум пријаве теме: 07.09.2015.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-268/17 од 13.04.2016.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. Проф. др Драган Миловановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, председник; 2. Проф. др Ратомир Јелић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан; 3. Проф. др Перица Васиљевић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Експериментална биологија и биотехнологија, члан; 4. Проф. др Иванка Зелен, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан; 5. Проф. др Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан;
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: 1. Проф. др Драган Миловановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, председник; 2. Проф. др Перица Васиљевић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Експериментална биологија и биотехнологија, члан; 3. Проф. др Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан;
Датум одбране дисертације:

## САЖЕТАК

Циљ ове докторске дисертације је испитивање хемијског састава, антиоксидативне и антитуморске активности екстраката три врсте лишајева: *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*.

Испитивање хемијског састава ацетонских и метанолских екстраката обухватао је *HPLC-UV* анализу екстраката као и одређивање укупног садржаја фенола и флавоноида у екстрактима. Испитивани екстракти су показали висок садржај укупних фенола ( $21,31 \pm 1,19$  до  $73,45 \pm 0,82$  mg GA/g) и флавоноида ( $8,48 \pm 0,57$  до  $19,27 \pm 0,37$  mg RU/g). Испитивање екстраката лишајева *HPLC-UV* анализом потврђено је присуство две групе секундарних метаболита депсидона и депсида: хипопротоцетраринска киселина, фумаропротоцетраринска киселина, салазинска киселина, норстихнинска киселина, протоцетраринска киселина, евернијска киселина, атранорин, леканорна киселина и обтусинска киселина. Испитивање биолошке активности екстраката обухватало је евалуацију антиоксидативне и антитуморске активности. Антиоксидативна активност је утврђена праћењем укупног антиоксидативног капацитета, способности неутрализације DPPH радикала, способности неутралисања хидроксил радикала, редукционог потенцијала и инхибиције липидне пероксидације. Резултати испитивања *in vitro* антиоксидативне активности показују да екстракти испитиваних врста лишајева поседују значајан антиоксидативни потенцијал. Антитуморска активност екстраката лишајева процењена је коришћењем МТТ теста испитивањем вијабилности и пролиферације на ћелијама Hela S3 (аденокарцином цервикса) и LS174 (ћелије карцинома дебелог црева). Испитивани екстракти показали су антитуморску активност у различитим концентрацијама ( $IC_{50}=13,55$  до  $>200$   $\mu\text{g/ml}$ ), у зависности од екстракта и испитиване ћелијске линије.

На основу добијених резултата, може се препоставити да врсте лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* у будућности могу наћи своју потенцијалну примену у медицини, фармацеутској, прехранбеној и козметичкој индустрији, као и у развоју нових фитопрепарата.

**Кључне речи:** : Лишајеви, *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum*, *Physcia semipinnata*, фитохемијска анализа, антиоксидативна активност, антитуморска активност;

**ABSTRACT**

The aim of this doctoral thesis is to investigate the chemical composition, antioxidant and antitumor activity of the extracts of three lichen species: *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* and *Physcia semipinnata*.

Examination of the chemical composition of acetone and methanol extracts included the HPLC-UV analysis of the extracts as well as the determination of the total content of phenol and flavonoids in the extracts. The examined extracts showed a high content of total phenols ( $21.31 \pm 1.19$  to  $73.45 \pm 0.82$  mg GA/g) and flavonoids ( $8.48 \pm 0.57$  to  $19.27 \pm 0.37$  mg RU/g). Examination of extracts of lichens by HPLC-UV analysis confirmed the presence of two groups of secondary metabolites of depsidone and depside: hypoprotocetraric acid, fumaroprotocetraric acid, salazinic acid, norstictic acid, protocetraric acid, evernic acid, atranorine, lecanoric acid and obtusic acid. The study of the biological activity of extracts involved the evaluation of antioxidant and antitumor activity. The antioxidant activity was determined by monitoring the total antioxidant capacity, the ability to neutralize DPPH radicals, the ability to neutralize hydroxyl radicals, reducing potential, and inhibiting lipid peroxidation. The results of an *in vitro* antioxidative activity test show that the extracts of the tested lichen species have a significant antioxidant potential. Antitumor activity of lichen extracts was assessed using the MTT test by testing viability and proliferation of Hela S3 cells (cervix adenocarcinoma) and LS174 (colon cancer cells). The investigated extracts showed antitumor activity in different concentrations ( $IC_{50} = 13.55$  to  $> 200$   $\mu\text{g} / \text{ml}$ ), depending on the extract and the cell line examined.

On the basis of the obtained results, it can be assumed that the species of lichens of *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* and *Physcia semipinnata* can find their potential application in the medical, pharmaceutical, food and cosmetic industries, as well as in the development of new phytopharmaceuticals, in the future.

**Keywords:** Lichens, *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum*, *Physcia semipinnata*, phytochemistry, antioxidant activity, antitumor activity;

## ***Захвалница***

*Најсрдачније се захваљујем ментору проф. др Недељку Манојловићу, редовном професору Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, који ме је сртпљиво водио кроз израду дисертације преносећи ми несебично своја знања и искуства.*

*Велико хвала проф. др Перици Васиљевићу, ванредном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу на помоћи у реализацији HPLC анализе узорака и бројним стручним саветима и сугестијама.*

*Проф. др Стеву Најману, редовном професору Медицинског факултета Универзитета у Нишу, захваљујем се на помоћи приликом испитивања антитуморске активности.*

*За неизмерну подршку и велико разумевање захваљујем се својој породици, пријатељима и колегама.*

***Јовица Томовић***

**САДРЖАЈ:**

<b>1. УВОД</b> .....	5
1.1. Морфологија, анатомија и еколошке карактеристике лишајева .....	6
1.2. Значај лишајева .....	9
1.3. Употреба лишајева у традиционалној медицини .....	12
1.4. Хемијски конституенти лишајева .....	15
1.4.1. Примарни и секундарни метаболити лишајева .....	15
1.4.2. Биосинтетски путеви секундарних метаболита лишајева .....	17
1.5. Биолошка активност лишајева .....	26
1.5.1. Антиоксидативна активност .....	26
1.5.1.1. Оксидативни стрес .....	26
1.5.1.2. Феноли као антиоксидативни агенси .....	27
1.5.1.3. Антиоксидативна активност екстраката лишајева .....	29
1.5.2. Антитуморска активност .....	31
1.5.3. Остале биолошке улоге .....	33
1.6. Течна хроматографија високих могућности ( <i>HPLC</i> ) .....	35
1.7. Ултраљубичаста/видљива ( <i>UV/VIS</i> ) спектроскопија .....	36
1.8. Таксономија, дистрибуција и опис врста лишајева <i>Cladonia subulata</i> , <i>Physcia semipinnata</i> и <i>Pleurosticta acetabulum</i> .....	37
1.8.1. <i>Cladonia subulata</i> L. ....	37
1.8.2. <i>Pleurosticta acetabulum</i> L. ....	39
1.8.3. <i>Physcia semipinnata</i> L. ....	40
<b>2. ЦИЉ РАДА И ХИПОТЕЗЕ</b> .....	42
2.1. Циљеви истраживања .....	43
2.2. Хипотезе истраживања .....	43
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	45
3.1. Прикупљање и припрема биљног материјала за екстракцију .....	46
3.2. Хемикалије и реагенси .....	46
3.3. Добијање екстраката .....	46
3.4. Испитивање хемијског састава екстраката .....	47

3.4.1. UV/VIS спектрофотометријска анализа екстраката .....	47
3.4.2. Одређивање укупног фенолног садржаја .....	47
3.4.3. Одређивање укупног флавоноидног садржаја .....	48
3.4.4. HPLC ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ) анализа екстраката .....	50
3.5. Испитивање антиоксидативне активности екстраката .....	50
3.5.1. Одређивање укупног антиоксидативног капацитета .....	51
3.5.2. Одређивање неутрализације DPPH• радикала .....	52
3.5.3. Одређивање способности неутралисања OH• радикала .....	53
3.5.4. Редукциони капацитет .....	55
3.5.5. Одређивање инхибиције липидне пероксидације .....	56
3.6. Испитивање антитуморске активности екстраката .....	57
3.6.1. Телијске линије .....	57
3.6.2. Експериментални дизајн .....	58
3.6.3. МТТ тест .....	58
3.7. Статистичка обрада родатака .....	60
<b>4. РЕЗУЛТАТИ .....</b>	<b>61</b>
4.1. HPLC-UV анализа екстраката лишаја <i>Cladonia subulata</i> , <i>Pleurosticta acetabulum</i> и <i>Phycia semipinnata</i> .....	62
4.1.1. HPLC-UV анализа екстраката врсте лишаја <i>Cladonia subulata</i> .....	62
4.1.2. HPLC-UV анализа екстраката врсте лишаја <i>Pleurosticta acetabulum</i> .....	67
4.1.3. HPLC-UV анализа екстраката врсте лишаја <i>Phycia semipinnata</i> .....	73
4.2. Одређивање укупног фенолног и флавоноидног садржаја у екстрактима лишајева <i>Cladonia subulata</i> , <i>Pleurosticta acetabulum</i> и <i>Phycia semipinnata</i> .....	78
4.2.1. Укупни феноли и флавоноиди у испитиваним екстрактима врсте лишаја <i>Cladonia subulata</i> .....	79
4.2.2. Укупни феноли и флавоноиди у испитиваним екстрактима лишаја <i>Pleurosticta acetabulum</i> .....	80
4.2.3. Укупни феноли и флавоноиди у испитиваним екстрактима лишаја <i>Phycia semipinnata</i> .....	81
4.3. Антиоксидативне активности екстраката <i>Cladonia subulata</i> , <i>Pleurosticta acetabulum</i> и <i>Phycia semipinnata</i> .....	82
4.3.1. Укупан антиоксидативни капацитет испитиваних екстраката .....	82

4.3.2. Одређивање способности неутралисања DPPH <sup>•</sup> радикала испитиваних екстраката.....	85
4.3.3. Одређивање способности неутралисања OH <sup>•</sup> радикала испитиваних екстраката .....	86
4.3.4. Редукциони капацитет испитиваних екстраката .....	88
4.3.5. Одређивање инхибиције липидне пероксидације испитиваних екстраката .....	93
4.4. Антитуморска активност екстраката <i>Cladonia subulata</i> , <i>Pleurosticta acetabulum</i> и <i>Physcia semipinnata</i> .....	96
4.4.1. Испитивање антитуморске активности екстраката на Hela S3 ћелије .....	96
4.4.2. Испитивање антитуморске активности екстраката на LS174 ћелије.....	104
4.5. Статистичка обрада података.....	108
4.5.1. Једнофакторска анализа варијансе (АНОВА) укупних фенола, флавоноида, антиоксидативне и антитуморске активности .....	108
4.5.2. <i>Tukey's</i> HSD тестирање укупних фенола, флавоноида, антиоксидативне и антитуморске активности .....	110
<b>5. Дискусија .....</b>	<b>121</b>
<b>6. Закључак.....</b>	<b>131</b>
<b>7. Литература.....</b>	<b>135</b>
<b>8. Биографија.....</b>	<b>151</b>
<b>9. Библиографија .....</b>	<b>152</b>
<b>10. Прилози.....</b>	<b>153</b>



# **1. УВОД**

Повезаност човека и биљних организама датира још од давнина. Вештина лечења биљем развијала се код свих народа и сачувала се као традиционална или народна терапија, популарно названа народна медицина, све до данас. Човек је биљне организме користио прво у исхрани, а касније и у лечењу. Циљ научних истраживања из области хемије, биохемије и медицине одувек је био побољшање здравља људи. Испитивање хемијских, биолошких и фармаколошких особина природних производа коришћених у традиционалној медицини широм света добијени су многи терапеутски агенси који се данас користе у савременој медицини (1). Велики број једињења је изолован из биљних организама, структура им је хемијски детерминисана, а фармаколошко деловање потврђено. Изолована једињења су имала исту, или много јачу активност од екстраката који су коришћени, што је отворило пут у коришћењу чистих једињења за третман различитих болести. Улажу се велика средства у синтезу нових лекова, али и у изоловање молекула из природних ресурса и њихов развој у лекове (2).

### 1.1. Морфологија, анатомија и еколошке карактеристике лишајева

Лишајеви (лат. *Lichenes*) су заједница два организма: гљиве (микобионт) и фотосинтетског партнера зелене алге или цијанобактерије (фотобионт) здружени у мутуалистичку симбиотску заједницу. Лишајеви се сматрају лихенизованим гљивама. Микобионт представљају гљиве из подраздела *Ascomycotina* (98%) а остале гљиве припадају подразделима *Basidiomycotina* и *Deuteromycotina*. Око 21% свих гљива су у стању да делују као микобионт односно да учествују у формирању лишајева (3). Фотобионт чине око само 40 родова из подраздела *Chlorophyta* и *Cyanophyta* (25 алге и 15 цијанобактерија) (4). Најчешћи родови који чине фотобионт су *Trebauxia*, *Trentepohlia* и *Nostoc*. Родови *Trebauxia* и *Trentepohlia* су еукариотске структуре и припадају зеленим алгама а род *Nostoc* припада прокариотској цијанобактерији (5).

У прошлости лишајеви су сматрани биљкама, каснијим испитивањем издвојени су у посебан ентитет и посматрају се као индивидуе. У току своје дуге еволуције су удружили интересе две удаљене групе организама (гљива и алги) и развили адаптилност. Симбиотски односи у лишају су веома интензивни тако да се појединачни утицаји и особине алги и гљива губе. Оба члана у овој симбиози имају користи и међусобно се допуњују. Квантитативно преовладава гљива (микобионт) од које зависи облик и изглед

лишаја (6). Микобионт има две главне улоге у симбиози лишајева: штити фотобионт од сунчеве светлости и исушивања снабдевајући алгу водом и има улогу у снабдевању тј. апсорпцији минералних материја са подлоге (земља, дрвеће, стена) на којим се налази лишај. Фотобионт (алга или цијанобактерија) има улогу у обављању фотосинтезе, синтетише органске хранљиве материје из угљен диоксида и у случају цијанобактерије може да синтетише азотна органска једињења из гаса азота. Тако, кроз партнерство фотобионт је заштићен и има могућност да опстане у срединама где не би могао да расте и развија се самостално. Гљиве за узврат добију шећере и у неким случајевима и органски азот од фотосинтетског партнера омогућавајући им да расту у срединама које имају дефицит органских хранљивих материја (7, 8).

Вегетативно тело лишаја назива се талус. Талус лишајева има неограничен раст али расте веома споро. Због спорог раста, према величини талуса могуће је одредити старост лишајева. У зависности од врсте он може бити различито обојен: мрко, зелено, наранџасто, жуто па до скоро потпуно црно. Боја зависи од присуства специфичних пигмената, соли и многобројних киселина којих у лишајевима има око 230. Талус лишајева се састоји од слојева горње и доње коре, слој алге и медула. Слојеви се разликују у дебљини и различито су развијени од врсте до врсте лишаја. Хифе гљива чине највећи део талуса, док ћелије фотобионата чине нешто око 7 % целокупног волумена.

Морфолошки разликујемо три типа талуса:

1. Кораст (крустозан)
2. Листаст (фолиозан)
3. Жбунаст (фруктозан)
4. И низ прелазних форми

Кораст лишај: талус је целом својом површином чврсто причвршћен за подлогу, због чега је тешко одвојити од подлоге а да се не оштети. Око 80% лишајева има кораст талус. Кораст тип талуса имају врсте лишајева: *Ochrolechia parella*, *Rhizocarpon geographicum*, *Verucaria marmorea* и тд.

Листаст лишај: талус је лабаво причвршћен за подлогу (лакше се одвајају а да се при томе не оштете) и то само преко појединачних или груписаних хифа у снопиће. Талус је режњевит у облику листа. Листаст талус је сложенији од корастог. Примери лишајева који имају листаст тип талуса су: *Parmelia sulcata*, *Peltigera sp.* *Collema sp.* и тд.

Жбунаст лишај: има жбунаст, нитасти или брадолики талус који је разгранат, усправан или висећи у односу на подлогу. За подлогу је лабаво причвршћен на месту које се зове гомфа те их је лако одвојити од подлоге. Морфолошки је најсложнији тип талуса. Примери су: *Usnea* sp., *Cladonia stellaris*, *Alectoria* sp., и тд.

Постоје и лишајеви са двојним типом талуса. Код којих се на подлози развија примарни листаст тип талуса, а изнад подлоге секундарни тип талуса. Лишајеви са мешовитим типом талуса имају радијалну грађу.

На пресеку талуса лишаја разликујемо два основна типа грађе хомеомерну и хетеромерну. Хомеомерни талус лишаја карактерише да су ћелије фотобионта равномерно распоређене унутар целог талуса. Хетеромерни или слојевити талус лишајева се састоји од горњег кортекса (коре) у којем се налазе пигменти који штите лишај од *UV* зрачења, испод њега се налази слој фотобионта, затим следи срж (медула) који чине сплет хифа микобионта. С доње стране талуса се налазе ризоиди у облику танких нити који се користе за причвршћивање за подлогу.

Лишајеви се размножавају вегетативним путем: фрагментацијом талуса, соредијама, изидијама, цефалодијама (секундарни фотобионт који врши фиксацију азота). Најједноставније размножавање је размножавање деловима талуса. Када је талус сув, он је и крут, и било каквим механичким деловањем одламају се и велики и мали делови талуса. Они се разносе ветром и ако део талуса слети на погодну подлогу, ниче нови лишај. Алге у саставу лишаја се размножавају: ћелијском деобом и апланоспорама. Гљиве у саставу лишаја се размножавају: конидијама, аскоспорама (перитеције, апотеције) и базидиоспорама (8, 9).

Лишајеви су група организама која су веома бројна и заступљена а веома мало позната. Лишајеви, у научном свету, третирају као посебна филогенетичка група укупног биодиверзитета планете, а питања њихове номенклатуре и таксономије су регулисана Међународним кодексом ботаничке номенклатуре. Таксономски лишајеви су подељени у најмање десет реда, 45 фамилија а које заједно према разливитим ауторима има око 18 500 врста. Имена врста лишајева су имена микобионта (10, 11). Распрострањени су широм света на различитим стаништима и углавном расту на високопланинским подручјима, у шумама, воћнацима, на пашњацима заједно са маховином, еруптивним

стенама, земљишту, кори дрвећа, у тропским пределима и на листовима као и подлогама као што су бетон, стакло, пластика, цигле, гуме, метал, кожа, кости. Лако настањују сваку површину ако има довољно светлости и влаге. Једна од најзначајнијих особина лишаја јесте способност рехидратације. Када лишај изгуби пуно воде он прелази у стање анабиозе, односно, привидне обамрлости. Талус је тада сув, крт и лако ломљив, али је довољна је слаба киша да се животне функције нормализују (12). Интеракцијом симбиотских партнера омогућавају лишајевима да опстану на необичним стаништима. Лишајеви могу да преживе екстремне временске услове, могу се адаптирати на екстремне температуре, сушу, поплаве, салинитет, високе концентрације штетних материја из ваздуха и ниске количине хранљивих материја. Упркос могућности лишајева да се адаптирају на екстремне услове, већина лишајева су осетљиви на промене еколошких услова и тешко могу да расту у не природним стаништима по њих (13). Лишаји живе јако дуго па се тако за неке артичке јединке сматра да су старе и преко хиљаду година. У хладним областима су лишајеви најбројнији и заузимају читаво пространства а разноврсност је највећа у умереним областима. На крајњем северу, представљају главне вишећелијске организме јер више биљке не могу да се одрже, самим тим представљају главне покриваче тла (14).

## 1.2. Значај лишајева

Лишајеви су одиграли једну од најзначајнијих улога у обликовању геобиосфере, а нарочито у формирању вегетације. У природном систему лишајеви образују иницијалне фазе у развоју заједница (фитоценоза) које су означене као *Lichenetea* и чине основу за даљи процес сингенезе ка сложенијим заједницама. Када лишајеви одумру, хранљиве материје које настају стварају подлогу за нове организме те се стога често називају „пионирима вегетације“. Пионирске су врсте у насељавању голих стена и земљишта, које мењају, обогаћују их хумусом чиме стварају подлогу за насељавање биљака чије су потребе у исхрани веће него првобитних насељених лишајева (15, 16).

Лишајеви су веома осетљиви на загађење ваздуха. Почетком 19 века је доказано независним анализама у Паризу, Минхену, Лондону да лишајеви нестају из урбаних делова града. Почетком 20. века феномен града према лишајевима био је потврђен на целом Европском континенту и приписан утицају угљене прашине који испуштају већина

домова као и велики део индустрије. Фински научник William Nylander приметио је 1866. године осиромашење лишајске флоре, а 1896. године нестанак лишајева са стабала у Луксембуршком парку у Паризу. Закључио је да је узрок нестанка лишајева штетне материје у ваздуху због бројних ложионица на угаљ, које су испуштале велике количине штетних гасова у атмосфери. Нешто мало касније сумпор диоксид је утврђен као главни фитотоксичан гас (17, 18). Висока осетљивост лишајева према процени квалитета ваздуха је последица њене биологије. Повећана концентрација штетних материја у лишајевима може довести до нарушавања симбиозе између фотобионта и микобонта и одумирања лишаја. Тако, присуство лишаја у неком пределу говори о чистоћи његовог ваздуха. Различите врсте лишајева су различито осетљиве на одређене загађиваче ваздуха. На тај начин осетљивије врсте лишајева могу се користити за праћење стања у екосистемима где су присутне одређени загађивачи ваздуха (19). На сличан начин лишајеви се могу користити и у мониторингу здравствених проблема код људи (20). Лишајеви као биониндикатори загађености ваздуха најбоље су се показали за детекцију сумпор диоксида (SO<sub>2</sub>). На основу промена у лишајевима успостављена је скала од 1 до 10 и може се користити за праћење нивоа сумпор диоксида. Промене до којих долази приликом повећане концентрације штетних материја у ваздуху и њихове интоксикације у лишају су: деградација хлорофила, промене у морфологији талуса, промене у размножавању, поремећаје у биосинтетским путевима, промене у фотосинтези и у структури самих лишајних заједница. Широки спектар варијабилних одговора се користи за мерење физиолошког одговора лишајева како у *in situ* условима тако и у лабораторијским испитивањима где се концентрације сумпор диоксида контролишу. У последњих неколико година нивои сумпор диоксида су смањени, побољшањем контроле емисије или ефикаснијим стратегијама дисперзије гаса што је довело да у областима у којима су станишта лишајева нестала доживела поновну реколонизацију заједнице лишајева (21-22). Помоћу лишајева могу се открити и друге штетне материје присутне у атмосфери, нпр. радиоактивни изотопи; тешки метали: Hg, Cd, Cr, Pb, Zn, Fe (23-24).

Осим поменуте биоиндикаторске улоге примена лишајева је разноврсна посебно у области медицине (лекови и дерматолошки препарати), прехранбене и хемијске индустрије (боје). С обзиром, да могу да се развијају на земљиштима сиромашним минералним материјама (тундре на северу) на којима биљке не могу да расту, могу да

представљају храну животињама тих предела. Врсте лишајева као што *Cetraria islandica* или *Lecanora esculenta*, богате су скробом и користе се за прављење хлеба и других јела, односно за исхрану људи.

Многи лишајеви се користе у цвећарству за прављење венаца као на пример *Cladonia alpestris* која живи у северној Европи (25, 26).

Неке врсте какве су *Evernia prunastri* и *Pseudevernia furfuracea* садрже ароматичне материје па се користе за прављење парфема. Ови лишајеви се могу наћи у великим количинама у: Јужној Француској, Мароку и деловима бивше Југославије. Направи се етанолски екстракт ових лишајева који садржи мешавину етарских уља и депсида. Екстракт лишајева може да чини од 1-12% готовог парфема (27).

Врсте попут *Dictionema sp.*, *Parmelia paraguariensi*, *Letharia vulpina* и друге су се често мешале са дуваном (због свог наркотичког дејства), и користиле као отрови или халуциногени у разним ритуалима (25, 26).

Лишајеви су се коритили као средства за бојење још у временима древне Грчке али су од малог економског значаја данас. Историјски *Roccella montagnei* фруктиозни лишај који се налази на каменој површини, користио се за добијање црвене и љубичасте боје у региону Медитерана. Такође и врсте лишајева као што су *Ochrolechia tartarea*, *O. androgyna* и *Parmotrema tinctorum* обезбеђују црвену и љубичасту боју. Једноставни пара-депсиди еритрин (*Roccella montagnei*) и леканорна киселина (*Ochrolechia tartarea* и *Parmotrema tinctorum*) су одговорни за постојање ових боја. Лишајеви су некада кориштени и у текстилној индустрији за бојење тканина. Боја којом се импрегнира познати лакмус-папир, некада широко кориштен индикатор у аналитичкој хемији, добија се из талуса лишајева *Roccella fucoides* и *Roccella tinctoria* (25, 28).

У северној Европи је вучји лишај, *Letharia vulpina*, кориштен у мамцима за тровање вукова и лисица. Токсични метаболит представља дериват вулпинске киселине. Деривати секалоничне киселине су такође високо отровне супстанце као и вулпинска киселина припадају микотоксинима и могу бити отровни током испаше разних биљоједа. Контактни дерматитис, тешки кожни осип добро су познати шумарским радницима у Северној Америци, и чине део синдрома који је познат као "Екцем Дрвосече". Ове промене се

јављају као последица алергијског одговора излагањем разним супстанцама лишајева. Супстанце лишајева које су одговорне за ове реакције су: уснинска киселина, евернијска киселина, фумарпротоцетраринска киселина, стиктична киселина и атранорин (7, 25) .

### 1.3. Употреба лишајева у традиционалној медицини

Лишајеви се од давнина користе у традиционалној медицини у културама широм света. Допринос традиционалне употребе је управо тај да лишајеви могу данас да се користе у медицинске сврхе и да се истражује њихово дејство. Лишајеви су се често користили за обрађивање рана као дезинфекционо средство и средство за заустављање крварења. Поред тога користили су се и за кожне инфекције, чиреве и лечење рана у устима. Лишајеви су се често припремали у виду декокта и користили за поремећаје респираторног и дигестивног система. Многе друге употребе лишајева односе се на акушерство или лечење гинеколошких проблема. Ово може бити повезано са коришћењем лишајева у лечењу полно преносивих инфекција и обољења уринарног система. Међу ређе употребе спада употреба у офтамолшке сврхе и употреба у мешавинама за пушење. Већина традиционалних медицинских употреба лишајева повезана је са њиховим секундарним метаболитима, од којих су многи данас доказани као физиолошки активни да делују као антибиотици. Међутим, неке од традиционалних употреба лишајева ослањају се и на особине угљених хидрата лишајева. Посебно, лишајеви из породице *Parmeliaceae* који садрже  $\beta$  (1-3) и (1-4) везане D-глюкане, који имају имају невероватну способност да апсорбују воду и формирају гел. Многе од традиционалних употреба лишаја захтевају припрему кувањем на високој температури при чему долази до стварања слузи које су корисне за болести респираторног или дигестивног тракта (29, 30, 31, 32). Највише коришћене врсте лишајева у Европи које имају лековита својства су: *Cetraria islandica*, *Cladonia pyxidata*, *Peltigera canina*, *Peltigera aphthosa*, *Usnea spp.*, *Lobaria pulmonaria*, *Xanthoria parietina* и *Evernia prunastri*.



Табела 1. Употреба лишајева у традиционалним медицинама широм света

Врста лишајева	Употреба у традиционалној медицини
<i>Cladina spp.</i>	Користи се у виду декокта за лечење дијареје (33).
<i>Cladina arbuscula</i>	Користи се за вртоглавицу, хипертензију, плућну туберкулозу, грозницу и инфекције коже услед спољашњих повреда (34).
<i>Cladonia rangiferina</i>	Користи се у виду декокта код прехладе, артритиса, грознице, жутице, затвора, конвулзије, кашља и туберкулозе (31,35).
<i>Cladonia stellaris</i>	Користи се за хипертензију, главобоље, инфекције ока и носа и код менструалних поремећаја (36).
<i>Cladonia coccifera</i>	Користи се у виду декокта за грозницу и велики кашаљ код деце, попут витамин Ц (37) .
<i>Cladonia pyxidata</i>	Џењени народни лек против великог кашља (37).
<i>Lecanora muralis</i>	Користе се у виду чаја за лечење колика (38).
<i>Rhizoplaca chrysoleuca</i>	Користи се за лечење туберкулозе, инфекције коже и за ублажавање болова (спољашња употреба и орално) (34).
<i>Alectoria sarmentosa</i>	Каористи се у виду чаја, за астму и гастритис (39).
<i>Usnea spp.</i>	Користи се за стомачне проблеме, маларију, тифус, бол у леђима, грозницу, губитак апетита, против перути, хидратацију коже, против мучнине, дијареје, великог кашља и малих богиња (40, 41).
<i>Usnea barbata</i>	Користи се за лечење болести утеруса (42)
<i>Usnea filipendula</i>	Користи се у виду праха за заостање рана и лечења инфекција (42).
<i>Cetraria islandica</i>	Користи се највише за ублажавање проблема са плућима и дигестивним трактом, астме хроничне конгестије слабог варења дизентерије, као лаксатив, камен у бубрегу, едем, болести бешике, упале слузокоже ждрела, диспепсије, губитак апетита, лечење канцера. (34, 37, 39).
<i>Flavocetraria cucullata</i>	Користи се у виду чаја за лечења симптома астме (39).

<i>Parmelia saxatilis</i>	Користи се за уклањање брадавица, чирева код деце, код хроничног дерматитиса (42).
<i>Parmelia sulcata</i>	Користи се против главобоље (37).
<i>Parmelia nepalense</i>	Користи се за лечење зубобоље и болова у грлу (42).
<i>Evernia prunastri</i>	Користи се у облику масти за акне и код грознице и плућних тегоба (31).
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	Користи се за екцеме, хемороиде, ране, астму, конгестије, респираторне поремећаје, делује као адстригент. (39,43).
<i>Letharia vulpine</i>	Користи се за лечење стомачних тегоба, чирева, осипа, екцема, брадавица и артритиса. Користи се као отров за вукове и лисице (44).
<i>Hypogymnia physodes</i>	Код опстипација (45).
<i>Ramalina bourgeana</i>	Користи се као диуретик и за разбијање камена (42).
<i>Lobaria pulmonaria</i>	Користи као лек за плућне болести, астму, екцема, јачање корена косе, као контрацептивно средство и делује као антисептик (34,37).
<i>Peltigera aphthosa</i>	Користи се за побољшање пробаве, за лечења чирева на ногама, опекотине и туберкулозе (34).
<i>Peltigera canina</i>	Дуго се ова врста лишајева користила против беснила (42).
<i>Xanthoria parietina</i>	Користи се као лек против жутице (37).
<i>Lasallia papulosa</i>	Код уринарних инфекција (46).
<i>Thamnolia vermicularis</i>	Користи се као антисептик. Код упала, сунчанице, иритације ока, кашља и упала грла (34,42).
<i>Umbilicaria spp.</i>	Користи се као декокт за лечење туберкулозе и крварења (33).

Током 19. века употреба ових лишајева углавном је напуштена. Ипак, у традиционалним културама као што су индијска, кинеска и индијанска, различите врсте лишајева и даље се користе у медицинске сврхе и то најчешће као експекторанси. Врсте лишајева *Usnea* су најчешће кориштене. *Cetraria islandica* представља врсту лишајева која се показала ефикасна за лечење болести плућа и катара. *Cetraria islandica* се употребљава за прочишћавање дисајних путева, а примењује се у облику чаја, сирупа и пастила за

ублажавање кашља. Код исландског лишаја терапеутски учинак има протолихенстеаринска киселина. *Peltigera canina* се једе у Индији и користи као лек за болести јетре (7).

#### 1.4. Хемијски конституенти лишајева

##### 1.4.1. Примарни и секундарни метаболити лишајева

Специфични услови у којима живе лишајеви су разлог за синтезу многих метаболита који пружају добру заштиту од разних негативних физичких и биолошких утицаја. Постоје две главне групе састојака (метаболита) лишајева: примарни метаболити (интраћелијски) и секундарни метаболити (ектрацелуларни продукти). Заједнички примарни метаболити који се јављају код лишајева укључују: протеине, аминокиселине, полиоле, каротеноиде, полисахариде и витамине који се налазе у ћелијским зидовима и протопластима и често су растворљиви у води и могу се екстраховати водом на температури кључања (47). Неке од ових продуката синтетишу гљиве, а неке алге. Пошто је талус лишајева сложене структуре не може се са сигурношћу утврдити биосинтеза одређеног једињења. Већина примарних метаболита изолованих из лишајева је неспецифична и јавља се самостално у гљивама, алгама и вишим зеленим биљним организмима (14). Слободне аминокиселине које се налазе у лишајевима сличне су присуству аминокиселина које се налазе у биљкама. Количина азотних једињења је између 1,6 и 11,4 % суве тежине талуса лишаја. Каротеноиди су метаболички производи оба симбиотска партнера и њихова количина варира од 1,5 до 24 mg/g суве тежине талуса лишајева. Од каротеноида у талусу лишајева идентификовани су:  $\beta$ -каратоен, епоксид,  $\alpha$ -криптоксатин, лутеин и астаксатин. Полисахариди и остала једињења присутна су у лишајевима у количини од 3-5 % тежине сувог талуса. Од витамина лишајеви садрже аскорбинску киселину, биотин,  $\alpha$ -токоферол, никотинску киселину, пантотенску киселину, рибофлавин, тиамин и фолну киселину. Витамини су идентификовани као метаболички производи које биосинтетишу алге (фотобионт) док микобионт односно гљива као део симбиотске структуре лишајева представља веома сиромашан извор ове групе метаболита (48). Угљеник у лишајевима се добија из биосинтетског пута од алги лишајева. *Mosbach* је 1969. године је сумирао целокупан метаболизам угљеника који учествује у фотосинтези фотобионта где долази до транспорта угљених хидрата до гљива,

метаболизма угљених хидрата и накнадне биосинтезе секундарних метаболита лишајева. Врсте угљеног хидрата који се ослобађа од стране алги и допрема до гљиве одређује фотобионт, док у лишајевима који садрже цијанобактерију угљени хидрат који се ослобађа од алги и доводи до гљиве је глукоза. У лишајевима који садрже зелену алгу угљени хидрати који се ослобађају и преносе до гљива су полиоли: сорбитол и еритрол (48, 49).

Већина органских супстанци изолованих из лишајева представљају секундарне метаболите који су изоловани из дела гљиве који се налазе на површини хифа више него у ћелијском зиду. Ова једињења су углавном нерастворна у води и екстрахују се органским растварачима. Лишајеви синтетишу велики број секундарних метаболита и већина тих метаболита су својствени само лишајевима (50). То су углавном моноароматици, депсиди, депсидони, пулвинати, дибензофурани, антрахинони и ксантони (51). Хемијска структура ових једињења је слична па је њихова идентификација веома тешка (52). Ове хемијске различите (алифатичне и ароматичне) супстанце лишајева имају релативно ниске молекулске масе. Они су произведени од стране микобионта и сакупљају се у кортексу (као што су атранорин, париетин, уснинска киселина) или у медули (као што фисодинска киселина, фисодалинска киселина, протоцетраринска киселина) као ситни екстрацелуларни кристали на спољним површинама хифа. Фотобионт такође може имати утицаја на секундарни метаболизам (53).

До данас је идентификовано око 1050 секундарних метаболита лишајева. Лишајеви могу да садрже значајне количине секундарних метаболита, обично између 0.1-10% суве масе, али понекад и до 30%. Дистрибуција секундарних метаболита је углавном специфична за одређене биљне врсте и стога се користи у таксономији и систематизацији лишајева. Сама синтеза секундарних метаболита је генетички контролисана и повезана је са морфологијом и географијом појединачне врсте лишајева (54, 55).

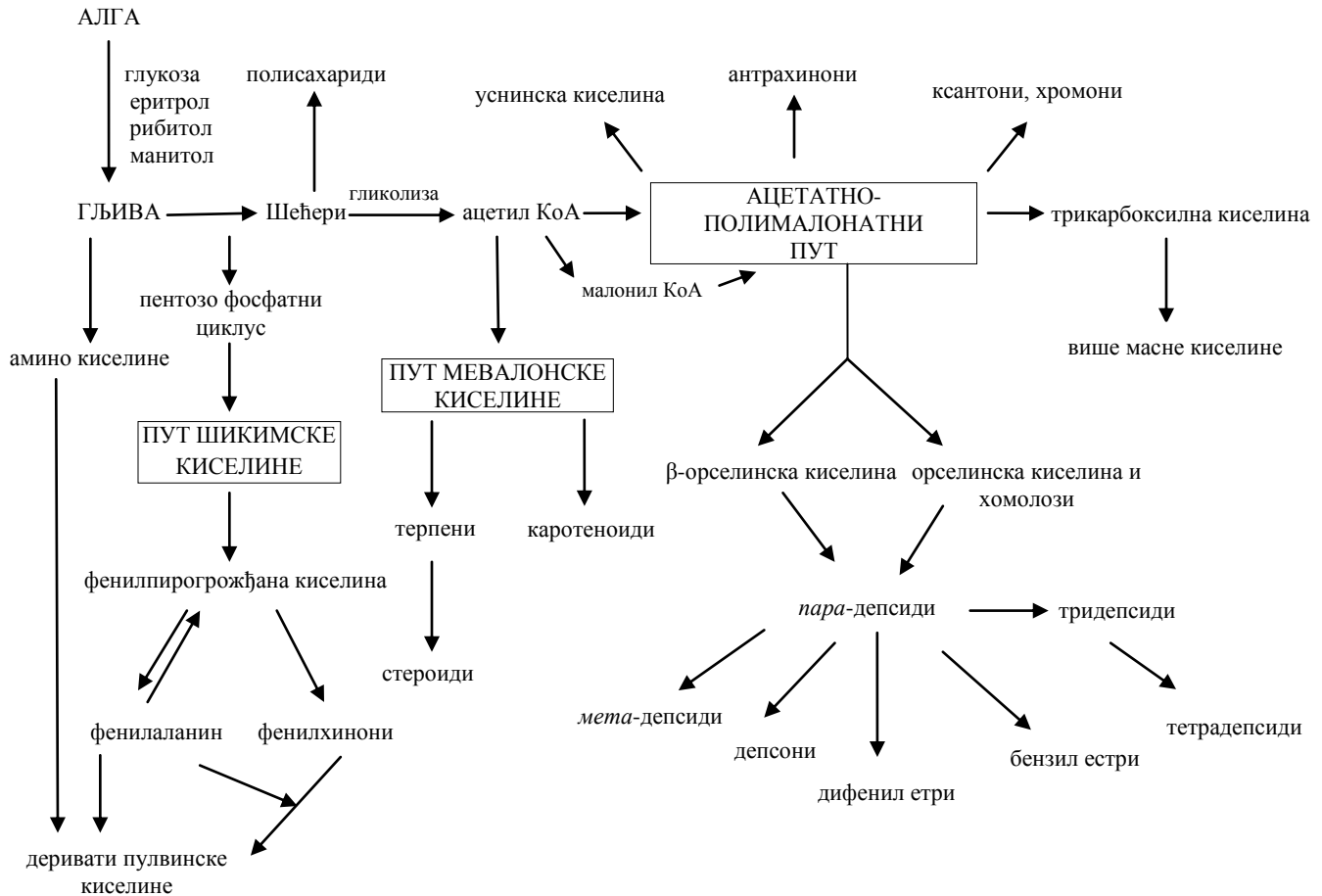
Сваки микобионт лишајева преферира посебне услове развоја почев од подлоге, рН средине, температуре, светлости дајући на тај начин специфичне секундарне метаболите. Сличности у садржају секундарних метаболита не мора да упућује да врсте лишајева припадају истој филогенетичкој скупини. На пример *Xanthoparmelia* и *Neofuscelia* су два веома блиска рода породице *Parmeliaceae* а разликују се у присуству пигмената у горњем кортексу. Док *Xanthoparmelia* садржи кристале уснинске киселине, род *Neofuscelia* се

одликује присуство меланина као кортикалног пигмента. Штавише други припадници породице *Parmeliaceae* садрже искључиво атранорин у кортексу. Секундарни метаболити нису апсолутно неопходни за раст и преживљавање лишајева. Међутим, они су корисни при заштити талуса од различитих биљоједа, патогена и *UV* зрачења. Синтеза секундарних метаболита је сложена и под утицајем је различитих фактора средине укључујући светлост, *UV* зрачење, надморску висину и температурне промене. Ови резултати су засновани на лабораторијским експериментима и научним студијама (56, 57).

#### 1.4.2. Биосинтетски путеви секундарних метаболита лишајева

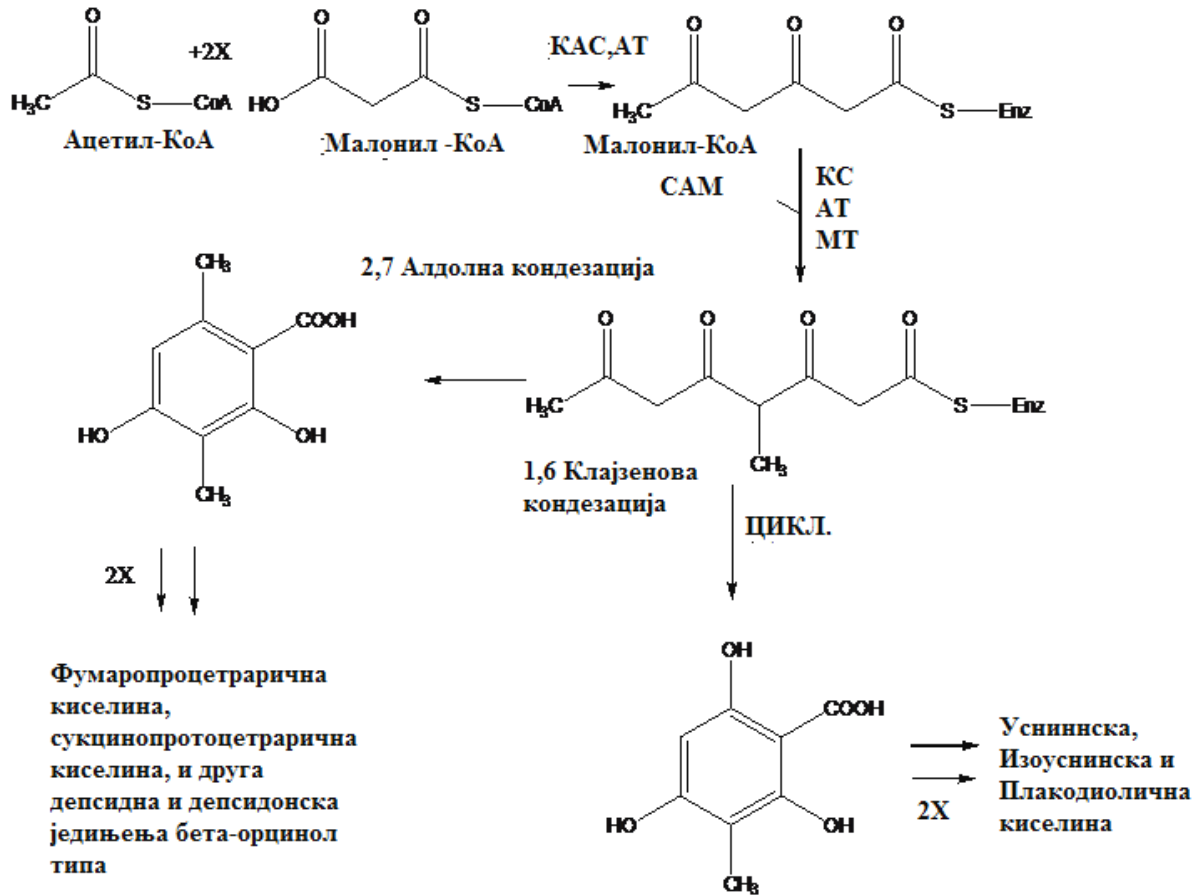
Карактеристика метаболизма секундарних биомолекула је врло висока сложеност биосинтетских путева, који су више-фазни и укључују велики број ензима, мултиензимских система, регулатора ових ензима и њихову ћелијску организацију (58). Главни биосинтетски путеви секундарних метаболита лишајева су:

1. Ацетатно-полималонатни пут, којим настају  
*Алифатичне киселине, естри и слични деривати*  
*Ароматичне компоненте*
  - Феноли
  - а) Депсиди, тридепсиди и бензил естри
  - б) Депсидони и дифенил етри,
  - в) Депсони,
  - г) Дибензофурани, уснинска киселина и деривати
    - Антрахинони
    - Хромони
    - Нафтахинони
    - Ксантони
2. Пут мевалонске киселине, којим настају  
Ди-, Три-, Сесквитерпени  
Стероди
3. Пут шикимске киселине, којим настају  
Терфенилхинони  
Деривати пулвинске киселине [58].



**Слика 1.** Шематски приказ биосинтетских путева којим се синтетишу главне групе секундарних метаболита лишајева

Већина секундарних метаболита присутних у лишајевима добија се из ацетатно-полималонатног биосинтетског пута али се могу добити и метаболичким путевима преко шикимске киселине и мевалонске киселине. Један од занимљивијих догађаја последњих година истраживања биосинтезе метаболита лишајева је признавање кључне улоге *para* депсида као потенцијалног прекурсора (или биосинтетског интермедијера) *meta*-депсида, депсона, дифенил етра, депсидона и дибензофурана. Из ацетатно-полималонатног биосинтетског пута добијају се ароматична једињења која су веома заступљена. Она настају везивањем две или три фенолне компоненте орцинола или β-орцинола у виду естарске, етарске или C-C везе. Највећи број депсида, депсидона, уснинске киселине и дибензофурана настају овим механизмом који је својствен само лишајевма.



Слика 2. Биосинтеза депсидона и уснинске киселине

Друга ароматична једињења ацетатно-полималонатног биосинтетског пута као што су хромони, ксантони и антрахинони формирају се унутрашњом циклизацијом, савијањем једног поликетидног ланца и често су та ароматична једињења идентична метаболитима која се налазе и у нелихенозованим гљивама и вишим биљкама (58, 59).

Најчешће јединице фенолних киселина које се добијају ацетатно-полималонатним путем, а које су одговорне за формирање карактеристичних супстанци у одређеним лишајевима, деле се у два типа: јединице орцинол типа и  $\beta$ -орцинол типа. Једињења формирана од ова два типа јединица су слична на много начина, али разлике у њиховој структури и дистрибуцији међу лишајевима указују на то да тенденција ка одвојеном разматрању и проучавању ових јединица има биосинтетско оправдање.

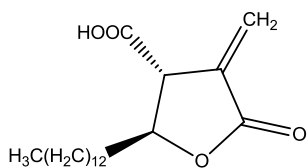
Што се тиче орцинол серија, фенолне киселине које се добијају ацетатно-полималонатним путем у лишајевима најчешће настају естерификацијом две или три

сличне јединице. На пример карбоксилна киселина једне јединице је повезана преко хидрокси групе у *пара* положају у односу на карбоксилну киселину друге јединице. Таква врста естерификације доводи до настанка *пара*-депсида. Естерификација још једне јединице доводи до настанка тридепсида. Ако се у естру долази до повезивања у мета положају у односу на карбоксилну групу друге јединице настаје *мета*-депсид. Најпознатија једињења која припадају *пара*-депсидима су: евернијска киселина, леканорна киселина, перлатолична киселина, еритрин, тумидулин и тд. Најпознатији *мета*-депсиди су: секаикаична киселина, хомосекаикаична киселина, рамалинолинска киселина, тамнолична киселина и тд. Тридепсиди обухватају: гирофорну киселину, умбиликаринску киселину и тенуиорин. Најпознатији орцинол типа депсидона има  $\alpha$  и  $\beta$  кето групу са стране ланца првог прстена. После стварања естарске везе долази до лаког формирања енол лактона јер ова група има јак ефекат између два прстена. Оксидативна циклизација депсида до депсидона најчешће се врши спајањем преко хидрокси групе у положају 2 прстена А и положаја 5 прстена Б. Најпознатији депсидони су: фисодинска киселина, лобаринска киселина, 4-О-метилфисодинска киселина и тд. Једињења орцинол типа чини низ блиско везаних супстанци у којим су промене у дужини и оксидацијском стању 6 алкил супституената главни извори варијације фенолних јединица. Једињења која настају различитим комбинацијама ових јединица показују и секундарне промене које се могу приписати О-метиловању, хлоровању, декарбоксилацији и лактонизацији.

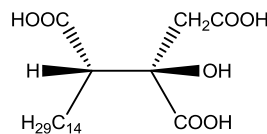
Једињења типа  $\beta$ -орцинол такође могу претрпети исте секундарне реакције али најчешће варијације настају оксидацијом C1 супституената на 3 и 6 положају јединице фенолне киселине. Променом оксидацијског стања на C1 супституенту од 16 јединица теоретски се може добити осам једињења (шест *пара*-депсида и три *мета*-депсида). Најпознатији *пара*-депсиди су атранорин, барбатична киселина, хлороатранорин, скваматична киселина и 4-О-диметилбарбатична киселина.



Алифатичне киселине

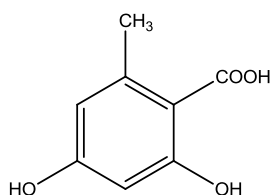


(+)-Протолихестеаринска киселина

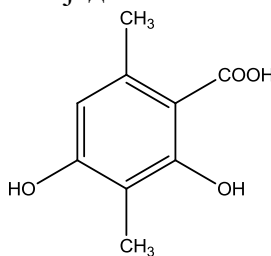


Розалинска киселина

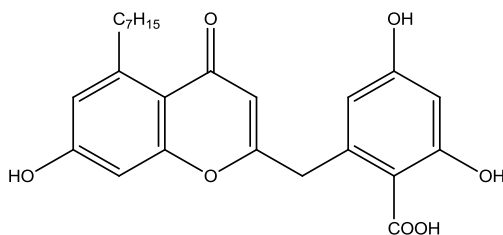
Мононуклеарна фенолна једињења



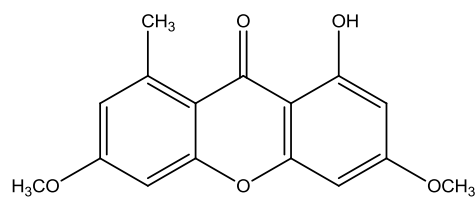
Орселинска киселина



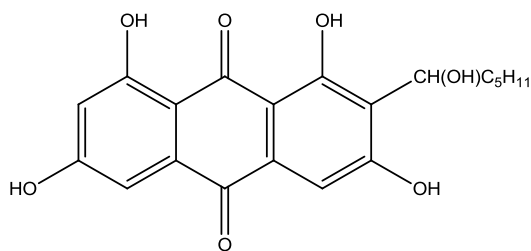
β-орселинска киселина



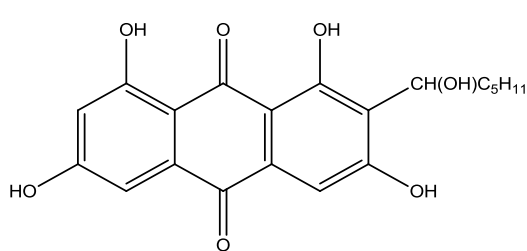
Хромон  
Сифулин



Ксантон  
Лихексантон

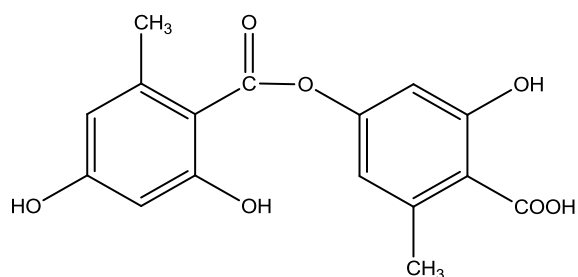


Нафтахинон  
Хемавентозин

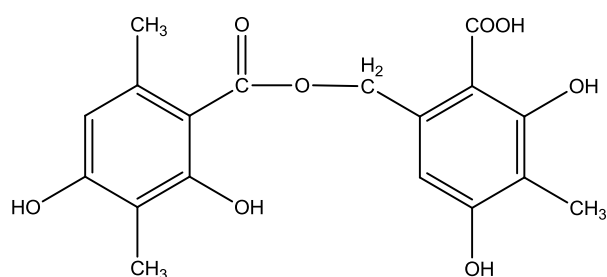


Антрахинон  
Аверитрин

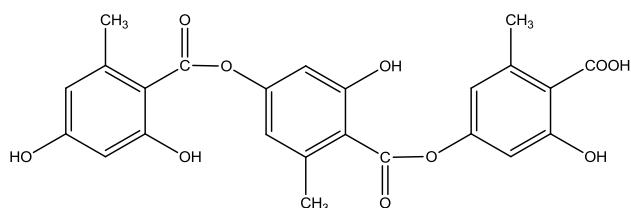
Слика 3. Структуре секундарних метаболита лишајева који настају преко ацетатно-полималонатног биосинтетског пута изведених из једног поликетидног ланца



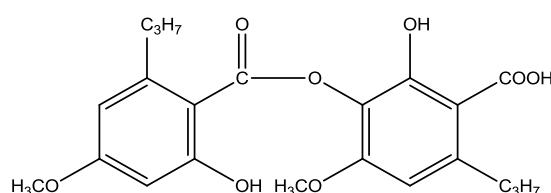
Пара-депсид  
Леканорна киселина



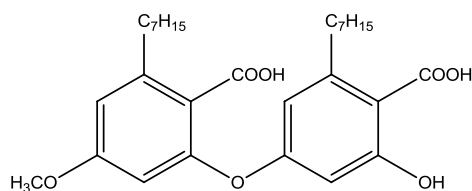
Бензил-естар  
Алекториалична киселина



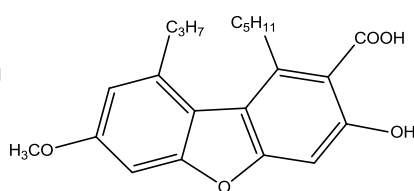
Тридепсид  
Гирофорна киселина



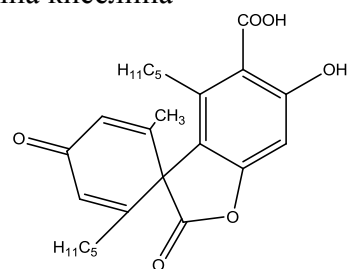
Мета-депсид  
Секикаична киселина



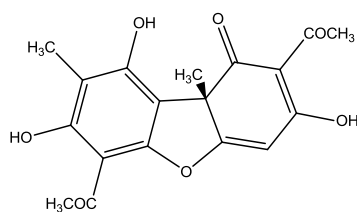
Дифенил-естар  
Микареична киселина



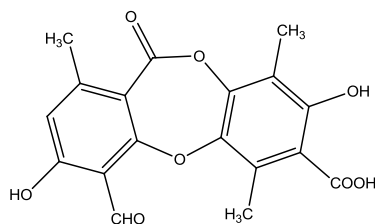
Дибензофуран  
Дидимска киселина



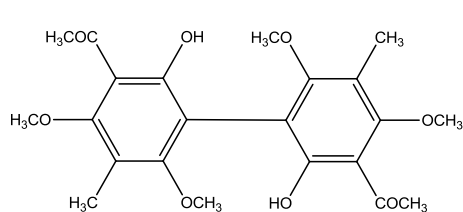
Депсон  
Пикролихенинска киселина



Уснинска киселина



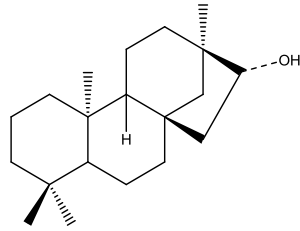
Депсидон  
Виренска киселина



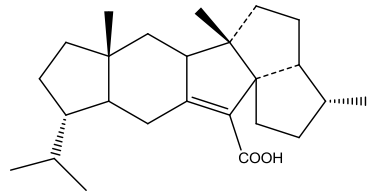
Бифенил  
Контортин

Слика 4. Структуре секундарних метаболита лишајева који настају преко ацетатно-полималонатног биосинтетског пута изведених из два или више поликетидна ланца

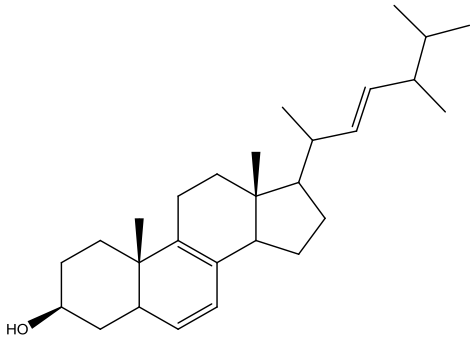
Једињења која настају биосинтетичким путем преко мевалонске киселине подразумевају механизам који укључује ацетил коензим А. Кондензацијом два молекула ацетил-*CoA*, помоћу ензима ацетил-*CoA* ацетилтрансферазе настаје ацетоацетил-*CoA*. Кондензацијом ацетоацетил-*CoA* с једним молекулом ацетил-*CoA*-2-хидрокси-2-метил-глутарил-*CoA*, под дејством хидрокси метилглутарил-*CoA* синтетазе настаје хидроксиметилглутарил-*CoA*, из кога потом, под дејством *HMG-CoA* редуктазе, преко МВА-тиохемиацетала, настаје мевалонска киселина. Једињења која настају биосинтетским путем преко мевалонске киселине су: каротени ( $\beta$ -каротен,  $\gamma$ -каротен, вилкоксантин, ксантофили), стероиди (ергостерол, фунгистерол,  $\beta$ -ситостерол) и терпени који су подељени у дитерпене и тритерпене.



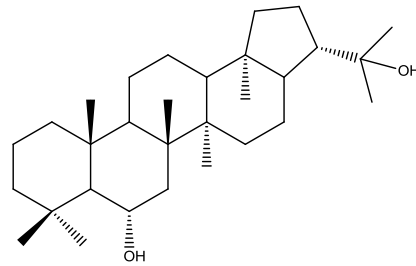
Дитерпен  
16α-хидроксикауран



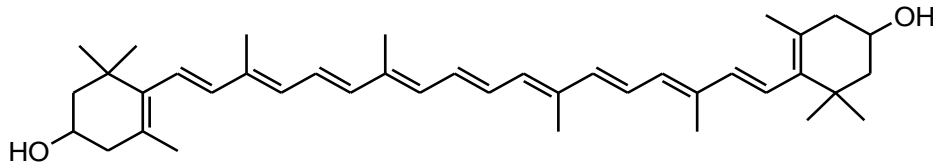
Сесквитерпен  
Ретигеранинска киселина



Стероид  
Ергостерол



Тритерпен  
Зеорин

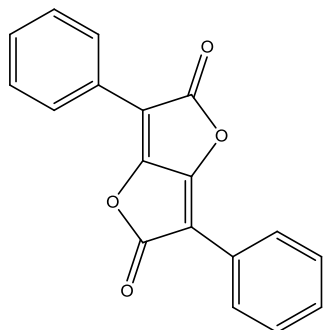


Каротеноид  
Зеаксантин

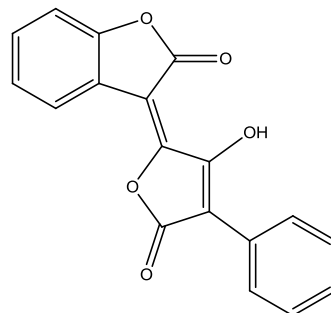
**Слика 5.** Структуре лишајних метаболита који настају биосинтетским путем преко мевалонске киселине

Терфенилхинони и деривати пулвинске киселине су примери секундарних метаболита лишајева који настају биосинтетским путем преко шикимске киселине. Родови лишајева који су најпознатији по продукцији деривата пулвинске киселине припадају фамилији *Stictaceae*. Главна карактеристика фамилије лишајева *Stictaceae* јесте да алгу у симбиотском односу лишајева представља више плаво зелена алга него зелена алга што је није случај код других лишајева (14, 48, 58, 59).

Деривати пулвинске киселине

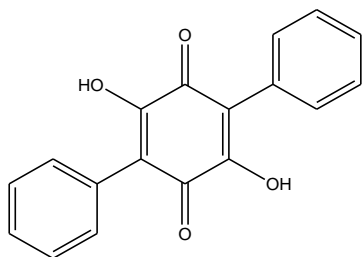


Пулвин дилактон

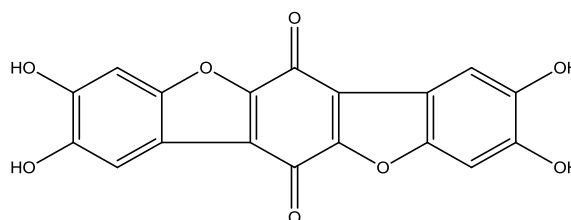


Калицин

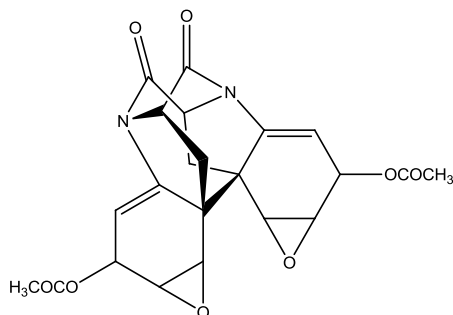
Терфенилхинони



Полипорична киселина



Телефорична киселина



Дериват аминокиселине  
Скабозин-4,4'-диацетат

Слика 6. Структуре лишајних метаболита добијених бисинтетским путем преко шикимске киселине

## 1.5. Биолошка активност лишајева

Лишајеви су показали широк спектар биолошког потенцијала, али су дуго били занемаривани од стране миколоога и фармацеутске индустрије због њиховог спорог раста и потешкоћа приликом њиховог вештачког гајења (60). Главни носиоци биолошке активности су њихови специфични метаболити. Интерес за секундарним метаболитима из лишајева је у сталном порасту. Међутим, релативно мали број лишајних супстанци је изолован и испитана њихова биолошка активност и терапеутски потенцијал због потешкоћа у њиховом добијању у већој количини и чистоћи који ће бити довољни за структурна одређивања и фармаколошка испитивања (61). Секундарни метаболити лишајева испољавају антимикумно, антиоксидативно, антиинфламаторно, антитуморско, аналгетско, антипиретско и антивирусно дејство (48, 52, 60, 62, 63).

### 1.5.1. Антиоксидативна активност

#### 1.5.1.1. Оксидативни стрес

Велика употреба синтетичких антиоксиданата може да изазове низ штетних токсичних и канцерогених ефеката. Сходно томе, постоји све веће интересовање за проналажење нових антиоксиданата природног порекла који неће имати нежељене ефекте (64). Бројне *in vitro* студије на биљкама, микро и макро алгама и лишајевима показују да њихови конституенти имају антиоксидативни капацитет који ће имати заштитни ефекат у неутрализацији слободних радикала који доводе до настанка оксидативног стреса (63, 65, 66). Лишајеви су богати секундарним метаболитима првенствено фенолима који су добро познати по својим антиоксидативним својствима (67). Слободни радикали (реактивне врсте кисеоника као што су хидрокси радикали, водоник пероксид, супероксид анјон, и реактивне врсте азота као што су азот оксид и пероксинитрил) играју веома важну улогу у многим хемијским процесима у ћелији. При ниским концентрацијма реактивне врсте кисеоника (ROS) и реактивне врсте азота (RNS) су неопходне за процес сазревања ћелијске структуре. У нормалним условима постоји равнотежа нивоа слободних радикала који контролише сопствени антиоксидативни одбрамбени систем (68). Међутим, под утицајем различитих ендогених и екзогених фактора може доћи до нарушавања равнотеже између ћелијских система који производе слободне радикале и оних који одржавају антиоксидативне одбрамбене механизме и до феномена који се зове оксидативни стрес (69).

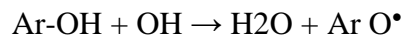
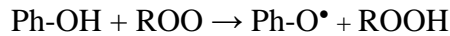
Оксидативни стрес представља штетан процес који може да доведе до појаве низа патолошких стања. Оксидативни стрес може изазвати низ хроничних и дегенеративних болести код човека као што су: кардиоваскуларна и неуродегенеративна обољења, алзхеимерова болест, болести атеросклерозе, емфизема, хемокроматозе, многих облика рака, паркинсонову болест, шизофренију, дијабетес мелитус као и старење. Антиоксиданти су супстанце које поседују способност заштите организма од нежељених ефеката који може да проузрокује оксидативни стрес (70, 71). Организам се против слободних радикала, осим сопственим одбрамбеним механизмом, брани и природним антиоксидансима који се у организам уносе храном. Благотворно дејство лековитих биљака на здравље приписано је високом садржају разноврсних фитохемијских једињења, од којих су најзаступљенија фенолна једињења (72). Фенолна једињења имају јако изражену антиоксидативну и антирадикалску активност, и због тога им се приписују многа терапијска деловања: антибактеријско, антиинфламаторно, антиалергијско, антимутагено, антивирално и антиканцерогено (73).

#### **1.5.1.2. Феноли као антиоксидативни агенси**

Лишајеви су добар извор природних антиоксиданата. Иако су углавном хидрофобни, фенолна природа главних секундарних метаболита лишајева упућује да имају антиоксидативне особине. Феноли су главни секундарни метаболити лишајева и имају кључну улогу у регулацији раста и развоја лишајева у стресним и неповољним климатским условима (67). Лишајеви продукују мноштво фенолних једињења укључујући депсиде, депсидоне, дибензофуране и деривате пулвинске киселине (74). Фенолна једињења су широко распрострањени секундарни метаболити лишајева и антиоксидативна активност је најчешће повезана са њиховим присуством. Орсална киселина је основна јединица у биосинтези фенола лишајева. Феноли лишајева се добијају из гљиве као симбиотског партнера у лишају и депонују се као кристали на површини ћелијског зида хифа. Феноли лишајева настају првенствено преко ацетатно-полималанатног пута са изузетком деривата пулвинске киселине који се синтетишу биосинтетичким путем преко шикимске киселине. Лишајни феноли се састоје од два моноциклична фенола који су повезана естарском везом као у депсидима, естарском и етарском везом у депсидонима

или хетероцикличном везом фурана као што се налази у дибензофуранима (уснинска киселина) (75).

Фенолна једињења садрже у својој структури ароматични прстен за који је везана једна или више хидроксилна група. Верује се да је антиоксидативна активност фенола првенствено резултат њихове способности да буду донатори атома водоника и елиминишу слободне радикале за формирање мање реактивних феноксил радикала (76).



Показано је да с повећањем броја хидроксилних група молекула, као и продужењем бочног ланца молекула расте антиоксидативна активност вероватно услед могућности слободне стабилизације радикала формирањем коњугације бочног ланца. Антиоксидантна активност фенолних једињења зависи од њихове хемијске структуре, од врсте и поларности растварача који се користи за екстракцију, поступака изолације, чистоће активне сусптанце, као и система испитивања (77). Када се антиоксидативни капацитети лишаја пореде са количином фенолних једињења у њима, могло би се закључити да је антиоксидативна активност управо повезана са њиховим присуством у лишајевима. Постоји много публикација који повезују укупан број фенолних једињења и њихове антиоксидативне активности. На пример, за метанолски екстракт лишајева *Lobaria pulmonaria*, постоји јака корелација између антиоксидативне активности и укупног садржаја фенола (78). Многе друге студије су такође показале директну корелацију између укупног садржаја фенола и антиоксидативне активности (79-80).

Међутим, неке студије су показале да укупан фенолни садржај и антиоксидативна активност нису увек у позитивној корелацији. *Odabasoglu* и сар. су нпр. одређивали укупну антиоксидативну активност, укупни фенолни садржај и редукциону снагу метанолских и водених екстраката четири врсте лишајева: *Brioria fuscescens*, *Dermatocarpon intestiniformis*, *Peltigera rufescens* и *Pseudevernia furfuracea* где су показали да се антиоксидативна активност тестираних екстраката може приписати присуству нефенолних састојака. Треба узети у обзир да појединачни феноли могу имати различите антиоксиданте активности, Могу постојати антагонистичке или синергистичке интеракције између фенола и других једињења попут угљених хидрата, протеина и тд. (81).



Хемијски састав фенолних једињења је специфичан за сваку врсту биљних организама. Најзаступљенија фенолна једињења су: фенолне киселине, флаваноли, флавоноиди, дихидрохалкони, изофлавоноли, флаван-3-оли, антоцијани, проантоцијанидини, танини, и тд. Фенолне киселине садрже једну карбоксилну групу и најмање једну фенолну хидроксилну групу. Карактеристика фенолних киселина је да се јављају у слободној форми или у форми коњугата, најчешће као естри или амиди. Антимикробно, антиоксидативно, антиинфламаторно и антиканцерогено дејство испољавају фенолна једињења. Флавоноиди представљају највећу групу полифенола биљака. Најбројнија група фенолних једињења су флавоноиди који садрже петнаест угљеникових атома. Флавоноидна једињења могу да буду у форми агликона, односно у слободној форми, и у форми гликозида. Шећерни остатак може да садржи један, два или три молекула моносахарида који су међусобно линеарно или рачвасто везани. Основне структуре скелета флавоноидних агликона представљају:  $\gamma$ -пирон, бензо- $\gamma$ -пирон, 2-фенил-бензо- $\gamma$ -пирон. Антиоксидативним деловањем сузбијају слободне радикале и инхибирају ензиме који доводе до развоја ових реактивних молекула, због чега се флавоноиди могу употребити као природни лекови код третмана болести крви и коже, као и за превенцију рака. Ова група секундарних метаболита има значајну улогу и у физиолошким процесима биљних организама (82-83).

### 1.5.1.3. Антиоксидативна активност екстракта лишајева

Лишајеви су се показали као добар извор антиоксиданата и пуно литературних података говори у корист томе. Већина публикација описује антиоксидативне активности екстракта лишајева али је све више и студија које проучавају антиоксидативну природу чистих метаболита. Бројни истраживачи су процењивали антиоксидативне активности многих врста лишајева, прва истраживања вршена су 1993. године од стране *Iatamoto* и сар. (84). Након тога, *Alslan* је истраживао антиоксидативну активност метанолских екстракта *Evernia divaricata*, *Evernia prunastri*, *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum* и *Neofuscella pulla* методама неутрализације стабилног DPPH<sup>•</sup> радикала и инхибицијом оксидације линолне киселине. Открили су да екстракти *Cladonia foliacea*, *Evernia divaricata*, *Evernia prunastri* и *Neofuscella pulla* нису вршили никакву активност у оба теста, док екстракт лишаја *Dermatocarpon miniatum* редукује DPPH<sup>•</sup> радикал за 50% при

концентрацији од 396,1 µg/ml (85). Митровић је такође је проучавао антиоксидативну активност метанолских екстраката лишајева *Parmelije sulcata*, *Flavoparmelia caperata*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes* и *Cladonia foliacea* који су показали DPPH „скевинцер” активности (86). Kumar и сар. су показали значајну антиоксидативну активност за метанолске екстракте *Ramalina hossei* и *Ramalina conduplicans* (87). Хлороформски, метанолски и водени екстракти лишајева: *Cladonia rangiformis*, *Brioria fuscescens*, *Dermatocarpon intestiniformis*, *Peltigera rufescens* и *Pseudevernia furfuracea* показали су значајну антиоксидативну активност (81, 88). Јаки антиоксидативни ефекат је такође пронађен у метанолским екстрактима лишајева *Usnei ghattensis* (89), *Parmotrema pseudotinctorum* (90), као и у ацетонском, метанолском и воденим екстрактима лишајева: *Cladonia furcata*, *Hypogymnia physodes*, *Lasalia pustulata*, *Parmelia caperata* и *Parmelia sulcata* (91) и метанолном и етил-ацетатном екстракту лишаја *Cetraria aculeata* (92). Ацетонски, метанолски и водени екстракти лишајева *Cetraria islandica*, *Lecanora atra*, *Parmelia pertusa*, *Pseudevernia furfuracea* и *Umbilicaria cylindrica* показали су значајну антиоксидативну активност (93). Антиоксидативни капацитет многих других врста лишајева је потврђен од стране великог броја истраживача (67, 94, 95, 96).

Међутим, ове студије су рађене са екстрактима лишајева, и није тачно утврђено који састојак екстракта лишаја је одговоран за антиоксидативну активност. У последње време све је више студија који детерминишу који секундарни метаболит лишаја има антиоксидативну активност. Међу првим лишајним супстанцама за које је доказана антиоксидативна активност били су депсиди (атранорин и диварикатична киселина) и депсидони (панарин и 1-хлорпанарин) (97). Такође за сусптанце: уснинска киселина, валиоралична киселина, лобаринска киселина, протолихестеаринска киселина, дифрактаинска киселина, гирофорна киселина, леканорна киселина, стиктинска киселина, протоцетраринска киселина, салазинска киселина, норстихнинска киселина, евернијска киселина и фисодинска киселина доказана је значајна антиоксидативна активност. Већи број радова се односи на *in vitro* испитивање утицаја супстанци на инхибицију DPPH• радикала, инхибицију супероксид анјон радикала, инхибицију липидне пероксидације и редукциони капацитет супстанци (52, 94, 95, 98, 99, 100).

### 1.5.2. Антитуморска активност

Рак је један од водећих узрочника морбидитета и морталитета широм света. У протеклих пола века природни производи су имали значајну улогу у борби против рака. Током историје, природни производи су били богат извор једињења која су нашли примену у медицини, фармацији и биологији. Биљни организми представљају изузетно богат извор потенцијалних антитуморских агенаса. Проналажење нових антиканцерских агенаса који би испољавали изражено селективно антитуморско дејство према малигним ћелијама, као и минимално токсично дејство према здравим ћелијама од изузетног је значаја за развој нових лекова у онкологији. У сфери канцера има велики број нових комерцијализованих лекова који су добијени из природних извора, структурним модификацијама природних једињења или синтезом нових једињења, дизајнираних према природном једињењу као модел. С друге стране, коњугација токсичних природних производа моноклонским антителима или полимерним носачима могу довести до ефикаснијег деловања циљане терапије (101).

Некада се сматрало да искључиво макронутријенти (угљени хидрати, протеини, масти, биљна влакна) и микронутријенти (витамини и минерали) могу да имају повољне ефекте на здравље људи. У међувремену је откривено мноштво различитих састојака биљних организама који би могли да буду корисни у превенцији канцера (102). Значајно место међу цитотоксичним лековима који се користе у хемиотерапији малигних тумора заузимају секундарни метаболити биљних организама или њихови полусинтетички деривати, као и једињења синтетисана на основу структуре изворног биљног једињења, попут таксана, винка алкалоида, епиподофилотоксина и камптотецина. Најзначајнија једињења која би могла да имају важну улогу у хемиопревенцији рака могу да се поделе у неколико група: фенолна једињења, витамини (витамини А, Ц, Д, Е), каротеноиди, алкалоиди, органосумпорна једињења, једињења која садрже селен и масне киселине (103, 104, 105, 106).

Постоје велики број научних публикација које показују антитуморску активност лишајева при чему треба нагласити резултате специфичних лишајних једињења. Изолована лишајна једињења често показују значајну инхибиторну активност против разних ћелијских линија канцера у врло ниским концентрацијама. Иако су лишајеви

извори активних једињења против рака, биолошка активност је испитана на малом броју лишајних супстанци (61,107, 108).

*Ingolsdottir* је међу првима тестирао активност већег броја различитих врста лишајева (29 врста лишајева) према туморским ћелијама (12 канцерогених туморских ћелија) (109). *Bezivin* и сарадници су испитивали антикацерогени ефекат 24 различита лишајна екстракта и пронашли су веома јаку антитуморску активност за екстракте врста *Parmelia caperata*, *Cladonia convoluta*, *Cladonia rangifomris*, *Platisma glauca* и *Ramalina cuspidata* (110). Манојловић и сарадници су установили снажан антитуморски ефеката за хлороформске, етилацетатне, метанолске и етанолне екстракте врста *Evernia punastri*, *Xantoria parietina*, *Thamnolia vermicularis* и *Pseudoevernia furfuraceae* према различитим ћелијским линијама (Hela, LS174, FemX) (99, 111). *Ari* и сарадници посветили су посебну пажњу врсти *Hypogymnia physodes*. Испитиван је цитотоксични, генотоксични и апоптоски утицај метанолског екстракта поменуте лишајске врсте на две ћелијске линије канцера. Утврђено је да овакав екстракт у нижим концентрацијама инхибиторно делује на раст ћелија док у већим концентрацијама испољава генотоксично дејство (112). Оксидативни и генетски утицај воденог екстракта лишајских врста *Hypogymnia physodes*, *Ramalina polymorpha* и *Usnea florida* на крвне ћелије људи, испитиван је *in vitro* и описан у раду *Türkeza*. Ћелије су гајене на подлогама којима је претходно додат екстракт лишајева у различитим концентрацијама (113). Досадашња истраживања су показала да екстракти појединих врста лишајева (*Parmelia caperata*, *Parmelia saxatulus*, *Parmelia sulcata*, *Umbilicaria cylindrica*, *Evernia prunastri*, *Pseudoevernia furfuraceae*, *Hypogymnia physodes*, *Toninia candida* и *Usnea barbata*) испољавају различита антитуморска својства (52, 95, 99, 100). Многи секундарни метаболити лишајева показују цитотоксична својства и могу бити потенцијални извори фармацеутских корисних супстанци. Међутим, до сада је објављен ограничен број студија где је показан механизам дејства лишајних супстанци против ћелијских линија карцинома (12). Молекуларни механизам ћелијске смрти помоћу лишајних једињења укључује успоравање или заустављање ћелије канцера, апоптозу, некрозу и инхибицију ангиогенезе (98). Постоји потреба за проширењем истраживања у овој области, укључујући студије оних једињења која су показала обећавајуће резултате, као и снажан фокус на идентификацији специфичних механизма деловања и обимних клиничких испитивања. Прва испитивања лишајних супстанци вршена су у касним

шездесетим када је активност лишајева против туморских ћелија базирана на присуству полисахарида (114). У раним студијама *Kurchana* и *Koppermana* (115) се први пут испитивала активност секундарних метаболита лишајева уснинске киселине добијене из *Cladonia sp.* и деловање на инхибицију карцинома плућа. Као резултат активности уснинске киселине као антитуморског агенса истраживачи су пријавили пораст животног века од 35-52% третираних мишева у односу на контролну групу користећи опсег дозе од 20-200 mg/kg уснинске киселине. Бутиролактон (протолихестеаринска киселина) такође се показао као ефикасна антипролиферативна супстанца против ћелија леукемије K-562 (IC<sub>50</sub>=20 mg/ml), док деривати нефростеаринске киселине имају слаб антитуморски ефекат (116). Такође, полипоринска киселина (терфенилхинон), деривати фисодалинске киселине (депсидон) (117), фисодална киселина (депсидон) (118), гирофорна киселина (119), метил евернат (120), и лишајни глукани (121) укључујући и деривате лихенина (122) су испитивани као антитуморски агенси. Релативно мали број лишајних супстанци је детаљно испитиван *in vivo* ради доказивања њихове биолошке активности и терапеутског потенцијал. Разлог томе може бити због потешкоћа у добијању већих количина изолованих секундарних метаболита која би била довољна за структурално разјашњење и фармаколошко тестирање као и због саме чистоће супстанце (107).

### 1.5.3. Остале биолошке улоге

Велики број секундарних метаболита лишајева могу се користити као одрамбена једињења против биљоједа (123). Као последица тога није изненађење да се секундарни метаболити лишајева користе у фармацеутској индустрији као антимикуробни и антивирусни агенси.

*Burkholder* и сар. почели су са пионирским истраживањима на лишајевима као антибактеријским средствима још 1944. године (124). Направили су екстракте 42 различита лишаја са простора северноисточне Америке и показали да ти екстракти врше инхибицију раста више врста бактерија. То је довело до великог такмичења између истраживача ко ће идентификовати супстанцу из лишаја која ће деловати као антибиотик. Антимикробна активност лишајева је променљива, у зависности од врсте лишајева, концентрације екстракта и тестираних организама. Већина студија су показале да су лишајеви ефикаснији против грам-позитивних бактерија него против грам-негативних.

Тако грам позитивне бактерије значајно инхибира уснинска киселина, протолистеринска киселина и различити орцинол деривати. Антимикробна активност лишајева је такође доказана и у другим студијама (52, 62, 63, 86, 88, 95). Студија *Yilmaza* и сар. демонстрирала је антимикробну активност екстракта *Cladonia foliacea* против девет врста бактерија и девет врста патогених гљива. Ацетонски екстракт *Cladonia foliacea* инхибира раст бактерија *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* и квасаца *Candida albicans* и *Candida glabrata* (125).

За уснинску киселину је показано да делује и антихистаминички, као спазмолитик и антивирусно. Комерцијано се користе у виду антисептичке креме. Уснинска киселина је показала да делује ефикасније од пеницилина кад се употребава за санирање спољашњих рана и опекотика а користи се у виду мелема. Молекул уснинске киселине представља бензофуран или дихидробензофуран и садржи фенолне, хидроксилне групе, и двострукте везе у дихидроароматичном прстену. Антибиотско деловање уснинске киселине заснива се на инхибицији оксидативне фосфорилације, сличним механизмом као и динитрофенол (126).

Секундарни метаболити присутни у лишајевима показали су и антифунгалну активност. Раст *Neurospora crassa* инхибира уснинска киселина као и моноциклични фенол деривати који су присутни у неким врстама лишајева (127). Бројни метаболити лишајева такође делују као регулатори раста биљака где је уснинска киселина посебно показала своју активност (128). Иако постоји неколико комерцијалних употреба лишајних супстанци, разноврсност антибиотског својства подстичу даља истраживања.

Атранорин (изоливан из врста лишајева *Phycia aipolia*), фумаропротоцетраринска киселина (изоливана из *Cladonia furcata*), гирофорна киселина (изоливана из *Umbilicaria polyphyla*), леканорна киселина (изоливана из *Ochrolechia androgyna*), фисодинска киселина (изоливана из *Hypogymnia physodes*), протоцетраринска киселина (*Flavoparmelia caperata*), стиктична киселина (изоливана из *Xantoparmelia conspersa*), уснинска киселина (из *Flavoparmelia caperata*), показали су релативно јаку антимикробну активност против бројних бактерија и гљивица међу којима су и оне које су патогене за људе (129-130).

Метанолни екстракт *Ramalina farinacea* је показао да делује као антивирусно средство против РНК и ДНК вируса. Уснинска киселина изолована из *Ramalina celastri*

показује специфично антивирусно дејство против вируса „Junin“ који представља главни узрочник аргентинске хеморагијске грознице (131).

*Vijayakumar* је показао да уснинска киселина изолована из *Rocella montagnei* показује значајну дозну зависну антиинфламаторну активност код пацова. Дифрактаична и уснинска киселина имају аналгетско и антипиретско дејство код мишева у *in vitro* условима (132). Доказано је да *Cladonia foliacea* има велику ларвицидну активност на ларве кућног комарца *Culex pipiens* (133).

### 1.6. Течна хроматографија високих могућности (HPLC)

Хроматографија је поступак који омогућава раздвајање, изоловање, идентификацију и одређивање састојка смеше на основу процеса који се дешавају на граници две фазе: стационарне и мобилне фазе. *HPLC* метода је данас врло заступљена у аналитичкој хемији. Принцип рада се заснива на томе да се анализирана супстанца убацује у *HPLC* систем на врх колоне преко инјектора и сепарација се одвија у складу са одговарајућим факторима капацитета супстанце под високим притиском. Високи притисак се користи јер повећава линеарну брзину и даје компонентама мање време задржавања, чиме се појачава резолуција хроматограма. *HPLC* уређај се састоји из следећих делова: резервоар мобилне фазе, пумпа, инјектор, колона и детектор. Стационарна фаза у *HPLC* представља колону од нерђајућег челика. Мобилна фаза, која је у течном стању, се из једне или неколико боца под притиском убризгава у колону и прелази преко стационарне фазе, где на основу специфичних физичких и хемијских интеракција долази до различитог задржавања састојака смеше. Процент одређене компоненте израчунава се одређивањем површине пика као процента укупне површине свих пикова. Хроматограм представља криву течне хроматографије у функцији времена. Хроматограм нам може рећи број компоненти у узорку, њихову концентрацију, квалитативна и квантитативна својства, као и чистоћу појединих супстанци. Број пикова одређује број компоненти у испитиваном узорку. Пре саме *HPLC* анализе, уређају се морају задати одређени параметри (таласна дужина, брзина протока, температура, притисак,...) најпогоднији за проналажење тражене супстанце, како би извршио снимање са што већом прецизношћу.

Сваку супстанцу одликује тачно одређено ретенционо време на хроматограму, па се њено присуство у испитиваном узорку одређује на тај начин што се пореди добијено

ретенционо време са ретенционим временом стандардне супстанце. Ретенционо време је време за које супстанца елуира тј. дође до краја колоне. За идентификацију и квантификацију појединих компонената користе се стандарди познате концентрације. За сваки *HPLC* систем везан је детектор и компјутер са специјалним софтверским програмом, помоћу којих се добијају и обрађују хроматограми и идентификују и квантификују компоненте. Издвојене компоненте са колоне долазе у детектор, који их региструје и шаље електрични сигнал компјутеру. Од детектора најчешће се користи *UV-VIS* детектор [134,135,137].

### 1.7. Ултраљубичаста/видљива (*UV/VIS*) спектроскопија

Ултраљубичаста/видљива (*UV/VIS*) спектроскопија обухвата проучавање апсорпције електромагнетног зрачења у области између 200 и 800 nm (*UV* и *VIS* област). Енергетски садржај зрачења у области од 200 и 800 nm налази се између 600 и 150 kJ/mol, што је довољно за побуђивање електрона и њихов прелазак из основних стања у побуђена стања (антивезивне орбитале). *UV/VIS* спектроскопија нам даје корисне податке само за једињења која поседују хромофорне групе. Под појмом хромофоре подразумевају се незасићене функционалне групе које апсорбују у *UV/VIS* области. Ако су за хромофоре директно везане засићене групе које садрже електронске парове (ауксохроме) долази до померања апсорпције ка већим таласним дужинама. *UV/VIS* спектар представља зависност таласне дужине ( $\lambda$  у nm) од апсорбанције (*A*). Апсорпциони максимуми у *UV-VIS* спектру се карактеришу обликом (фина структура), таласном дужином на којој се јавља максимум апсорпције и моларним екстинционим коефицијентом. *UV/VIS* спектри добијени на овај начин, пружају веома корисне информације о структури испитиваног једињења. Ова врста спектроскопије је незаменљива помоћна, а често и главна метода приликом испитивања коњугованих једињења (биљни пигменти-каротеноиди, полиацетилени, порфирини, флавоноиди). *UV/VIS* спектрофотометрија је квалитативна и квантитативна метода. Квалитативна анализа заснива се на чињеници да апсорпциони спектар супстанце зависи од њеног састава и структуре. Идентификација се може вршити компарацијом са спектром стандарда. Њене предности над осталим методама су у изузетно великој осетљивости, релативној ниској цени инструмената као и у једноставном руковању инструмената.



Квантитативна *UV/VIS* анализа се заснива чињеници која следи из *Lambert-Beer*-овог закона да је моларна концентрација неког једињења директно пропорционална његовој концентрацији. У случају када апсорпција одступа од *Lambert-Beer*-овог неопходна је припрема калибрационе криве  $c = f(A)$ , помоћу спектра стандардних раствора, различитих концентрација.

Основни делови *UV-VIS* спектрофотометра су: светлосни извор (из кога се светлост дели на два једнака зрака, реферетни и аналитички), монохроматора, детектора и уређаја за појачавање. Као извор зрачења користе се кварцна халогена или тунгстенова лампа (*VIS* област 350-900 nm) и деутеријумска лампа (*UV* област 190-350 nm). Као детектор се користи фотомултипликатор. Испитивани раствори се пребацују у аналитичку кивету од кварца (блиска *UV* и *VIS*) и стакла (само *VIS*). Због веома високе осетљивости растварачи који се користе у *UV/VIS* спектроскопији морају бити тзв. спектроскопске чистоће. Најчешће се користе 95 % етанол, циклохексан, хексан и изооктан (136, 137).

## **1.8. Таксономија, дистрибуција и опис врста лишајева *Cladonia subulata*, *Physcia semipinnata* и *Pleurosticta acetabulum***

### **1.8.1. *Cladonia subulata* L.**

Род *Cladonia* је жбунаст (фруктиозни) лишај који обухвата више од 400 врста распрострањених широм света. Талус изграђује лихенизована гљива (*Ascomycotina: Lecanorales: Cladoniinae*). Овај род одликује диморфни талус који је изграђен од хоризонталног примарног талуса (сквамозе) и вертикалног секундарног талуса (подеције). Род *Cladonia* садржи широк спектар секундарних метаболита од којих су најзаступљенији  $\beta$ -орцинол, депсиди и депсидони, међу којима доминирају атранорин, барбатинска, скваматична, тамнолична, секикаична, фумарпротоцетрарична и псоромична киселина.

Табела 2. Филогенетичко стабло врсте *C. subulata*

Таксономска категорија	Таксон
Царство	<i>Fungi</i>
Раздео	<i>Ascomycota</i>
Класа	<i>Lecanoromycetes</i>
Ред	<i>Lecanorales</i>
Фамилија	<i>Cladoniaceae</i>
Род	<i>Cladonia</i>
Врста	<i>Cladonia subulata</i>

Слика 7. *Cladonia subulata* L.

*Cladonia subulata* је први пут описана од стране *G.H. Weber* и *F. H. Wigg.* 1780. године. Талус може бити примарни и секундарни. Примарни талус је сквамuloзан (крљуштасти) а секундарни талус је фруктиозан (жбунаст). Сквamuле су дужине од 1-4 mm са изузетком неких које иду и до 9 mm, ширине су од 1-6 mm. Секундарни талус чини велики број подеција које су разгранате, висине углавном 15-50 mm али поједине могу бити и до 100 mm, дебљине 1-4 mm и налазе се углавном под углом од 90 степени. Боја подеције варира од бледо сиве до сиво зелене. На врху подеција формира се структура у виду чаше ширине од 1-3,5 mm. Апотеције се ретко образују, тамносмеђе су боје, ситне су и налазе се на врховима чашасте структуре. На површини талуса се образују соредије и изидије. Соредије се образују испод горње коре талуса, гради их једна, две или мањи број ћелија алге које су образоване са неколико хифа гљива. Када се развију долази до прскања горње коре лишаја и онда се соредије разносе ветром. Изидије су крупније од соредија, развија се у обичу израштаја. У себи садрже мали број ћелија алге и хифе гљиве. Израштаји могу бити једноставни или на различитте начине разгранати при чему је основа јако танка, тако да се изидије лако одламају од талуса и потом их разноси ветар. Пикнидије су распоређене на врховима подеције или на самој чашици подеције у виду црних тачкица. Од активних супстанци идентификована је фумарпротоцетраринска киселина. Расте на земљишту, ретко на дрвету, углавном у хладним, умереним регионима. Распрострањена је на свим континентима. *Cladonia subulata* је варијабилна и понекад је тешко разликовати од *Cladonia fimbriata*. Обе врсте су прекривене грануларном соредијом.

Чаше *C. fimbriata* су шире и плитке од оних од *C. subulata* и у већини популација доминира висока и витка подеција. Фотобионт је зелена алга из рода *Trebouxia erici* (138, 139, 140).

### 1.8.2. *Pleurosticta acetabulum* L.

*Pleurosticta* је род лишајева који припада фамилији *Parmeliaceae*. Род *Pleurosticta* је распрострањен широм света, а одликује га талус који је листаст (фолинозан) и розетаст. Од секундарних метаболита у врстама лишаја који припадају роду *Pleurosticta* утврђено је да садржи атранорин и норстихнинску киселину.

Лишај *Pleurosticta acetabulum* је први пут описан од стране *J.A. Elix* и *H.T Lumbsch* 1988. године.

**Табела 3.** Филогентетичко стабло *P. acetabulum*

Таксономска категорија	Таксон
Царство	<i>Fungi</i>
Раздео	<i>Ascomycota</i>
Класа	<i>Lecanoromycetes</i>
Ред	<i>Lecanorales</i>
Фамилија	<i>Parmeliaceae</i>
Род	<i>Pleurosticta</i>
Врста	<i>Pleurosticta acetabulum</i>



**Слика 8.** *Pleurosticta acetabulum* L.

Лишај *Pleurosticta acetabulum* одликује фолиозан талус и гради розете кружног облика дијаметра од 10-15 cm. Састоји се од великог броја режњева који се међусобно преклапају, ширине од 0,5 до 1,5 cm. Горња површина талуса је зеленкасто-сивкаста и маслинасто зелена када се ради о сувом лишају и зеленкасто-светла-сјајна када је влажан. На талусу се налазе и бројне црне тачке које одговарају пикнидијама, углавном према ивицама режњева. Доња површина талуса је бледо-браон боје ка ивицама светлија, и од ње полазе једноставне ризиније. Апотеције су бројне, округлог облика дијаметра од 0,5-2 cm. Дискови су боје од смеђе-црвене до браон наранцасте и налазе се испод апотеције. Немају соредије и изидије. Фотобионт је зелена алга из рода *Trebouxia arboricola*. Ова врста

лишајева припада термофилним врстама организама и налази се на кори листопадних дрвећа у добро осветљеним стаништима. Такође се може наћи и на старим надгробним споменицима и зидовима. Присутан је на свим континентима. Постоје могућност да помешају са врстама *Melanelixia glabra* која је медитеранска термофилна врста коју карактеришу мањи режњеви и не садрже пикнидије. Синоним је *Parmelia acetabulum* (141, 142,143).

### 1.8.3. *Physcia semipinnata* L.

*Physcia* је род лихенизоване гљиве која припада фамилији *Physciaceae* (*Lecanoromycetes: Teloschistales: Physciaceae*) и обухвата преко 70 врста лишајева које карактерише розетаст или неправилан дубоко урезан талус. Утврђено је да род *Physcia* садржи секундарне метаболите: атранорин и зеорин.

Лишај *Physcia semipinnata* је први пут описан од стране *J. F. Gmel. Moberga* 1977. године. Карактерише га фолиозан (листаст) талус, ширине 5-10 cm, уски и дуги режњеви у облику трака. На површини се налазе и беле цилије а целу површину карактерише бледо-сиво-зелекаста боја са белим псеудоцифелама (ситне поре на спољашњој површини лишајева) дајући пегаст, беличаст изглед. Код ове врсте имамо одсуство соралија и на доњој површини има браон ризине. Обично је врло репродуктиван, са апотецијама од 2-3 mm. Аскоспоре су браон боје елипсоидног облика димензија од 16-22 x 6-9 μm. Доња површина је беле боје на које се налазе широке ризиније. Дискови су сиво-плавичасте боје. Налази се на нижем дрвећу и жбуновима ретко на стенама. Ова врста лишајева је распрострањена широм евроазијског континента. Одсуство соредије разликује их од других врста рода *Physcia*, посебно од врста *Physcia adscendens* и *Physcia tenella* код којих су присутне соредије (али то може бити проблем код младих примерака). Лишај *Physcia semipinnata* је тешко разликовати од врсте *Anaptychia cularius* која је тамно браон без псеудоцифела. Синоним је *Physcia leptalea* (144, 145).

Табела 4. Филогентетичко стабло *P. semipinnata*

Таксономска категорија	Таксон
Царство	<i>Fungi</i>
Раздео	<i>Ascomycota</i>
Класа	<i>Lecanoromycetes</i>
Ред	<i>Teloschistales</i>
Фамилија	<i>Physciaceae</i>
Род	<i>Physcia</i>
Врста	<i>Physcia semipinnata</i>



Слика 9. *Physcia semipinnata* L.

## **2. ЦИЉ РАДА И ХИПОТЕЗЕ**

## 2.1. Циљеви истраживања

Досадашњим фитохемијским студијама истражених *Cladonia*, *Pleurosticta* и *Physcia* врста је потврђено присуство активних састојака који испољавају одређена фармаколошка и физиолошка дејства. Циљ ове докторске дисертације је испитивање хемијског састава, антиоксидативне и антитуморске активности три врсте лишајева који расту на подручју Р. Србије: *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*.

Циљеви истраживања су следећи:

- Припрема ацетонских и метанолских екстраката врста лишајева: *C. subulata*, *P. acetabulum* и *P. semipinnata* методом екстракцијом по Soxhlet-у;
- Одређивање садржаја укупних фенолних и флавоноидних једињења у екстрактима врста лишајева: *C. subulata*, *P. acetabulum* и *P. semipinnata*;
- Прелиминарна фитохемијска анализа испитиваних екстраката;
- *HPLC (High Performance Liquid Chromatography)* анализа и одређивање квалитативног састава добијених екстраката и идентификација најзаступљенијих конституената;
- Испитивање антиоксидативне активности екстраката (*in vitro*) и разлике у антиоксидативном дејству између различитих екстраката лишајева: *C. subulata*, *P. acetabulum* и *P. semipinnata*;
- Испитивање антитуморске активности екстраката и утврђивање разлике у антитуморском деловању између екстраката лишајева *C. subulata*, *P. acetabulum* и *P. semipinnata*;

## 2.2. Хипотезе истраживања

1. Ацетонски и метанолски екстракти лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* имају различит садржај фенола и флавоноида.
2. Испитивани екстракти различитих врста лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* садрже различите најзаступљеније секундарне метаболите.

3. Испитивани екстракти различитих врста лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* испољавају значајан ниво антиоксидативне активности.
4. Испитивани екстракти лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* испољавају значајан ниво антитуморске активности.
5. Због испољене антиоксидативне и антитуморске активности, екстракти испитиваних лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* могу наћи своју потенцијалну примену у фармацији



### **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

### 3.1. Прикупљање и припрема биљног материјала за екстракцију

Врсте лишајева које су анализирани: *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*. Лишајеви су сакупљени на локалитету: источној падини планине Копаоник (Врело: 43°04'14" СГШ; 21°14'29" ИГД) на територији Републике Србије током маја 2013. године. Прикупљање одабраних врста лишајева вршено је по лепом и сунчаном времену. Након прикупљања, узорци су очишћени од делова других биљака, песка, камења и тд. Одабране врсте лишајева су осушене на ваздуху, на промајном месту заштићеном од светлости. Сушење узорака се обавило на промајном месту, у танком слоју, како би се узорци сачували до почетка експерименталног дела, односно екстракције. Узорци врста лишајева: *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* детерминисани су на департману за биологију и екологију, Природно математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, коришћењем релеватних података и монографија (146, 147). Узорци су депоновани под следећим бројевима ваучера: 1010 (*Cladonia subulata*), 109 (*Pleurosticta acetabulum*) и 103 (*Physcia semipinnata*).

### 3.2. Хемикалије и реагенси

1,1-дифенил-2-пикрилхидразил радикал (DPPH<sup>•</sup>), амонијум молибдат, натријум фосфат, натријум салицилат, трихлорсирћетна киселина (ТСА), линолеинска киселина, амонијум тиоцијанат, *Folin-Ciocalteu's* реагенс, бутиловани хидрокситолуен (ВНТ), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ол)-2,5-дифенилтетразолијум бромид (МТТ), гална киселина, рутин, аскорбинска киселина и α-токоферол су произведени од стране компаније *Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germany*. Растварачи коришћени у течној хроматографији високих могућности су били *HPLC* чистоће (*gradient grade*). Сви остали реагенси и хемикалије употребљене у експерименталном раду били су аналитичке чистоће, пореклом од различитих произвођача.

### 3.3. Добијање екстраката

На ваздуху осушени материјал одабраних врста лишајева је уситњен до грубог прашка (2–6 mm), помоћу млина. Након тога, урадила се одвојена екстракција (4 часа) ацетоном и метанолом коришћењем апаратуре по *Soxhlet*-у на температури нижој од тачке кључања растварача (56,5<sup>0</sup>С -ацетон, 64,7<sup>0</sup>С -метанол). За екстракцију се користило 100 g

уситњеног талуса испитиваних врста лишјајева и 300 ml растварача (ацетона и метанола). Након екстракције, добијени течни екстракти су профилирани преко филтер папира (Whatman, No.1). Упаравање растварача коришћених за екстракцију вршено је под сниженим притиском на ротационом вакуум упаривачу (ИКА) на температури нижој од тачке кључања растварача. На тај начин су добијени суви екстракти, који су чувани у тамним стакленим бочицама и коришћени за даља испитивања.

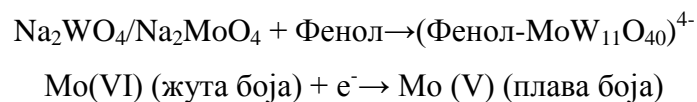
### 3.4. Испитивање хемијског састава екстраката

#### 3.4.1. UV/VIS спектрофотометријска анализа екстраката

За одређивање укупног фенолног и флавоноидног садржаја у испитиваним екстрактима коришћена је UV/VIS спектрофотометрија. Све спектрофотометријске анализе су извршене на спектрофотометру „Cary 300 UV-VIS Spectrophotometer from Agilent Technologies”.

#### 3.4.2. Одређивање укупног фенолног садржаја

Укупан садржај фенола у екстрактима одређен је са *Folin-Ciocalteu* реагенсом, спектрофотометријском методом (148). Метода се заснива на реакцији између *Folin-Ciocalteu* реагенса (фосфомолибдоволфрамова киселина) и полифенолних једињења у базној средини, мерећи редукциони капацитет полифенолних једињења. У реакцији долази до редукције *Folin-Ciocalteu*-овог реагенса до плаво обојеног јона под дејством феноксидног анјона који настаје дисоцијацијом полифенолних једињења присутних у испитиваним узорцима (149):



*Раствори и реагенси*

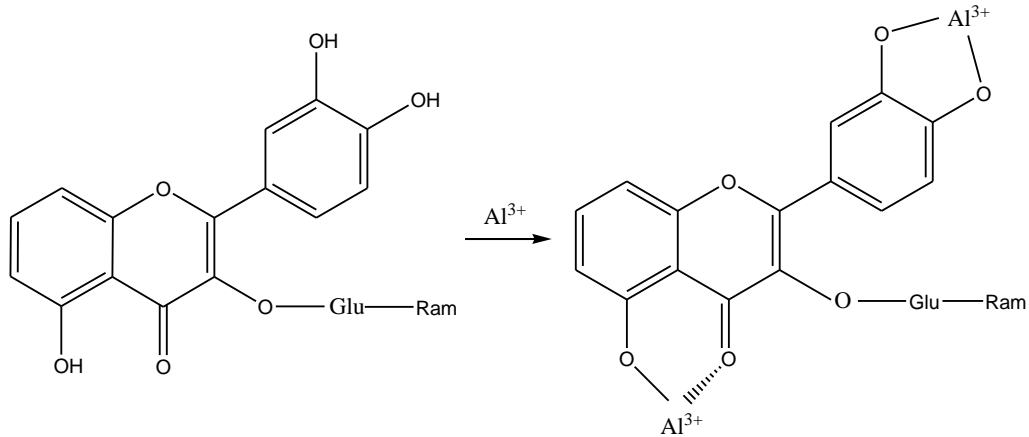
1. Раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5%);
2. *Folin-Ciocalteu* реагенс (десетоструко разблажен);
3. Стандардни раствор галне киселине

*Поступак*

Фенолна концетрација је одређена са калибрационе криве галне киселине. Да би се конструисала стандардна крива направи се серија разблажења стандардног раствора галне киселине (500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625  $\mu\text{g/ml}$ ). 0,5 ml галне киселине различитих концетрација се помеша са 2,5 ml *Folin-Ciocalteu* реагенса (претходно десетоструко разблажен) и са 2,5 ml свеже припремљеног раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5%). После инкубације на температури од  $25^\circ\text{C}$  у трајању од 30 минута, квантитативна процена фенола је изведена мерењем апсорбанце на 760 nm у односу на слепу пробу (садржи све реагенсе осим екстракта и стандардног раствора). Калибрациона крива конструисана је постављањем вредности апсорпције према концентрацији. Исти је поступак спроведен и за екстракте лишајева, 0,5 ml екстракта (1 mg/ml) се помеша са 2,5 ml *Folin-Ciocalteu* реагенса (претходно десетоструко разблажен) и са 2,5 ml свеже припремљеног раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5%). После инкубације на температури од  $25^\circ\text{C}$  у трајању од 30 минута, квантитативна процена фенола је изведена мерењем апсорбанце на 760 nm у односу на слепу пробу. Сва мерења су поновљена три пута. На основу измерених апсорбанци, са калибрационе криве стандардног раствора галне киселине одређена је масена концетрација полифенолних једињења коришћењем једначине праве а затим је садржај полифенолних једињења у екстрактима изражен у mg еквивалената галне киселине по g сувог екстракта  $\pm$  стандардна девијација три мерења (mg GA/g $\pm$ SD).

**3.4.3. Одређивање укупног флавоноидног садржаја**

Флавоноиди имају особину да са металима дају одговарајуће метало-комплексе. Садржај укупних флавоноида у екстрактима одређен је спектрофотометријском методом по *Markham*-у са алуминијум хлоридом, који се базира на стварању комплекса флавоноид-алуминијум ( $\text{Al}^{3+}$  комплекс) (150):



**Слика 10.** Структура рутина и његов комплекс са алуминијумом

Интензитет обојеног комплекса је пропорционалан количини флавоноидних једињења у узорку и одређује се спектрофотометријски, мерењем апсорбанце на  $\lambda=415$  nm.

*Раствори и реагенси*

Раствор  $AlCl_3$  у метанолу (2%);

Стандардни раствор рутина

*Поступак*

Реакциона смеша је припремљена мешањем одређене запремине екстракта (2 ml) концентрације 1 mg/ml, са 2 ml 2% метанолног раствора алуминијум (III) хлорида. Након 10 минута инкубације на собној температури, апсорбанце узорака су мерене на 415 nm на спектрофотометру у односу на слепу пробу. Сва мерења су поновљена три пута.

Флавоноидна концентрација одређена је са стандардне криве рутина, конструисана на основу серије двоструких разблажења стандардног раствора рутина (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625  $\mu\text{g/ml}$ ). Калибрациона крива конструисана је постављањем вредности апсорпције према концентрацији. На основу измерених апсорбанци, са калибрационе криве стандардног раствора рутина одређена је масена концентрација флавоноидних једињења коришћењем једначине праве. Укупни флавоноидни садржај је изражен у mg еквивалената рутина по g сувог екстракта  $\pm$  стандардна девијација три мерења (mg RU/g $\pm$ SD).

#### 3.4.4. HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) анализа екстраката

Високоэффектна течна хроматографска анализа (енг. *HPLC*) са *UV* детекцијом примењена је за раздвајање и идентификацију појединих конституената екстраката. Анализе су вршене на апарату *Agilent 1200 Series* коришћењем C18 колоне (*ZORBAX Eclipse XDB-C18*; 25cm×4.6mm; 5 μm). Детекција раздвојених пикова извршиће се применом детектора са серијом диода (*Diode Array Detector, DAD*) на 280, 330 и 350 nm, а апсорпциони спектри компонената су снимљени у опсегу од 200 до 400 nm.

Растворени узорци екстраката су профилирани кроз филтере са порама величине 0,45 μm. Хроматографско раздвајање извршено је употребом система растварача ацетонитрил-вода-фосфорна киселина (90:10:0,1, v/v/v). Брзина протока мобилне фазе је износила 1 ml/min. У колону је аутоматски, помоћу аутосемплера ињектовано 10 μl раствора узорка. Колона је термостатирана на температури од 300 °C.

Идентификација појединих конституената екстраката је извршена компарацијом ретенционих времена и *UV* спектра конституената са стандардима (λ= 200–400 nm). Стандарди који су коришћени су добијени из следећих извора: хипопротоцетраринска киселина (ретенционо време:  $t_R = 3,10$  min) изолована је из лишаја *Cladonia pyxidata*, фумаропротоцетраринска киселина ( $t_R = 4,14$  min) изолована је из лишаја *Hypogymnia physodes*, салазинска киселина ( $t_R = 1,56$  min) је изолована из лишаја *Lobaria pulmonaria*, норстихнинска киселина ( $t_R = 2,70$  min) изолована је из лишаја *Ramalina farinacea*, протоцетраринска киселина ( $t_R = 3,24$  min) изолована је из лишаја *Toninia candida*, евернијска киселина ( $t_R = 5,08$  min) и атранорин ( $t_R = 14,88$  min) изоловани су из лишаја *Evernia prunastri*, обтусинска киселина ( $t_R = 8,62$  min) изолована је из лишаја *Ramalina obtusata*, леканорна киселина ( $t_R = 14,88$  min) изолована је из лишаја *Parmotrema tinctorum*.

#### 3.5. Испитивање антиоксидативне активности екстраката

Антиоксидативни потенцијал ацетонских и метанолских екстраката врста лишајева : *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* процењен је преко више *in vitro* модела.

### 3.5.1. Одређивање укупног антиоксидативног капацитета

Укупна антиоксидативна активност ацетонских и метанолских екстраката одређена је методом помоћу фосфомолибдена, спектрофотометријски (151). Метода се заснива на редукцији Мо (VI) до Мо (V) помоћу антиоксиданаса при чему долази до формирања зеленог фосфат/Мо (V) у киселој средини. Као стандард коришћена је аскорбинска киселина (AA). Укупна антиоксидативна активност изражена је кроз милиграме аскорбинске киселине по граму сувог екстракта (mg AA/g).

#### *Раствори и реагенси*

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,6 M)

Натријум фосфат (28 mM)

Амонијум молибдат (4 mM)

Аскорбинска киселина као стандард

#### *Поступак*

Укупни антиоксидативни капацитет је одређен са калибрационе криве аскорбинске киселине. Да би се конструисала стандардна крива направи се серија разблажења стандардног раствора аскорбинске киселине (500, 250, 125, 62.5, 31,25, 15,625, 7,8125 µg/ml). 0,3 ml раствора аскорбинске киселине (целе серије разблажења) помеша се са 3 ml раствора реагенса (0,6 M сумпорна киселина, 28 mM натријум фосфата и 4 mM амонијум молибдата). Добијене смеше инкубирају се на 95 °C у току 90 минута. Након хлађења узорака до собне температуре, мери се апсорбанца на 695 nm на спектрофотометру у односу на слепу пробу (садржи све реагенси а уместо узорка и стандарда додаје се 0,3 ml ацетона за ацетонске екстракте и 0,3 ml метанола за метанолске екстракте). Калибрациона крива конструисана је постављањем вредности апсорпције према концентрацији. Затим се исти поступак спроведе и за екстракте лишајева са концентрацијом од 1mg/ml. На основу измерених апсорбанци, са калибрационе криве стандардног раствора аскорбинске киселине одређен је укупни антиоксидативни капацитет у екстрактима изражен у mg еквивалената аскорбинске киселине по g сувог екстракта ± стандардна девијација три мерења (mg AA/g±SD).

### 3.5.2. Одређивање неутрализације DPPH• радикала

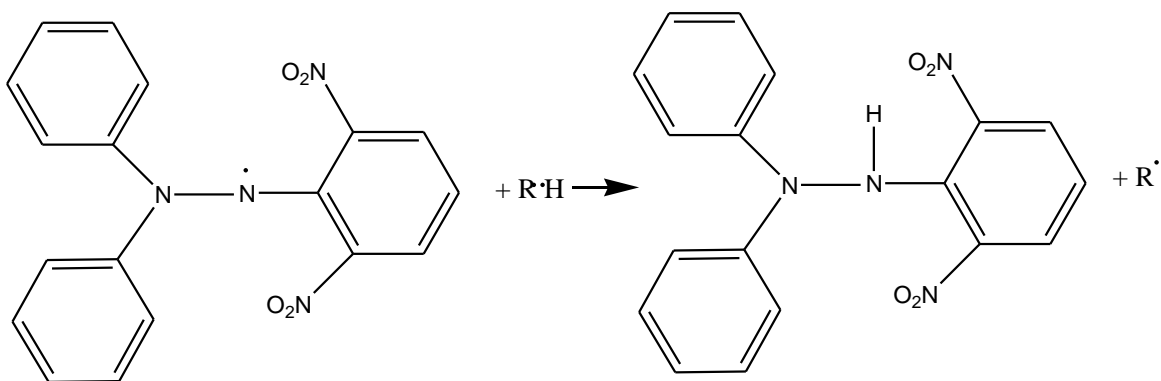
Одређивање способности неутрализације DPPH• (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) радикала анализира се применом спектрофотометријске методе (152). DPPH• је стабилан слободни радикал са делокализованим слободним електроном на азоту, тако да молекул не формира димере, као што би био случај са већином других слободних радикала. Метода је заснована на праћењу промене боје љубичасто обојеног раствора стабилног DPPH• радикала у редуковану жуто обојену форму (хидразин) при реакцији са редукованим средствима (антиоксидансима). Појава жуте боје објашњава се способношћу појединих компонената екстраката да делују као доноси водоника или електрона, при чему DPPH• прелази у редуковани неутрални DPPH-H облик. Ова метода представља прелиминарни показатељ испољавања антиоксидативне активности испитиваних молекула. Као референтни стандарди ће се користити аскорбинска киселина, гална киселина и бутилхидрокситолуен (БХТ). За сваки узорак и сваку концентрацију анализа ће се вршити три пута.

#### Раствори и реагенси

DPPH (*Sigma Chemical, USA*)

Метанол (*Merck, Germany*)

Аскорбинска киселина, гална киселина и бутилхидрокситолуен као стандарди



Слика 11. Реакција DPPH• радикала и антиоксиданаса

#### Поступак

Направи се метанолски раствор DPPH• радикала концентрације 40 µg/ml у мрачној просторији. Направљене су серије двоструких разблажења узорака и стандарда од



основног раствора концентрације 800 µg/ml (800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 µg/ml). Раствори узорка и DPPH<sup>•</sup> су затим помешани у односу 3 ml раствора DPPH<sup>•</sup> радикала и 2 ml (од сваке концентрације) раствора узорка и таква смеша остављена је 30 минута на собној температури, у мраку, након чега је мерена апсорбанца на 517 nm. Исти поступак је поновљен и за стандард. Припремљена је и контрола која, уместо раствора узорка, садржи 2 ml метанола.

#### *Израчунавање*

Капацитет неутралисања слободних радикала израчунат је по следећој формули:

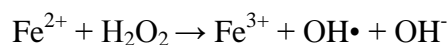
$$\text{Капацитет инхибиције DPPH}^{\bullet} \text{ радикала (\%)} = \frac{A_k - A_s}{A_k} \times 100$$

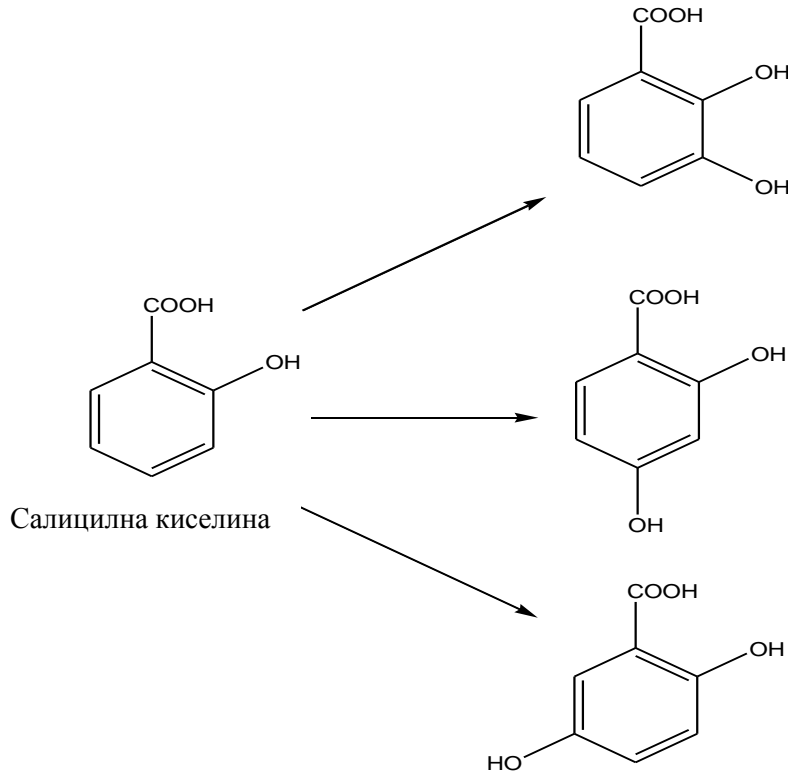
где је  $A_k$ - апсорбанца контролног раствора (негативне контроле),  $A_s$ - апсорбанца раствора узорка или стандарда.

Параметар помоћу кога се тумаче резултати DPPH методе јесте "ефикасна концентрација" или  $EC_{50}$  вредност (другачије  $IC_{50}$  вредност).  $IC_{50}$  вредност (µg/ml), дефинисана као концентрација екстракта потребна да смањи концентрацију DPPH<sup>•</sup> радикала за 50% добијена је рачунски из једначине линеарне регресије. Све анализе су поновљење три пута а резултати приказани као средње вредности ± стандардна девијација три мерења.

### **3.5.3. Одређивање способности неутралисања OH<sup>•</sup> радикала**

Да би се одредила способност екстраката за неутралисање генерисаних OH<sup>•</sup> радикала примениће се метода описана од стране *Smirnoff*-а и *Cumbes*-а са одређеним модификацијама (153). Метода се заснива на хидроксилацији натријум салицилата и мери способност хидроксил радикала да се веже за салицилну киселину како би се наградили дихидрокси-бензоат изомери (главни продукти хидроксилације: 2,3-, 2,4- и 2,5- хидрокси бензоат). OH<sup>•</sup> радикали настају у Фентоновој реакцији  $Fe^{2+}$  јона са  $H_2O_2$ :





**Слика 12.** Главни продукти хидроксилације добијени салицилном пробом након напада  $\text{OH}\cdot$  радикала (2,3-,2,4- и 2,5-дихидрокси бензоева киселина)

*Раствори и реагенси*

$\text{FeSO}_4$  (1,5 mM)

$\text{H}_2\text{O}_2$  (6 mM)

Na-салицилат (20 mM)

Аскорбинска киселина, бутилхидрокситолуол, гална киселина као стандарди

*Поступак*

Реакциона смеша (3 ml) садржи 1,0 ml 1,5 mM  $\text{FeSO}_4$ , 0,7 ml 6 mM хидроген пероксида, 0,3 ml 20 mM и 1 ml екстракта или стандарда различитих концентрација (серија двоструких разблажења: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625  $\mu\text{g/ml}$ ). После инкубације од 1 час на 37  $^\circ\text{C}$ , апсорбанца хидроксилованог салицилата (односно одсуство хидроксилованог комплекса) је мерена на 562 nm. Процент инхибиције се израчунава према једначини:

$$\text{Капацитет инхибиције } \text{OH} \text{ радикала (\%)} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

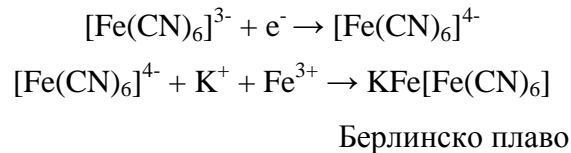
где је  $A_0$  апсорбанца контроле (сви реагенси осим узорка или стандарда уместо њихове запремине додат метанол),  $A_1$  апсорбанца у присуству екстракта или стандарда, и

A<sub>2</sub> апсорбанца смеше без натријум салицилата. Као референтни стандарди ће се користити аскорбинска киселина, гална киселина и бутилхидрокситолуен (БХТ).

Из једначине линеарне регресије су израчунате IC<sub>50</sub> вредности (µg/ml), дефинисана као концентрација екстракта потребна да смањи концентрацију OH<sup>•</sup> радикала за 50%. Све анализе су поновљење три пута а резултати приказани као средње вредности ± стандардна девијација три мерења.

### 3.5.4. Редукциони капацитет

Метода редукциони капацитет или редукујућа моћ је први пут описана од стране Оуаизи-а (154). Моћ редукције је још једно мерило антиоксидативне способности неке супстанце. Капацитет редукције јона Fe<sup>3+</sup> испитиваних узорака одређен је мерењем њихове антиоксидативне способности неке супстанце. Капацитет редукције јона Fe<sup>3+</sup> испитиваних узорака одређен је мерењем њихове способности да редукују [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> јоне до [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> јона. Настали јони [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> реагују са вишком Fe<sup>3+</sup> јона дајући берлинско плаво, KFe[Fe(CN)<sub>6</sub>]. Мерењем апсорбанце на 700 nm одређује се количина берлинског плавог, а самим тим и моћ редукције одређеног екстракта.:



Настали продукт се стабилизује додатком Fe<sup>3+</sup> јона, дајући комплекс који апсорбује у видљивом делу спектра. У овом тесту жута боја тест раствора се мења у различите нијансе зелене и плаве боје зависно од редукујућег капацитета антиоксиданса.

#### *Раствори и реагенси*

Калијум ферицијанид [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>]

Трихлорсирћетна киселина

Гвожђе (III) хлорид FeCl<sub>3</sub>

Фосфатни пуфер (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Аскорбинска киселина

#### *Поступак*

Један милилитар узорака различитих концентрација (1000, 500, 250, 125, 62,5 µg/ml) помешан је са 2,5 ml фосфатним пуфером (0,2 М, рН 6.6) и са 2,5 ml калијум ферицијанида

(1%). Смеша је инкубирана 20 минута на температури од 50 °С. Затим је смеси додато 2,5 ml трихлорсирћетне киселине и вршено је центрифугирање смеше на 3000 rpm 10 минута. После центрифугирања одвојила су се два слоја. Узима се 2,5 ml горњег слоја (супернатанта) и дода се 2,5 ml дестиловане воде и 0,5 ml гвожђе (III) хлорида. Апсорбанца раствора је мерена на 700 nm на спектрофотометру насупрот слепој проби. Слепа проба садржи све растворе и реагенсе осим растворе узорка и стандарда. Исти поступак је поновљен и са аскорбинском киселином која је коришћена као позитивна контрола ради упоређивања активности. Повећање апсорбанције раствора смеше показује колико је редукујућа моћ увећана. Сва мерења су поновљена по три пута, а резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.

### 3.5.5. Одређивање инхибиције липидне пероксидације

Антиоксидативна активност ће бити одређена тиоцијанатном методом (155). Ова спектрофотометријска метода анализе липидних пероксида се заснива на оксидацији феро ( $\text{Fe}^{2+}$ ) до фери ( $\text{Fe}^{3+}$ ) јона и накнадним комплексирањем са тиоцијанатима. Као референтни стандарди ће се користити аскорбинска киселина, гална киселина, бутилхидрокситолуен и  $\alpha$ -токоферол.

#### *Раствори и реагенси*

Линолеинска киселина (25 mg/ml)

Фосфатни пуфер (50 mM, pH=7.4)

$\text{NH}_4\text{SCN}$  (30%)

$\text{FeCl}_3$  (3,5%)

Етанол

#### *Поступак*

Направљене су серије двоструких разблажења узорка и стандарда од основног раствора концентрације 1000  $\mu\text{g/ml}$  (1000, 500, 250, 125, 62,50, 31,25, 16,125  $\mu\text{g/ml}$ ). Направи се реакциона смеша 0,2 ml узорка екстракта (концентрација двоструких разблажења) са 0,2 ml емулзије линолеинске киселине (25 mg/ml у 99 % етанолу) и 0,4 ml фосфатног пуфера (50 mM, pH=7.4). Затим се смеша инкубира у мраку 72 h на температури од 40 °С. Након тога се узима аликвота реакционе смеше од 0,1 ml и додаје 3 ml етанола (70%) и 0,1 ml амонијум тиоцијаната (30 %). Тачно 3 минута након додавања

0,1 ml гвожђе III хлорида (20 mM у 3,5% хлороводоничној киселини) мери се апсорбанца црвено обојене смеше на 500 nm.

Процент инхибиције пероксидације линолеинске киселине биће израчунат преко формуле:

$$\text{Инхибиција липидне пероксидације (\%)} = \frac{A_k - A_c}{A_k} \times 100$$

при чему је  $A_k$  апсорбанца контроле, која се припрема као и узорци, само што се уместо испитиваног раствора додаје иста запремина етанола, а  $A_c$  представља апсорбанцу узорка или стандарда. Као референтни стандарди користити су се аскорбинска киселина, гална киселина, бутилхидрокситолуен и  $\alpha$ -токоферол. Из једначине линеарне регресије су израчунате  $IC_{50}$  вредности ( $\mu\text{g/ml}$ ), дефинисана као концентрација екстракта која липидну пероксидацију инхибира за 50%. Све анализе су поновљење три пута а резултати приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација три мерења.

### 3.6. Испитивање антитуморске активности екстраката

Антитуморски потенцијал ацетонских и метанолских екстраката врста лишцајева: *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* процењен је коришћењем МТТ теста испитивањем вијабилности и пролиферације на ћелијама: аденокарцином цервикса (Hela S<sub>3</sub>) и пролиферације на меланом (LS174).

#### 3.6.1. Ћелијске линије

У циљу испитивања антитуморске активности екстраката лишцајева користиће се Hela S<sub>3</sub> (аденокарцином цервикса) и LS174 (ћелије карцинома дебелог црева). Ћелијске линије су набављене од установе *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, Сједињене Америчке Државе). Hela и LS174 ћелијске линије су култивисане у хранљивом медијуму RPMI-1640, pH 7,2, у који се додаје 10 ml/100 ml феталног говеђег серума термички инактивисан током 30 минута на 56°C (*Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA*), уз додатак 3 mmol/L L-глутамин, 100 mg/ml стрептомицин, 100 IU/ml пеницилин, и HEPES (25 mM). Ћелијске културе су гајене у инкубатору у атмосфери засићеној воденом паром, у присуству 5% CO<sub>2</sub>, на температури од 37°C.

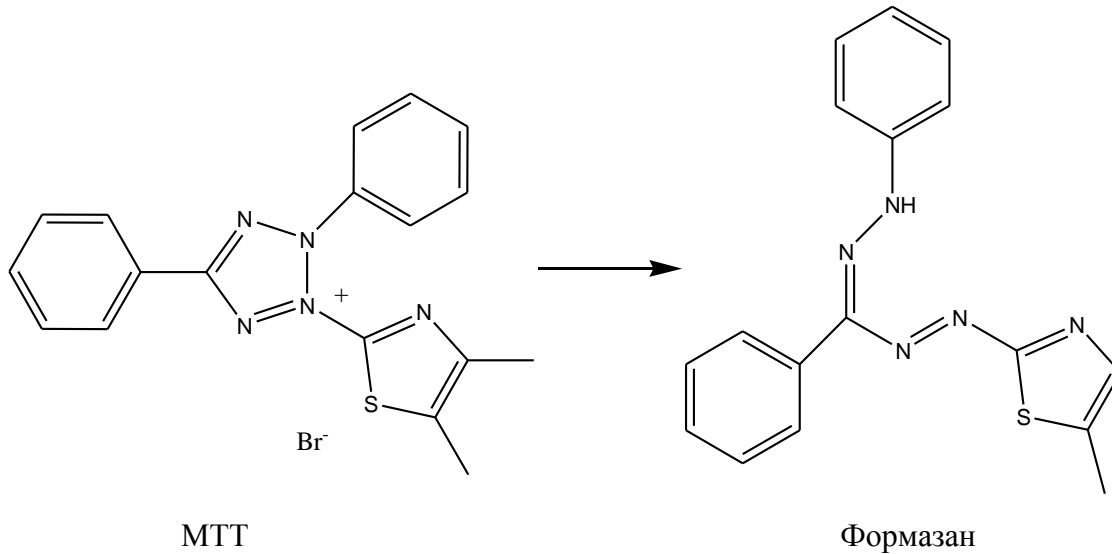
### 3.6.2. Експериментални дизајн

Испитивана једињења се најпре растворе у DMSO-у, до шток концентрације од (100 mg/ml). Након тога, једињења се са медијумом за култивацију ћелија разблажују до радних концентрација. Финалне концентрације испитиваних једињења биће: 200, 75, 25, и 10 µg/ml. Као контрола користи се хранљиви медијум.

Ћелије се засејавају у стерилне плоче за култивацију ћелија са 96 бунарчића. Густина ћелија по бунару у плочи за испитивање цитотоксичног ефекта екстраката лишјајева била је  $2 \times 10^4$  у 100µl хранљивог медијума, док су ћелије у плочи за испитивање цитостатичног ефекта екстраката лишјајева сађене у густини  $0,5 \times 10^4$  по бунару, такође у по 100 µl хранљивог медијума. Ћелије су инкубирани 24 часа у атмосфери засићеној воденом паром на 37°C и са 5 % CO<sub>2</sub>. Након 24 h у бунарчиће је додавана одговарајућа концентрација испитиваних екстраката лишјајева. Свака концентрација је испитивана у тетрапликату. Као негативна контрола, прате се ћелије које расту само у медијуму за култивацију, док као позитивна контрола ћелијама додат је сапонин који се користи као стандард за цитотоксични ефекат. Ћелије су инкубирани са испитиваним екстрактима лишјајева, као и контролама наредних 24 h а након тога је урађен МТТ тест вијабилности. У тесту пролиферације (цитостатичности) ћелије су инкубирани са испитиваним екстрактима лишјајева, као и контролама 72 h, након чега је урађен МТТ тест пролиферације. Негативну контролу чиниле су ћелије које су инкубирани у хранљивом медијуму док је као позитивна контрола ћелијама додат *cis*-диаминдихлороплатина који се користи као стандард за цитостатичан ефекат.

### 3.6.3. МТТ тест

МТТ тест представља често коришћен стандардни *in vitro* тест за испитивање вијабилности и пролиферације ћелија (156). Базира се на редукцији тетразолијумових соли. МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолијум бромид) је жута тетразолијумска со која се у живим, биохемијски активним ћелијама редукује (редукује митохондријалне сукцинат дехидрогеназе метаболички активних ћелија) до формазана, нерастворног кристала љубичасте боје. Количина раствореног формазана директно је пропорционална броју живих ћелија. Резултујући љубичасти интраћелијски формазан може бити читаван спектрофотометријски.



**Слика 13.** Редукција МТТ митохондријалном редуктазом до формаза

*Поступак*

По завршетку инкубације ћелија са екстрактима, ћелије су испране са по 100  $\mu$ l PBS-а (раствор фосфатног пуфера) и додат је МТТ (20  $\mu$ l). Након 4h инкубације на 37<sup>0</sup>С, обојени кристали формаза су растворени у 100  $\mu$ l 2-пропанола. Мерење редукције (апсорбанце) МТТ-а вршено је спектрофотометријски на таласној дужини од 540 nm на вишеканалном спектрофотометру (Multiskan Ascent N<sup>o</sup>354, Thermo Labsystems, Финска). Резултати су представљени као интензитет редукције МТТ-а у односу на негативну контролу. Узето је да је апсорбанца контроле 100% и у односу на њу су израчунате процентуалне вредности екстраката у односу на контролу по формули:

% вијабилности/пролиферације екстраката = вредности апсорбанце третираних ћелија са екстрактом или позитивне контроле / вредност апсорбанце негативне контроле X 100

Постоји директна пропорционалност између броја вијабилних ћелија и интензитета љубичасте боје утврђеним спектрофотометријским мерењем апсорбанце. Смањен ниво редукованог МТТ-а указује на смањење ћелијске вијабилности и пролиферације, што је последица токсичног ефекта испитиваних екстраката лишажева. Антитуморска активност је изражена као IC<sub>50</sub> вредност. IC<sub>50</sub> вредност се дефинише као концентрација која за 50% инхибира ћелијско преживљавање односно инхибира ћелијски раст. Резултати су представљени као аритметичка средина тетрапликата за сваку концентрацију  $\pm$  стандардна девијација.

### 3.7. Статистичка обрада података

Статистички софтвер SPSS (верзија 20) коришћен је за анализу добијених података. Резултати су приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна девијација три аналитичка мерења. Једнофакторска анализе варијансе (АНОВА) коришћена је за утврђивање постојања статистичке значајности средњих вредности мерења. Накнадним *Tukey HSD* тестом је утврђивано између којих конкретно група постоји статистички значајна разлика. У свим статистичким анализама, интервал поверења је 95% са статистичком значајношћу од  $\alpha < 0,05$ .  $IC_{50}$  вредности су израчунате регресионом анализом. Израчуната је једначина регресионе праве ( $y=a+bx$ ), при чему вредности  $x$  представљају различите концентрације екстракта, а  $y$  вредности представља проценат инхибиције.



## **4. РЕЗУЛТАТИ**

Испитивања три врсте лишајева обухватала су припрему узорка за екстракцију, екстракцију са два различита растварача (ацетон и метанол), испитивање хемијског састава добијених екстраката као и испитивање деловања екстраката лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*. Испитивање хемијског састава ацетонских и метанолских екстраката обухватао је *HPLC-UV* анализу екстраката као и одређивање укупног садржаја фенола и флавоноида у екстрактима. Испитивање деловања екстраката обухватало је евалуацију антиоксидативне активности праћењем укупног антиоксидативног капацитета, способности неутрализације DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) радикала, способности неутралисања хидроксил радикала, редукционог потенцијала и инхибиције липидне пероксидације као и антитуморски потенцијал испитиваних екстраката: цитотоксичности и цитостатичности према Hela S3 ћелијама и цитостатичности према LS174 одређен МТТ тестом.

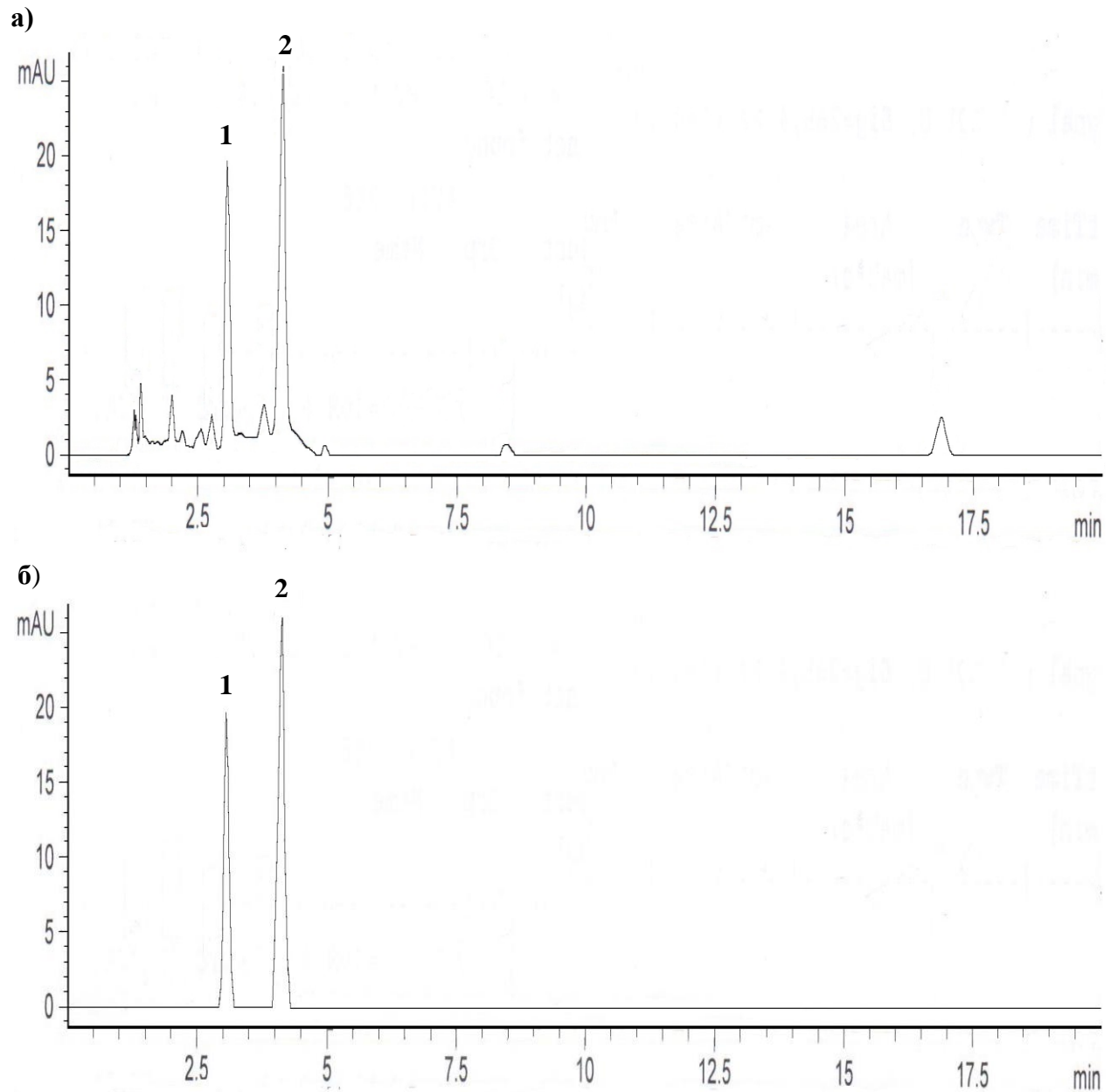
#### **4.1. *HPLC-UV* анализа екстраката лишаја *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata***

У циљу идентификације најзаступљенијих компоненти испитиваних екстраката врста лишаја коришћена је *HPLC-UV* метода.

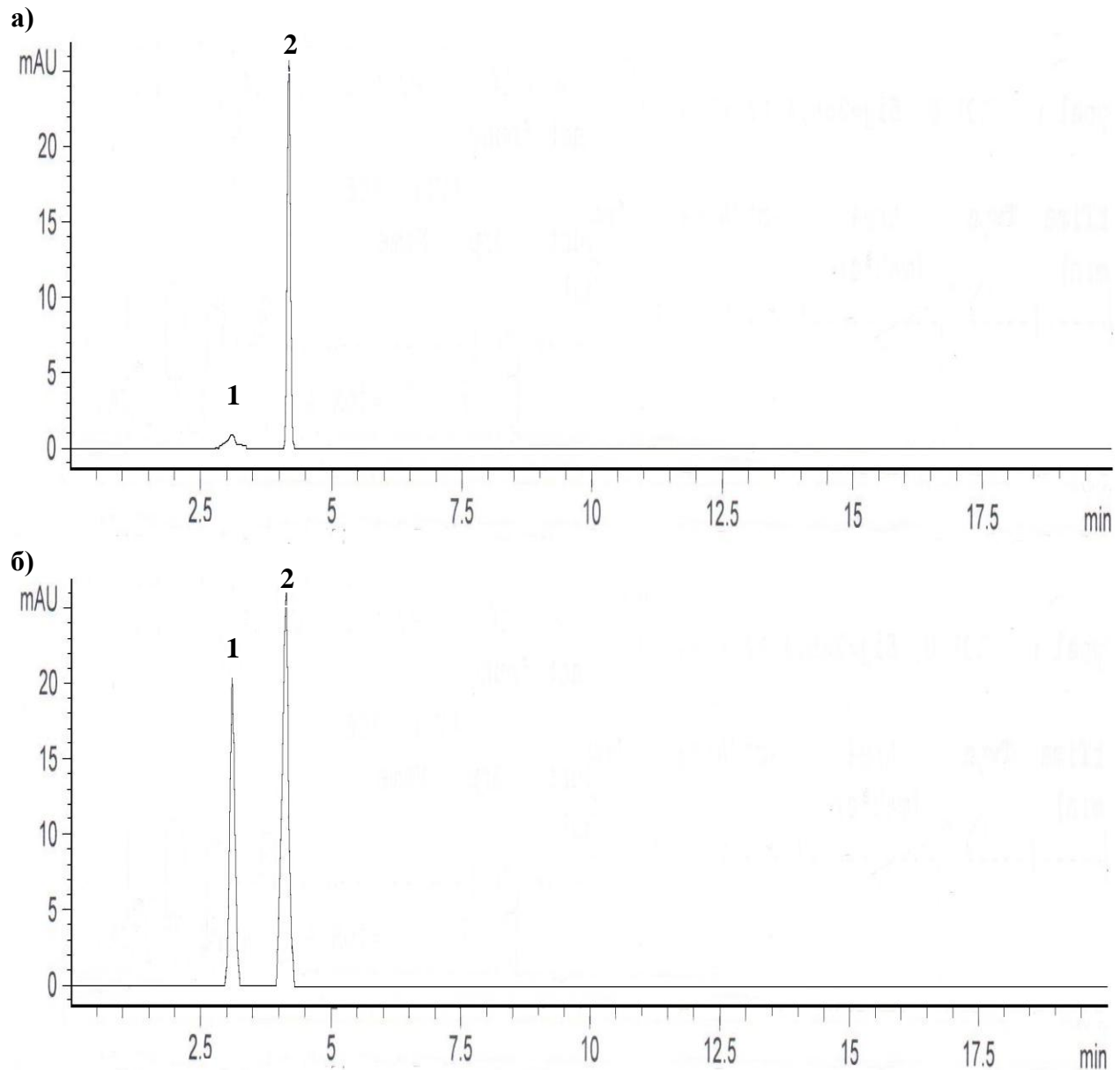
##### **4.1.1. *HPLC-UV* анализа екстраката врсте лишаја *Cladonia subulata***

На сликама 14 и 15 приказани су *HPLC* хроматограми ацетонских и метанолских екстраката лишаја *Cladonia subulata* и стандардних супстанци снимљени на 254 nm. Резултати *HPLC* анализе ових екстраката лишаја *Cladonia subulata* указује на присуство два метаболита: хипопротоцетраринске киселине ( $t_R = 3,10 \pm 0,20$  min) и фумаропротоцетраринске киселине ( $t_R = 4,14 \pm 0,10$  min). Идентификација ових једињења је постигнута поређењем њихових ретенционих времена ( $t_R$ ) са ретенционим временима стандарда који су претходно изоловани из лишајева и чија је структура потврђена спектроскопским методама. Идентификација метаболита лишајева извршена је и на основу упоређивања *UV* спектра (200-400 nm) стандарда са *UV* спектрима конституената екстраката. Интензитет сигнала наведених метаболита у њиховим *HPLC* хроматограмима био је различит и специфичан за сваки екстракт. *HPLC* хроматограм ацетонског екстракта лишаја *Cladonia subulata* показује да је сигнал (пик) од фумаропротоцетраринске киселине

интезивнији од сигнала хипопротоцетраринске киселине. *HPLC* анализом ацетонског екстракта одређено је да површина испод апсорпционог сигнала фумаропротоцетраринске киселине изражена у процентима износи 46,236 %, док хипопротоцетраринске износи 22,2627 %, што представља површину сигнала подељену са сумом свих површина (свих пикова) и множењем са 100. Анализом *HPLC* хроматограма метанолског екстракта лишаја *Cladonia subulata* такође су идентификовани депсидони хипопротоцетраринска и фумаропротоцетраринска киселина. Интезитет сигнала фумаропротоцетраринске киселине је знатно доминатнији (већег интезитета) у односу на интезитет хипопротоцетраринске киселине (низак интезитет сигнала). *HPLC* анализа метанолског екстракта *C. subulata* показује да површина испод апсорпционог сигнала (ПС) фумаропротоцетраринске киселине изражена у процентима износи 90,8733 %, док ПС хипопротоцетраринске киселине износи 9,1267 %. Поред ова два једињења у анализираном ацетонском екстракту лишаја уочавају се и други сигнали који су знатно слабијег интезитета од идентификованих сигнала.



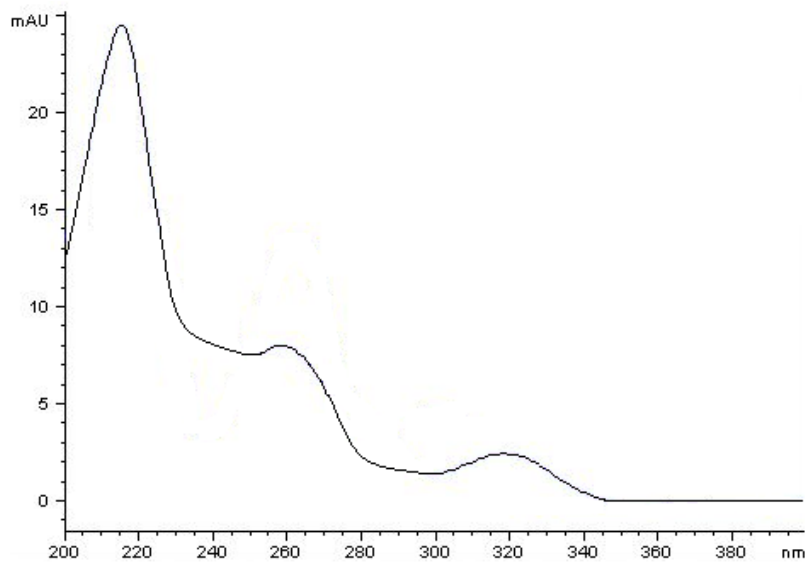
**Слика 14.** а) *HPLC* хроматограм ацетонског екстракта врсте лишаја *Cladonia subulata* снимљен на 254 nm б) *HPLC* хроматограм смеше стандардних супстанци снимљен на 254 nm. 1=хипопротоцетраринска киселина ( $t_R = 3,10 \pm 0,20$  min); 2=фумаропротоцетраринска ( $t_R = 4,14 \pm 0,10$  min);



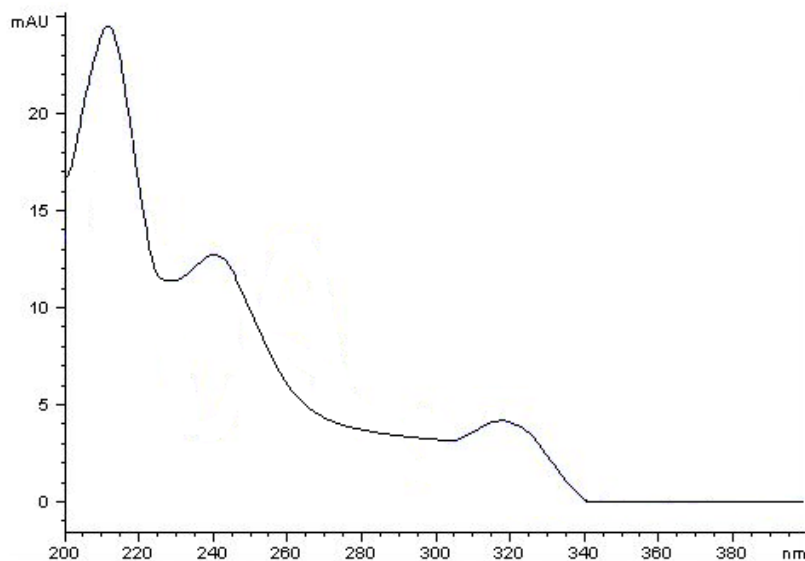
**Слика 15.** а) *HPLC* хроматограм метанолског екстракта врсте лишаја *Cladonia subulata* снимљен на 254 nm б) *HPLC* хроматограм смеше стандардних супстанци снимљен на 254 nm. 1=хипопротоцетраринска киселина ( $t_R = 3,10 \pm 0,20$  min); 2=фумаропротоцетраринска ( $t_R = 4,14 \pm 0,10$  min);

На сликама 16 и 17 приказани су *UV* спектри хипопротоцетраринске киселине и фумаропротоцетраринске киселине. Анализом *UV* спектара (200-400 nm) потврђено је присуство хипопротоцетраринске киселине где се уочавају апсорпциони максимуми на следећим таласним дужинама: 216, 258 и 320 nm који су карактеристични за

хипопротоцетраринску киселину. *UV* спектар фумаропротоцетраринске киселине има три апсорпциона максимума на таласним дужинама 212, 240 и 318.



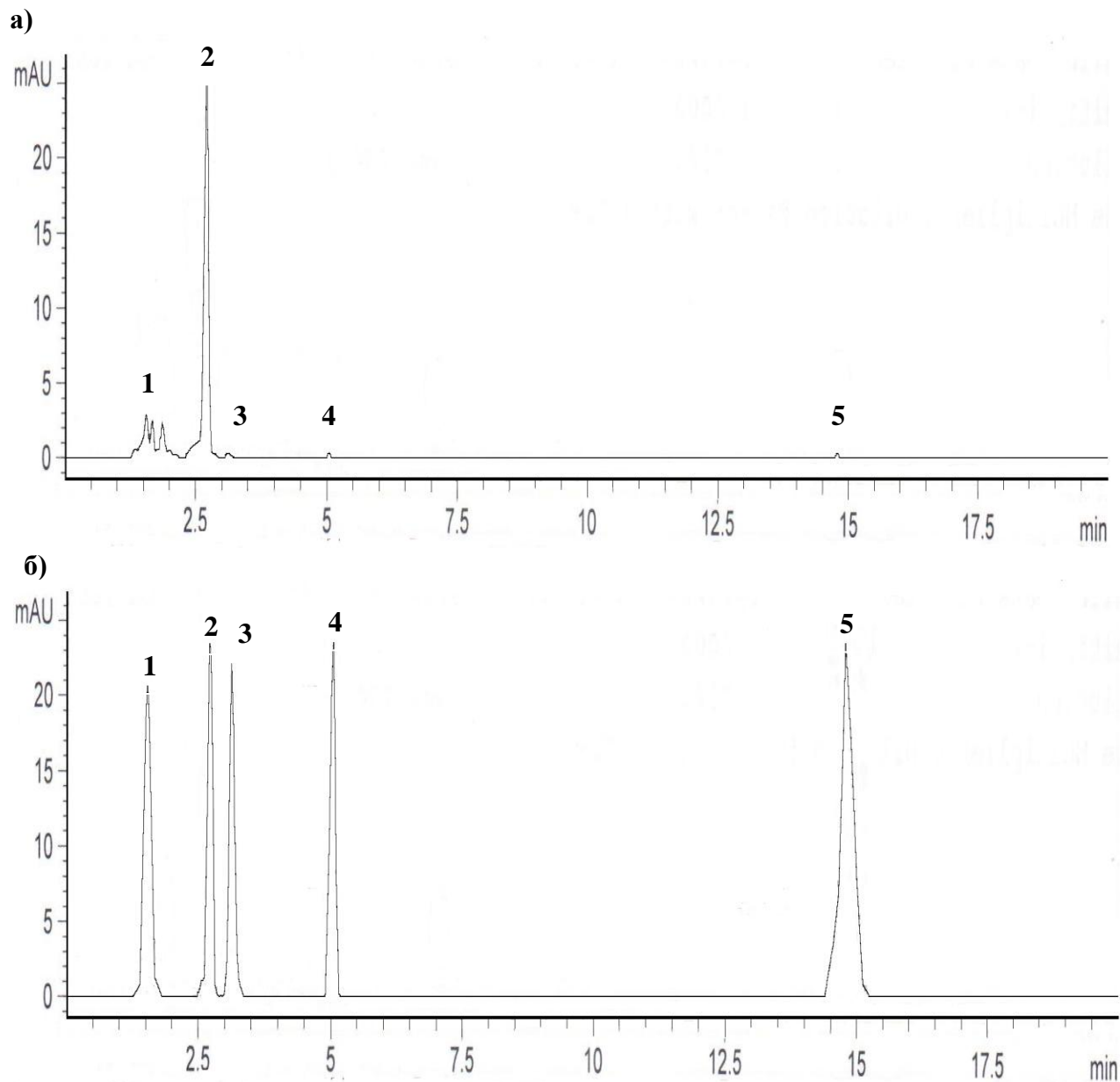
**Слика 16.** *UV* спектар хипопротоцетраринске киселине са апсорпционим максимумима на 216, 258 и 320 nm



**Слика 17.** *UV* спектар фумаропротоцетраринске киселине са апсорпционим максимумима на 212, 240 и 318 nm

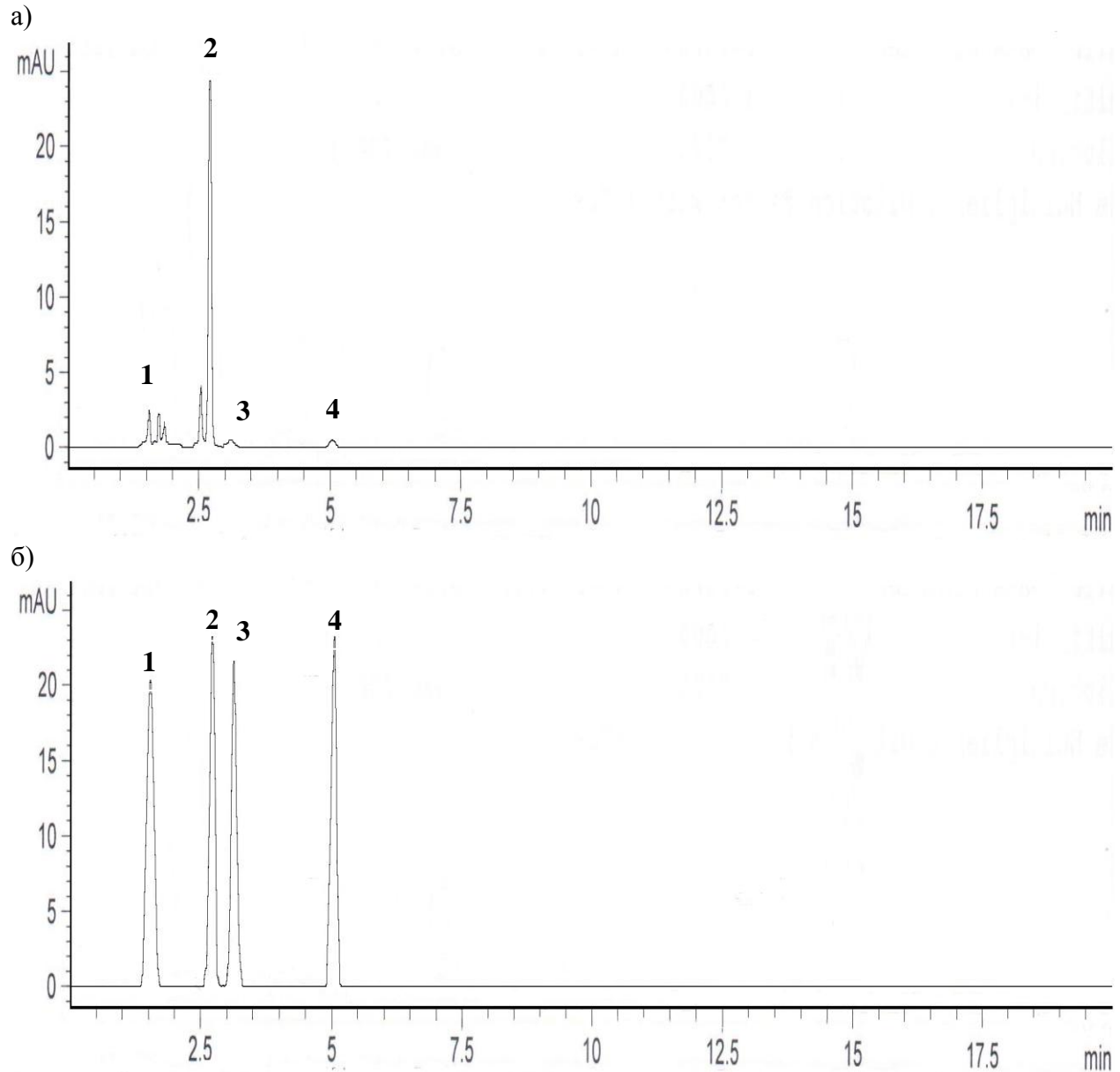
**4.1.2. HPLC-UV анализа екстраката врсте лишаја *Pleurosticta acetabulum***

На сликама 18 и 19 приказани су *HPLC* хроматограми ацетонских и метанолских екстраката лишаја *Pleurosticta acetabulum* и стандардних супстанци за поређење снимљени на 254 nm. На основу хроматограма и *UV* спектра (200-400 nm) у овим екстрактима уочава се присуство салазинске киселине ( $t_R = 1,56 \pm 0,20$  min), норстихнинске киселине ( $t_R = 2,70 \pm 0,10$  min), протоцетраринске киселине ( $t_R = 3,24 \pm 0,20$  min), евернијске киселине ( $t_R = 5,08 \pm 0,10$  min) и атранорина ( $t_R = 14,88 \pm 0,10$  min). Као најдоминантнији пик (сигнал највећег интензитета) и у ацетонском и у метанолском екстракту издваја се сигнал од депсидона норстихнинске киселине. Сигнали од протоцетраринске киселине (депсидон), евернијске киселине (депсид) и атранорина (депсид) су веома малог интензитета и представљају пратеће супстанце у хроматограму. Однос интензитета идентификованих метаболита у ацетонском екстракту је сличан у метанолском екстракту лишаја *Pleurosticta acetabulum*. *HPLC* анализом ацетонског екстракта одређено је да површина испод апсорпционог сигнала норстихнинске киселине изражена у процентима износи 75,4109 %, салазинске: 3,3801 %, протоцетраринске киселине: 0,4812%, евернијске: 0,18% и атранорина: 1,0417%. Анализом *HPLC* хроматограма метанолског екстракта уочава се одсуство атранорина. *HPLC* анализа метанолског екстракта показује да површина испод апсорпционог сигнала (ПС) норстихнинске киселине изражена у процентима износи 71,8856%, салазинске киселине: 5,3643 %, протоцетраринске: 0,7399 % и евернијске киселине: 1,4268 %. Поред идентификованих једињења у анализираном екстрактима лишаја *Pleurosticta acetabulum* уочавају се и други неидентификовани сигнали који су слабијег интензитета.



**Слика 18.** а) *HPLC* хроматограм ацетонског екстракта врсте лишаја *Pleurosticta acetabulum* снимљен на 254 nm б) *HPLC* хроматограм смеше стандардних суптанци снимљен на 254 nm, 1= салазинска киселина ( $t_R = 1,56 \pm 0,20$  min); 2= норстихнинска киселина ( $t_R = 2,70 \pm 0,10$  min); 3= протоцетраринска киселина ( $t_R = 3,24 \pm 0,20$  min); 4= евернијска киселина ( $t_R = 5,08 \pm 0,10$  min); 5= атранорин ( $t_R = 14,88 \pm 0,10$  min);

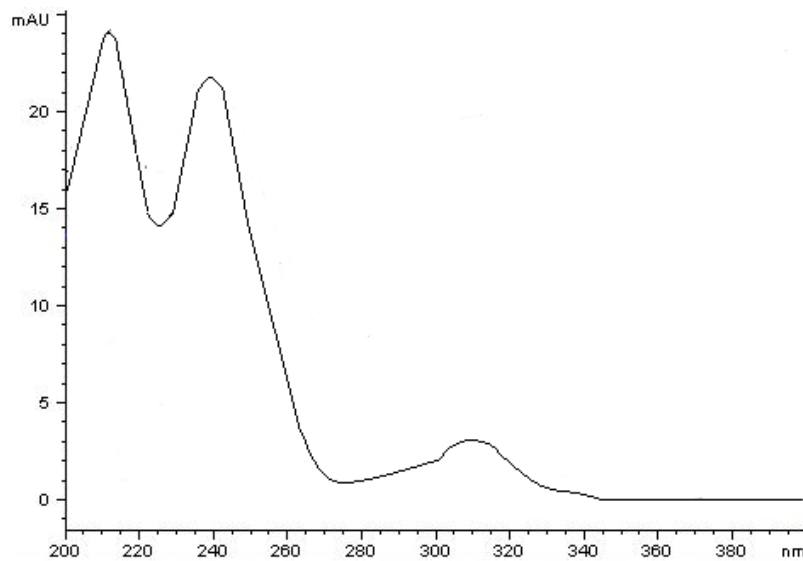




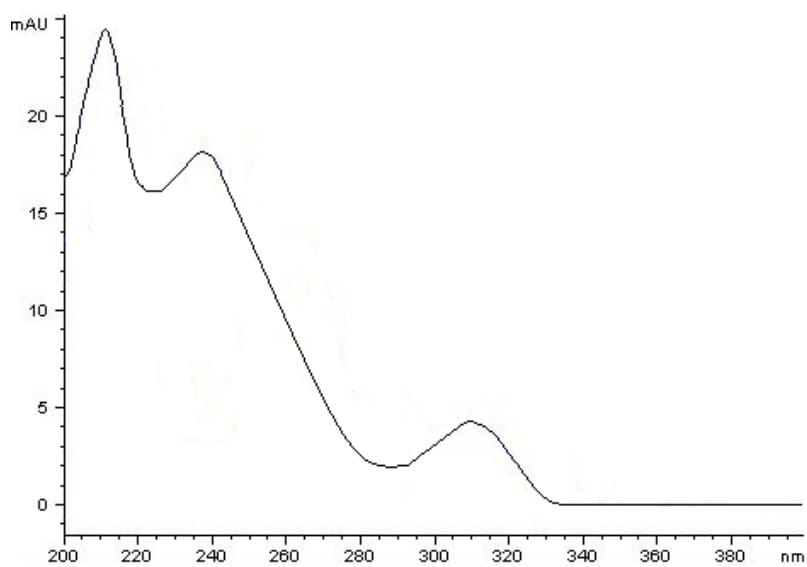
**Слика 19.** а) *HPLC* хроматограм метанолског екстракта врсте лишаја *Pleurosticta acetabulum* снимљен на 254 nm б) *HPLC* хроматограм смеше стандардних супстанци снимљен на 254 nm. 1= салазинска киселина ( $t_R = 1,56 \pm 0,20$  min); 2= норстихнинска киселина ( $t_R = 2,70 \pm 0,10$  min); 3= протоцетраринска киселина ( $t_R = 3,24 \pm 0,20$  min); 4=евернијска киселина ( $t_R = 5,08 \pm 0,10$  min);

Идентификација метаболита извршена је и на основу упоређивања *UV* спектара (200-400 nm) стандарда са *UV* спектрима конституената екстракта лишаја *Pleurosticta acetabulum*. На сликама од 20 до 24 приказани *UV* спектри метаболита лишаја *Pleurosticta*

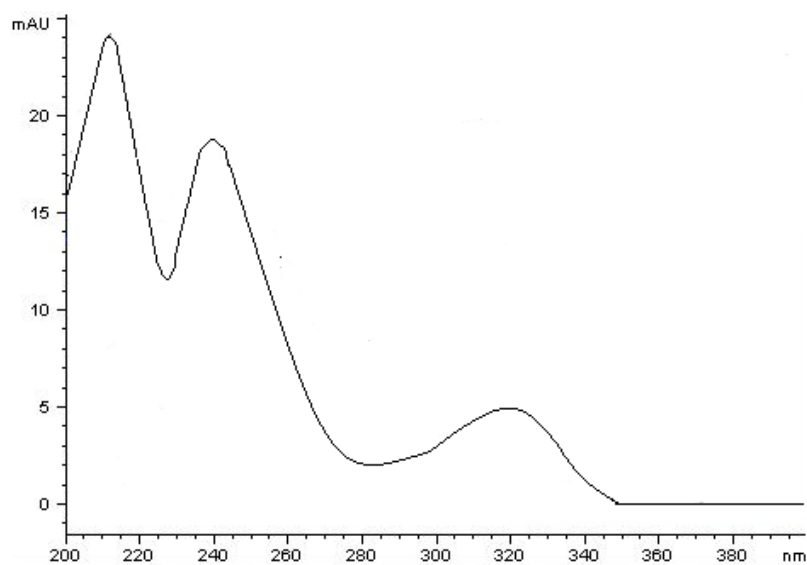
*acetabulum* (норстихнинске киселине, салазинске киселине, протоцетраринске киселине, евернијске киселине и атранорин). *UV* спектар норстихнинске киселине има три апсорпциона максимума на таласним дужинама: 212, 239 и 310 nm. *UV* спектри салазинске киселине (са апсорпционим максимумима на 213, 238 и 312 nm) и протоцетраринске киселине (са апсорпционим максимумима на 212, 242 и 320 nm) су слични *UV* спектру норстихнинске киселине јер сва три метаболита припадају групи  $\beta$ -орцинолдепсидонима. Апсорпциони максимуми на 213, 270 и 305 nm карактеристични су за евернијску киселину, док су апсорпциони максимуми на 210, 252 и 321 nm карактеристични за атранорин.



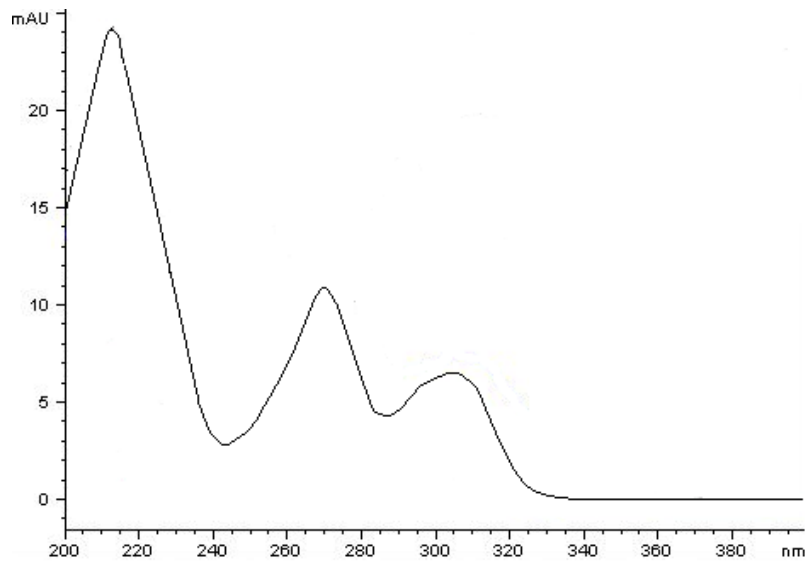
**Слика 20.** *UV* спектар норстихнинске киселине са апсорпционим максимумима на 212, 239 и 310 nm



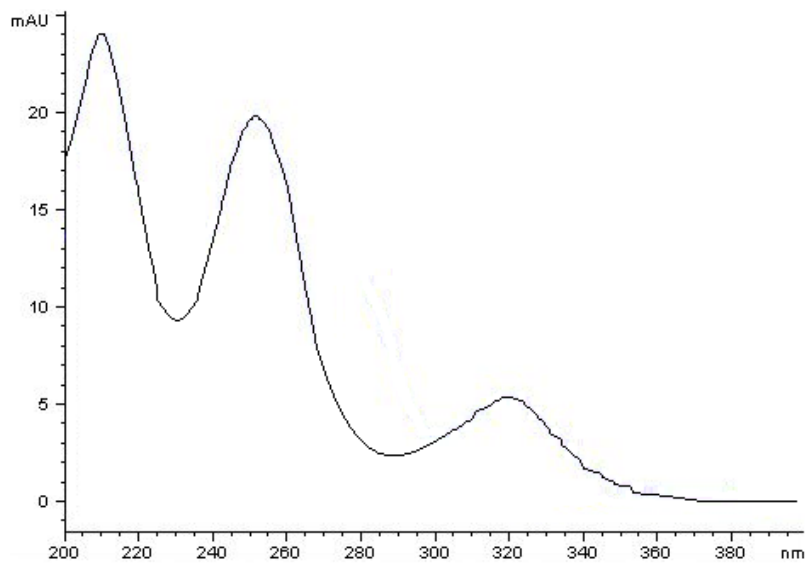
Слика 21. UV спектар салазинске киселине са апсорпционим максимумима на 213, 238 и 312 nm



Слика 22. UV спектар протоцетраринске киселине са апсорпционим максимумима на 212, 242 и 320 nm



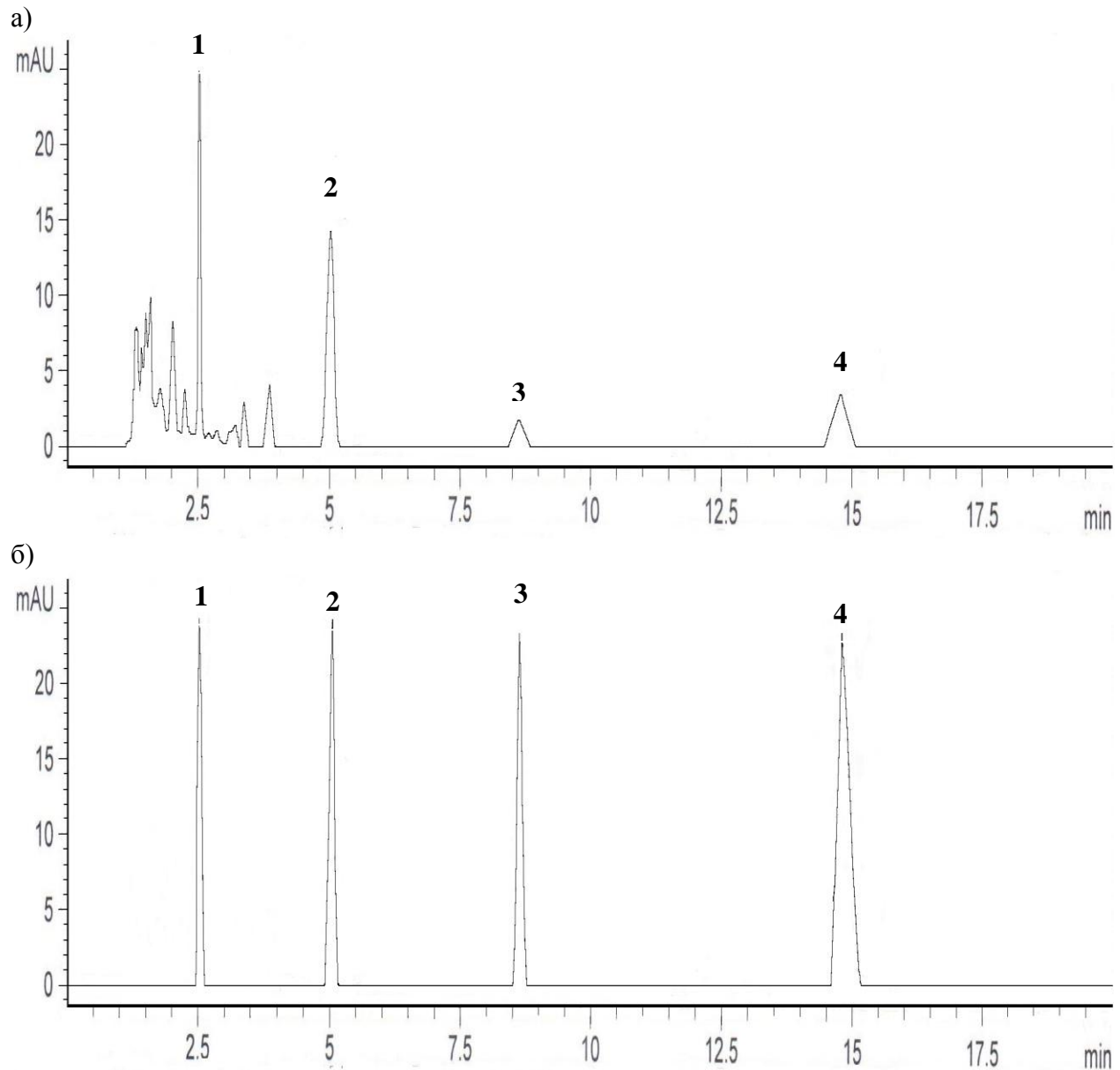
Слика 23. UV спектар евернијске киселине са апсорпционим максимумима на 213, 270 и 305 nm



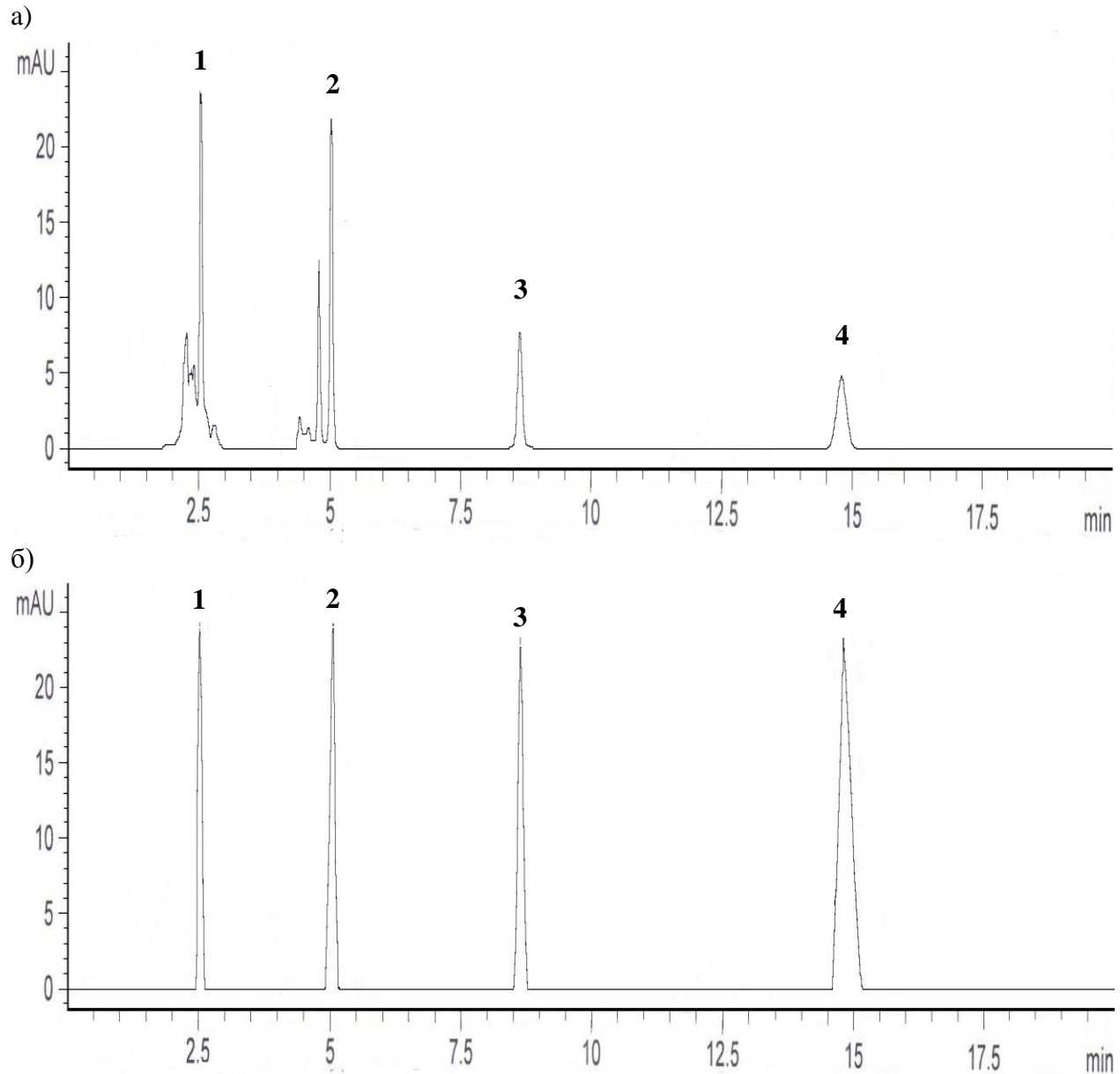
Слика 24. UV спектар атранорина са апсорпционим максимумима на 210, 252 и 321 nm

**4.1.3. HPLC-UV анализа екстраката врсте лишаја *Physcia semipinnata***

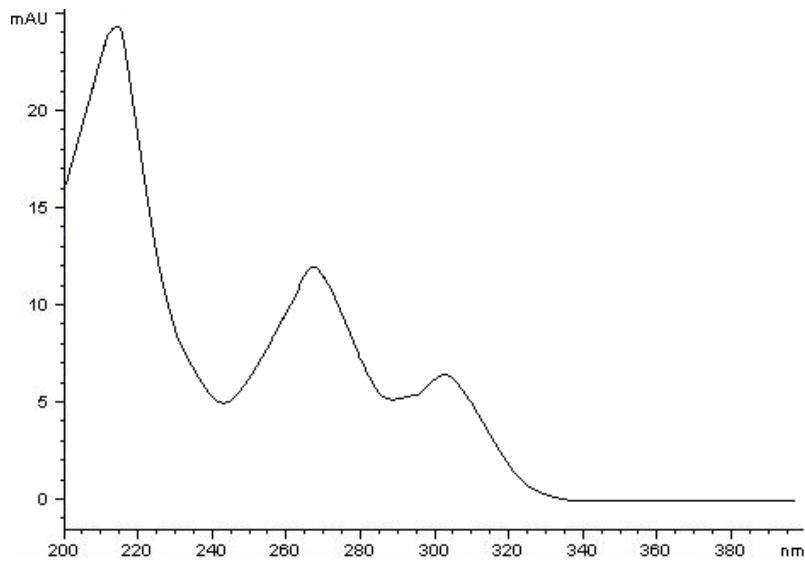
На сликама 25 и 26 приказани су *HPLC* хроматограми испитиваних екстраката лишаја *Physcia semipinnata* и стандардних супстанци снимљени на 254 nm. У *HPLC* хроматограмима и ацетонског и метанолског екстракта идентификовани су исти метаболити. Најдоминатнији пикови у ацетонском и метанолском екстракту налазе на ретенционим временима  $\pm$  стандардна девијација,  $t_R = 2,50 \pm 0,10$  min и  $t_R = 5,08 \pm 0,10$  min потичу од леканорне киселине и евернијске киселине. Осим ових сигнала у *HPLC* хроматограмима идентификовани су и сигнали средње до слабог интензитета који потичу од обтусинске киселине ( $t_R = 8,62 \pm 0,10$  min) и атранорина ( $t_R = 14,88 \pm 0,10$  min). Идентификација конституената екстраката је извршена компарацијом ретенционих времена и *UV* спектра конституената са стандардима ( $\lambda = 200\text{--}400$  nm). Процентуална заступљеност идентификованих метаболита у ацетонском екстракту израчуната преко површине испод апсорпционог сигнала износи за леканорну киселину: 32,8223 %, евернијска киселина: 31,8720 %, обтусинска киселина: 7,6555 %, и за атранорин: 11,0315 %. *HPLC* анализа метанолског екстракта показује да површина испод апсорпционог сигнала леканорне киселине изражене у процентима износи за леканорну киселину: 29,1190 %, евернијска киселина 34,8091 %, обтусинска киселина: 8,3992 %. и атранорина 13,5436 %. Поред идентификованих једињења у анализираном екстрактима лишаја *Physcia semipinnata* уочавају се и други неидентификовани сигнали који су слабијег интензитета. На сликама 27 и 28 приказани су *UV* спектри леканорне киселине која има три апсорпциона максимума на таласним дужинама 216, 268 и 308 nm и обтусинске киселине која такође има три апсорпциона максимума на таласним дужинама 212, 278 и 312 nm. У горњем делу текста приказани су *UV* спектри евернијске киселине (слика 23) и атранорин (слика 24) јер су идентификовани и у екстрактима лишаја *Pleurosticta acetabulum*.



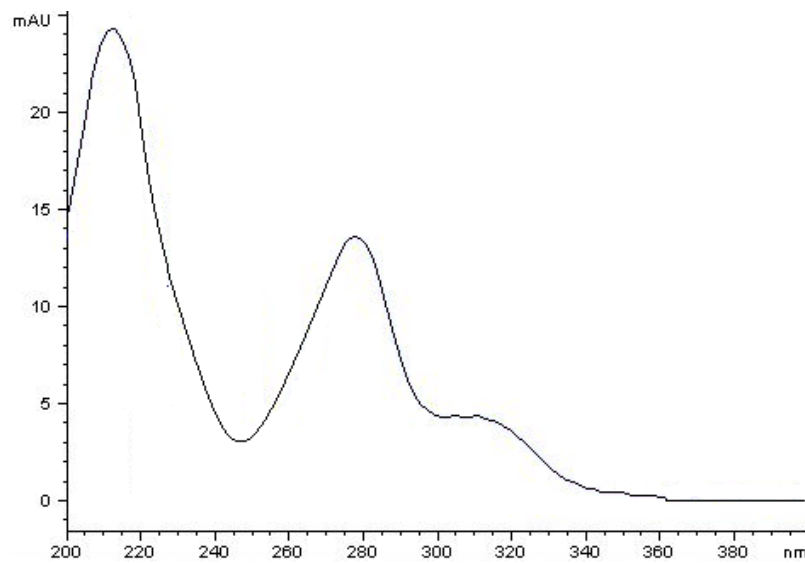
**Слика 25.** а) *HPLC* хроматограм ацетонског екстракта врсте лишаја *Physcia semipinnata* снимљен на 254 nm б) *HPLC* хроматограм смеше стандардних супстанци снимљен на 254 nm 1= леканорна киселина ( $t_R = 2,50 \pm 0,10$ ); 2= евернијска киселина ( $t_R = 5,08 \pm 0,10$ ); 3= обтусинска киселина ( $t_R = 8,62 \pm 0,10$  min); 4= атранорин ( $t_R = 14,88 \pm 0,10$  min).



**Слика 26.** а) *HPLC* хроматограм метанолског екстракта врсте лишаја *Physcia semipinnata* снимљен на 254 nm б) *HPLC* хроматограм смеше стандардних супстанци снимљен на 254 nm, 1= леканорна киселина ( $t_R = 2,50 \pm 0,10$ ); 2= евернијска киселина ( $t_R = 5,08 \pm 0,10$ ); 3= обтусинска киселина ( $t_R = 8,62 \pm 0,10$  min); 4= атранорин ( $t_R = 14,88 \pm 0,10$  min);



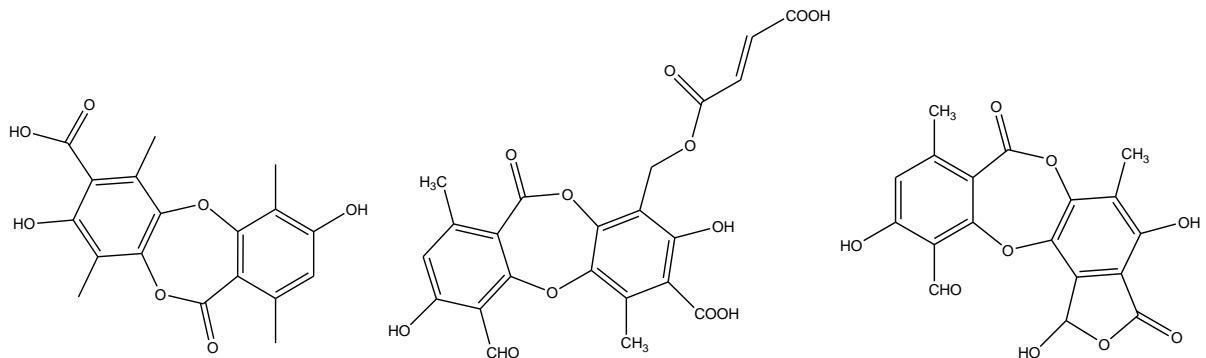
**Слика 27.** UV спектар леканорне киселине са три апсорпциона максимума на таласним дужинама 216, 268 и 308 nm



**Слика 28.** UV спектар обтусинске киселине са три апсорпциона максимума на таласним дужинама 212, 278 и 312 nm

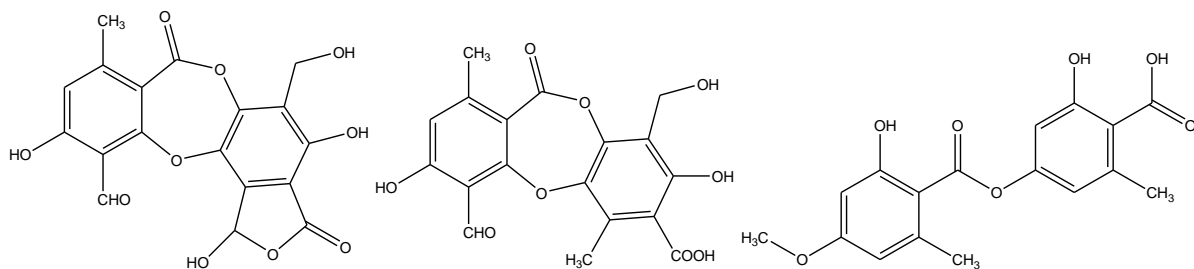


Структуре идентификованих једињења у врстама лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* приказане су на слици 29.



Хипопротоцетраринска кис. Фумаропротоцетраринска кис.

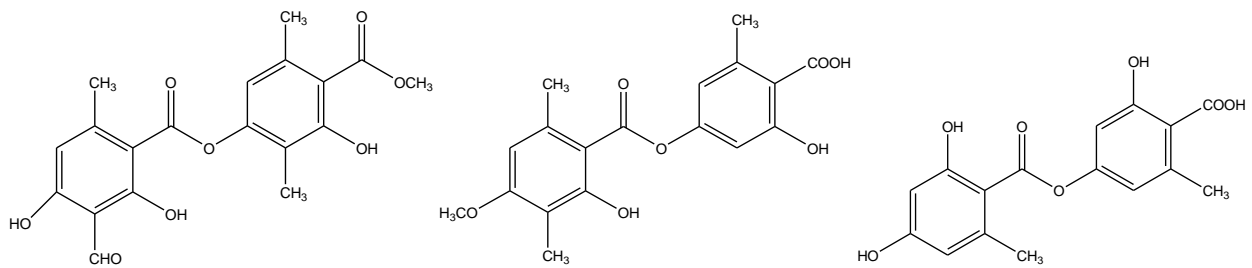
Норстихнинска кис.



Салазинска кис.

Протоцетраринска кис.

Евернијска кис.



Атранорин

Обтусинска кис.

Леканорна кис.

Слика 29. Структуре идентификованих једињења

Табела 5. Ретенциона времена идентификованих метаболита и њихови апсорпциони максимуми

Компоненте	Класа компоненте	Ретенционо време ( $t_R \pm SD$ ) <sup>*</sup> (min)	Апсорпциони максимуми (nm) UV спектра
Хипопротоцетраринска киселина	Депсидон	3,10±0,20	216, 258, 320
Фумаропротоцетраринска киселина	Депсидон	4,14±0,10	212, 240, 318
Салазинска киселина	Депсидон	1,56±0,20	213, 238, 312
Норстихнинска киселина	Депсидон	2,70±0,10	212, 239, 310
Протоцетраринска киселина	Депсидон	3,24±0,20	212, 242, 320
Евернијска киселина	Депсид	5,08±0,10	213, 270, 305
Атранорин	Депсид	14,88±0,10	210, 252, 321 <sup>m</sup>
Леканорна киселина	Депсид	2,50±0,10	216, 268, 308
Обтусинска киселина	Депсид	8,62±0,10	212, 278, 312

#### 4.2. Одређивање укупног фенолног и флавоноидног садржаја у екстрактима лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*

Одређивање садржаја фенола и флавоноида у испитиваним екстрактима одређен је спектрофотометријским методама. Као стандарди су коришћени гална киселина за укупне феноле и рутин за флавоноиде. Добијени резултати одређивања укупног фенолног садржаја су изражени преко mg еквивалената галне киселине по g сувог екстракта (mg EGA/g), односно за укупне флавоноиде mg еквивалената рутина по g сувог екстракта (mg ERU/g). Резултати одређивања садржаја укупних фенола и флавоноида ацетонских и метанолских екстраката дати су у табели бр. 6.

Табела 6. Садржај укупних фенола (УФ) и флавоноида (УФЛ), однос укупних флавоноида и фенола (УФЛ/УФ)

Лишај	Екстракт	УФ (mg EGA/g ±SD)	УФЛ (mg ERU/g ±SD)	(УФЛ/УФ)100 (%)
<i>C. subulata</i>	Ацетонски	39,97±0,89	12,65±0.51	31,64
	Метанолски	21,31±1,19	8,48± 0.57	39,79
<i>P. acetabulum</i>	Ацетонски	43,72±0,59	10,59±0.99	24,22
	Метанолски	73,45±0,82	15,42±0.55	20,99
<i>P. semipinnata</i>	Ацетонски	51,94±0,36	11,50± 0.71	37,10
	Метанолски	59,20± 2,13	19,27±0.37	19,42

Садржај укупних фенола у испитиваним ацетонским и метанолским екстрактима врста лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* кретао се у опсегу од 21,31±1,19 до 73,45±0,82 mg GA/g (mg галне киселине по g сувог екстракта), при чему је укупних фенола било највише у метанолском екстракту *P. acetabulum* а најмање метанолском екстракту *C. subulata*.

Садржај укупних флавоноида у испитиваним екстрактима врста лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* кретао се у опсегу 8,48±0,57 до 19,27±0,37 mg RU/g (mg рутина по g сувог екстракта). Укупни флавоноидни садржај је био највећи у метанолском екстракту *P. semipinnata* а најмањи у метанолском екстракту *C. subulata*.

#### 4.2.1. Укупни феноли и флавоноиди у испитиваним екстрактима врсте лишаја *Cladonia subulata*

Резултати укупног фенолног и флавоноидног садржаја ацетонских и метанолских екстраката лишаја *Cladonia subulata* приказани су на графику 1. Фенолни садржај ацетонског екстракта (39,97±0,89 mg GA/g) био је већи од метанолског (21,31±1,19 mg GA/g). Исти случај је био и код укупног флавоноидног садржаја где је ацетонски екстракт

( $12,65 \pm 0,51$  mg RU/g) показао већи флавоноидни садржај од метанолског ( $8,48 \pm 0,57$  mg RU/g).

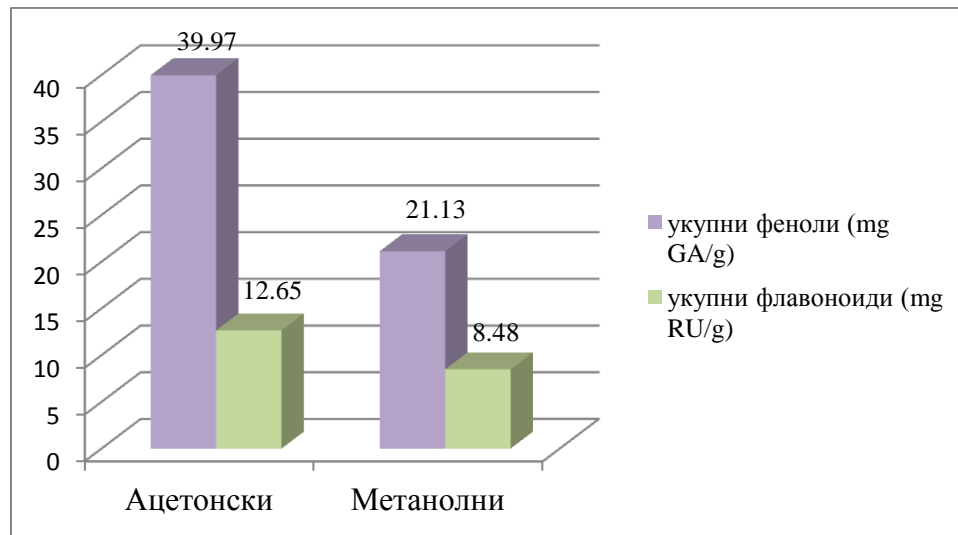
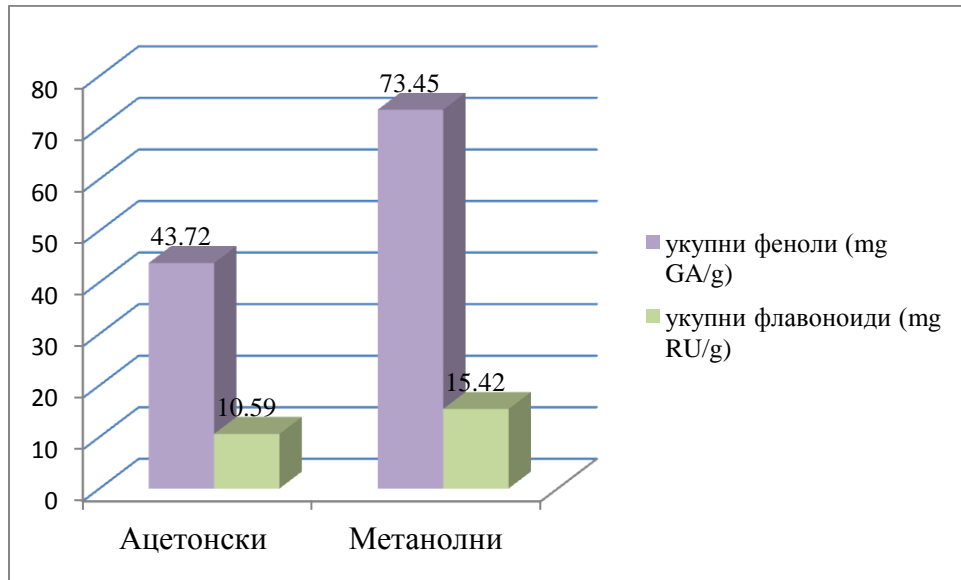


График 1. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима лишаја *Cladonia subulata*

#### 4.2.2. Укупни феноли и флавоноиди у испитиваним екстрактима лишаја *Pleurosticta acetabulum*

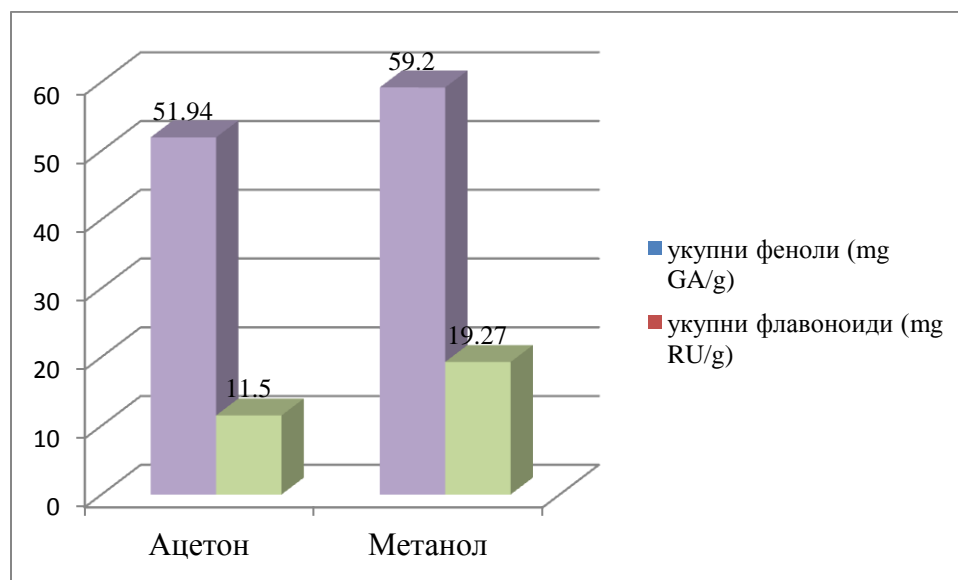
Резултати укупног флавоноидног и фенолног садржаја ацетонских и метанолских екстраката врсте *P. acetabulum* приказани су на графику 2. Садржај укупних фенола износио је у ацетонском екстракту  $43,72 \pm 0,59$  mg GA/g, док код метанолског је тај број био већи и износио је  $73,45 \pm 0,82$  mg GA/g. Флавоноидни садржај био је већи код метанолског екстракта ( $15,42 \pm 0,55$  mg RU/g) него код ацетонског екстракта ( $10,59 \pm 0,99$  mg RU/g).



**График 2.** Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима лишаја *Pleurosticta acetabulum*

#### 4.2.3. Укупни феноли и флавоноиди у испитиваним екстрактима лишаја *Physcia semipinnata*

Резултати укупног фенолног и флавоноидног садржаја ацетонских и метанолних екстраката врсте лишаја *Physcia semipinnata* приказани су на графику 3. Садржај укупних фенолних једињења у ацетонском екстракту ( $51,94 \pm 0,36$  mg GA/g) мањи је у односу на метанолни екстракт ( $59,20 \pm 2,13$  mg GA/g). Укупни садржај флавоноида у испитиваним екстрактима износио је за ацетонски  $11,50 \pm 0,71$  mg RU/g док је за метанолски био већи и износио је  $19,27 \pm 0,37$  mg RU/g .



**График 3.** Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима лишаја *Physcia semipinnata*

#### 4.3. Антиоксидативне активности екстраката *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*

##### 4.3.1. Укупан антиоксидативни капацитет испитиваних екстраката

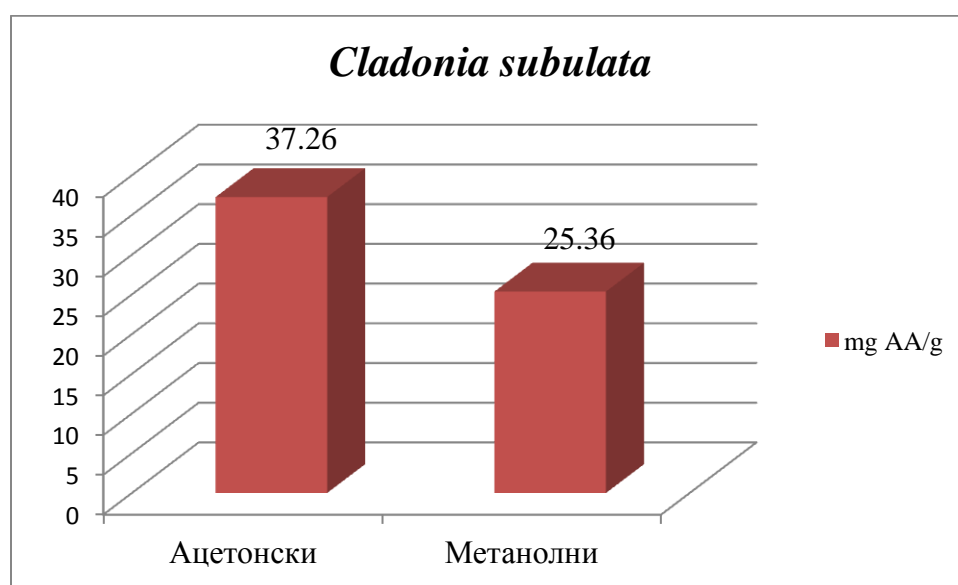
Укупан антиоксидативни капацитет (УАК) испитиваних екстраката, одређен је фосфолибденском методом приказан је у табели 7 и на графицима од 4 до 6.

**Табела 7.** Укупни антиоксидативни капацитет екстраката лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*

Лишај	Екстракт	УАК (mg AA/g ±SD)
<i>C. subulata</i>	Ацетонски	37,26±0,54
	Метанолски	25,36±0,94
<i>P. acetabulum</i>	Ацетонски	40,13±0,60
	Метанолски	74,29±1,36
<i>P. semipinnata</i>	Ацетонски	44,55±1,16
	Метанолски	48,41±1,38

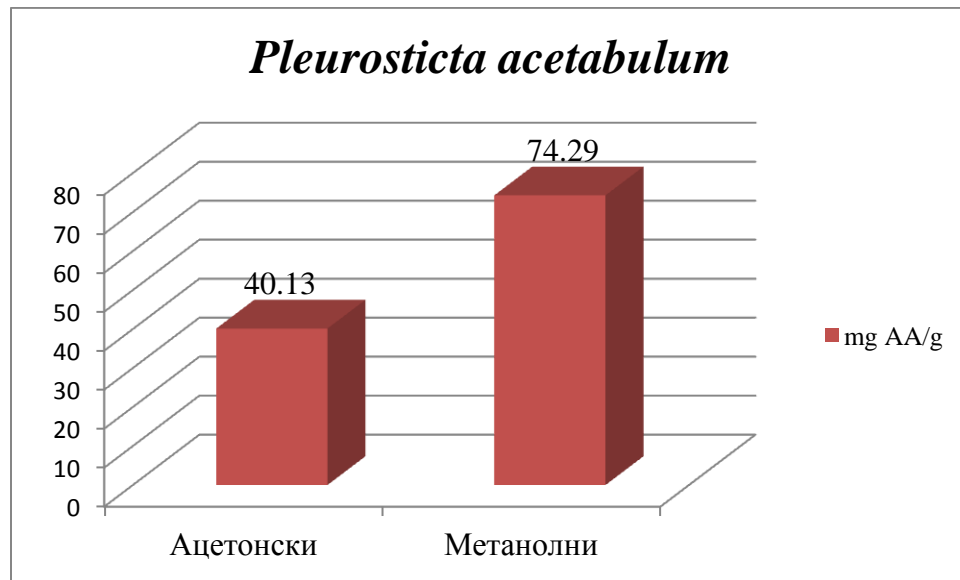
Укупни антиоксидативни капацитет испитиваних ацетонских и метанолских екстраката врста лишајева *C.subulata*, *P. acetabulum* и *P. semipinnata* кретао се у опсегу од 25,36 до 74,29 mg AA/g (mg аскорбинске киселине по g сувог екстракта), при чему највећи укупни антиоксидативни капацитет је показао метанолски екстракт *P. acetabulum*, а најмањи метанолски екстракт *C. subulata*.

Резултати испитивања укупног антиоксидативног капацитета лишаја *Cladonia subulata* указују да ацетонски екстракт ( $37,26 \pm 0,54$  mg AA/g) има јачу антиоксидативну активност у односу на метанолски ( $25,36 \pm 0,94$  mg AA/g).



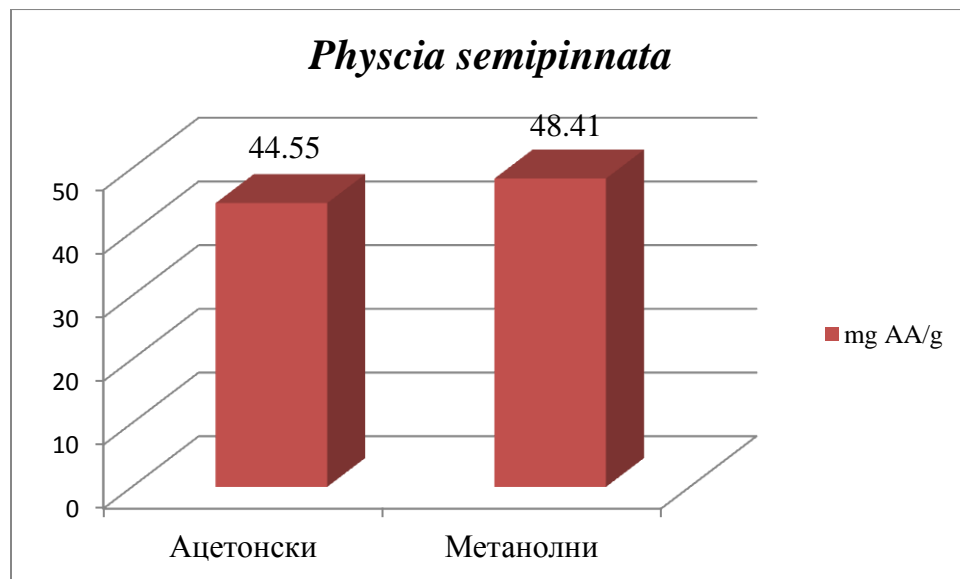
**График 4.** Укупни антиоксидативни капацитет екстраката лишаја *Cladonia subulata*

Резултати испитивања УАК лишаја *Pleurosticta acetabulum* показује да метанолски екстракт ( $74,29 \pm 1,36$  mg AA/g) има јачу активност у односу на ацетонски ( $40,13 \pm 0,60$  mg AA/g).



**График 5.** Укупни антиоксидативни капацитет екстраката лишаја *Pleurosticta acetabulum*

Резултати испитивања УАК лишаја *Phyrcia semipinnata* показују да метанолски екстракт ( $48,41 \pm 1,38$  mg AA/g) има већи укупни антиоксидативни капацитет у односу на ацетонски екстракт ( $44,55 \pm 1,16$  mg AA/g)



**График 6.** Укупни антиоксидативни капацитет екстраката лишаја *Phyrcia semipinnata*



#### 4.3.2. Одређивање способности неутралисања DPPH• радикала испитиваних екстраката

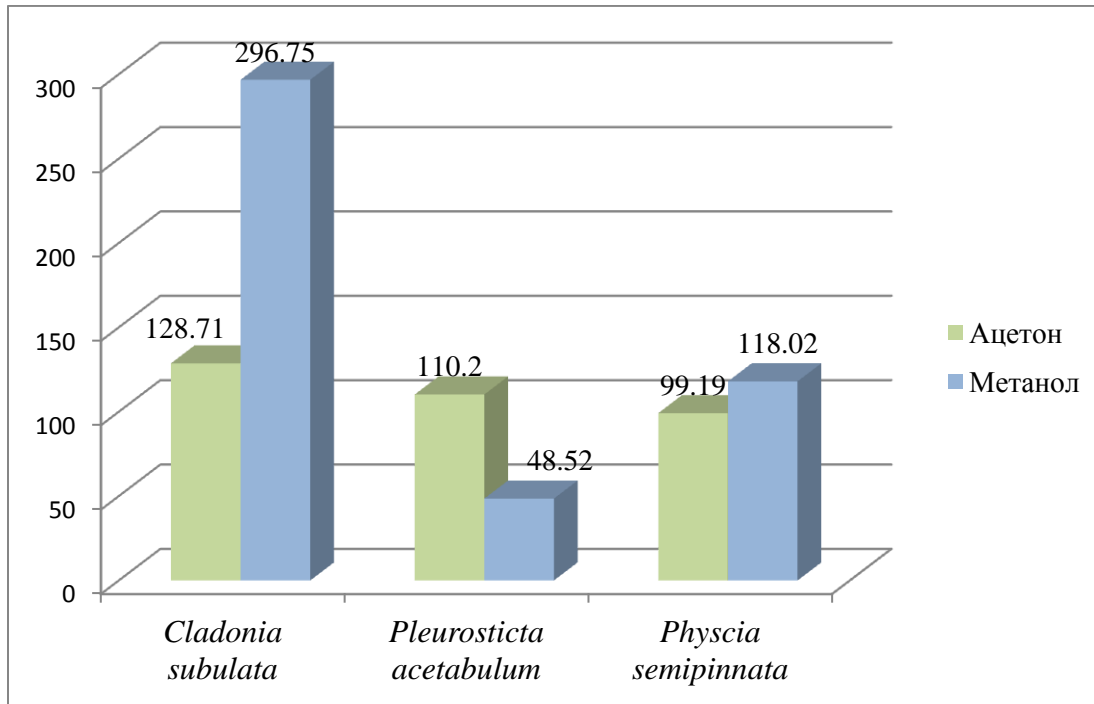
У табели 8. и на графику 7 приказани су IC<sub>50</sub> (концентрација екстракта потребна да смањи концентрацију DPPH• радикала за 50%) вредности деловања екстраката лишајева *C. subulata*, *P. acetabulum* и *P. semipinnata* на неутрализијацију DPPH• радикала. IC<sub>50</sub> вредности екстраката (табела 27) кретале су се у опсегу од 48,52 ± 0,77 до 296,75±0,61 µg/ml и указују на то да испитивани екстракти имају способност неутрализације DPPH• радикала. На основу IC<sub>50</sub> вредности евидентно је да метанолски екстракт *P. acetabulum* показује највећу антирадикалску активност али и даље значајно мање од комерцијално коришћених бутилхидрокситолуола и аскорбинске киселине. Најмању антирадикалску активност показао је метанолски екстракт лишаја *C. subulata*.

**Табела 8.** Капацитет неутралисања (IC<sub>50</sub>) DPPH• радикала екстраката лишајева (*Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*) и стандардних супстанци

Лишај	Екстракт	IC <sub>50</sub> (µg/ml ±SD)
<i>C. subulata</i>	Ацетонски	128,71±1,07
	Метанолски	296,75±0,61
<i>P. acetabulum</i>	Ацетонски	110,20±0,86
	Метанолски	48,52± 0,77
<i>P. semipinnata</i>	Ацетонски	99,19±1,02
	Метанолски	118,02±1,33
Аскорбинска кис.		6,05±0,34
Бутилхидрокситолуол		15,61±1,26
Гална киселина		3,79±0,69

У зависноти од избора растварача (ацетон и метанол) коришћеног за екстракцију IC<sub>50</sub> се значајно разликовала у случајевима лишајева *C. subulata* (ацетон: 128,71±1,07 µg/ml; метанол: 296,75±0,61 µg/ml) и *P. acetabulum* (ацетон: 110,20±0,86µg/ml; метанол: 48,52± 0,77µg/ml), док у случају лишаја *P. semipinnata* разлика IC<sub>50</sub> вредности између

ацетонског и метанолског екстракта није толико велика (ацетон:  $99,19 \pm 1,02 \mu\text{g/ml}$ ; метанол:  $118,02 \pm 1,33 \mu\text{g/ml}$ ).



**График 7.** IC<sub>50</sub> (µg/ml) вредности неутралисања DPPH· радикала екстрактима лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*

Редослед антирадикалске активности испитиваних екстраката на DPPH· је: метанолски екстракт *P.acetabulum* > ацетонски екстракт *P. semipinnata* > ацетонски екстракт *P.acetabulum* > метанолски екстракт *P. semipinnata* > ацетонски екстракт *C. subulata* > метанолски екстракт *C. subulata*.

#### 4.3.3. Одређивање способности неутралисања OH· радикала испитиваних екстраката

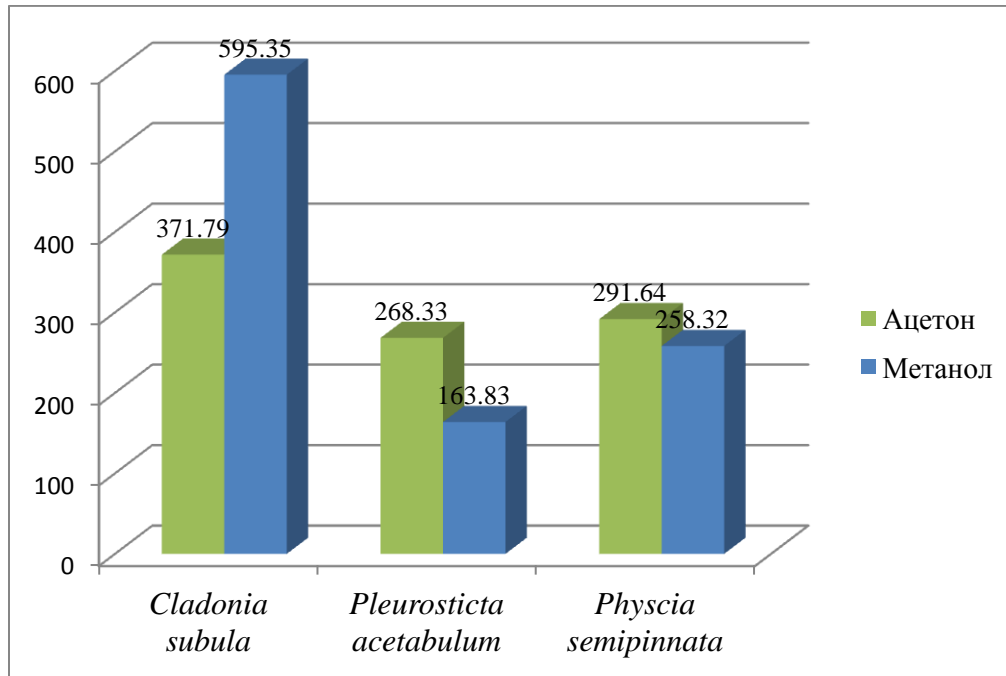
Резултати истраживања показују да екстракти испитиваних лишајева имају способност неутралисања хидроксил (OH·) радикала али мању него стандарди који су се користили за поређење. У табели број 9 приказане су IC<sub>50</sub> вредности (концентрација екстракта потребна да смањи концентрацију OH· радикала за 50%) деловања ацетонских и метанолских екстраката лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* ± стандардна девијација три мерења. IC<sub>50</sub> вредности екстракта кретале су се у

опсегу од  $163,83 \pm 0,95$  до  $595,35 \pm 7,78$   $\mu\text{g/ml}$  при чему највећу способност неутралисања  $\text{OH}^\bullet$  радикала (а најмању  $\text{IC}_{50}$  вредност) испољио је метанолски екстракт *P. acetabulum*. Најмању антирадикалску активност (највећа вредност  $\text{IC}_{50}$ ) показао је метанолски екстракт лишаја *C. subulata*.

**Табела 9.** Способност неутрализације ( $\text{IC}_{50}$ ) хидрокси радикала екстрактима лишајева (*Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*) и стандардним једињењима

Лишај	Екстракт	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$ )
<i>C. subulata</i>	Ацетонски	$371,79 \pm 6,91$
	Метанолски	$595,35 \pm 7,78$
<i>P. acetabulum</i>	Ацетонски	$268,33 \pm 2,25$
	Метанолски	$163,83 \pm 0,95$
<i>P. semipinnata</i>	Ацетонски	$291,64 \pm 4,07$
	Метанолски	$258,32 \pm 2,12$
Аскорбинска кис.		$160,55 \pm 2,31$
Бутилхидрокситолуол		$33,92 \pm 0,79$
Гална киселина		$59,14 \pm 1,10$

Употреба ацетона или метанола за екстракцију утицала је на активност појединачних екстраката лишајева па је тако ацетонски екстракт *C. subulata* ( $\text{IC}_{50} = 371,79 \pm 6,91$   $\mu\text{g/ml}$ ) испољио већу антирадикалску активност према  $\text{OH}^\bullet$  радикалима него његов метанолски екстракт ( $\text{IC}_{50} = 595,35 \pm 7,78$   $\mu\text{g/ml}$ ). Насупрот том резултату, метанолски екстракт *P. acetabulum* ( $\text{IC}_{50} = 163,83 \pm 0,95$   $\mu\text{g/ml}$ ) испољио је већу активност у односу на његов ацетонски екстракт ( $\text{IC}_{50} = 268,33 \pm 2,25$   $\mu\text{g/ml}$ ). У случају лишаја *P. semipinnata* метанолски екстракт ( $\text{IC}_{50} = 258,32 \pm 2,12$   $\mu\text{g/ml}$ ) је испољио већу способност неутралисања хидроксил радикала у односу на његов ацетонски екстракт ( $\text{IC}_{50} = 291,64 \pm 4,07$   $\mu\text{g/ml}$ ).



**График 8.** IC<sub>50</sub> (µg/ml) вредности неутралисања OH· радикала екстрактима лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*

Редослед антирадикалске активности испитиваних екстраката је: метанолски екстракт *P. acetabulum* > метанолски екстракт *P. semipinnata* > ацетонски екстракт *P. acetabulum* > ацетонски екстракт *P. semipinnata* > ацетонски екстракт *C. subulata* > метанолски екстракт *C. subulata* (график 8).

#### 4.3.4. Редукциони капацитет испитиваних екстраката

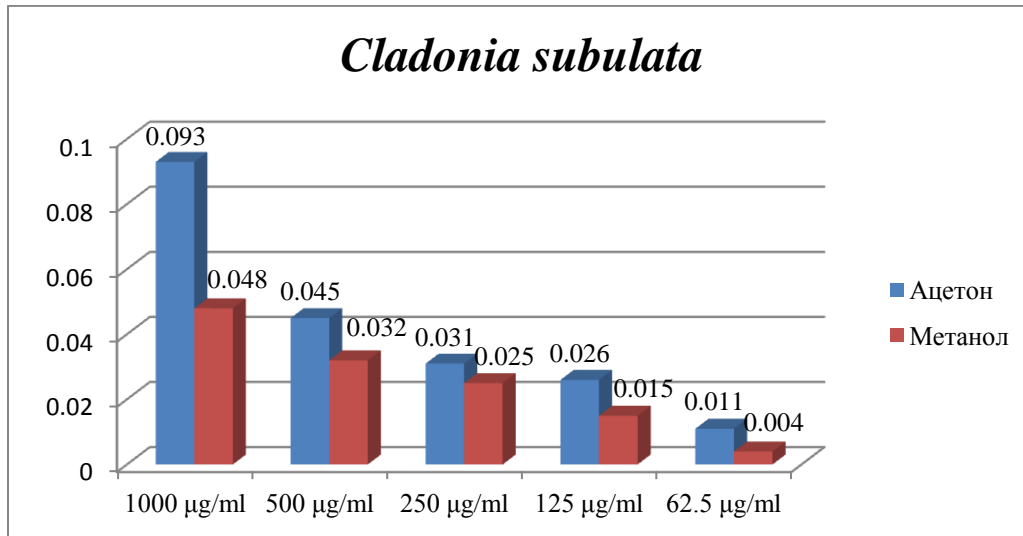
Резултати испитивања редукционог капацитета ацетонских и метанолских екстраката лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* ± стандардна девијација три мерења приказани су у табели 10. Вредности што веће апсорбанце указују на већи редукциони капацитет. Измерене вредности апсорбанце редукционог капацитета испитиваних екстраката варирале су у зависности од примењене концентрације екстракта. При концентрацији екстраката од 1000 µg/ml измерене вредности апсорбанце кретале су се у опсегу од 0,25±0,011 до 0,048±0,009, при чему је метанолски екстракт *P. acetabulum* испољио најјачи редукциони капацитет, а метанолски екстракт *C. subulata* најслабији.

Табела 10. Редукциони капацитет испитиваних екстраката и аскорбинске киселине

Лишај	Апсорбанца (700 nm)				
	1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml	62.5 µg/ml
<i>C. subulata</i> * <sup>A</sup>	0,093±0,007	0,045±0,003	0,031±0,002	0,026±0,005	0,011±0,002
<i>C. subulata</i> * <sup>M</sup>	0,048±0,009	0,032±0,006	0,025±0,001	0,015±0,002	0,004±0,001
<i>P. acetabulum</i> * <sup>A</sup>	0,128±0,01	0,068±0,005	0,043±0,004	0,036±0,002	0,019±0,003
<i>P. acetabulum</i> * <sup>M</sup>	0,25±0,011	0,123±0,003	0,063±0,003	0,035±0,006	0,018±0,002
<i>P. semipinnata</i> * <sup>A</sup>	0,21±0,008	0,121±0,004	0,061±0,001	0,038±0,002	0,019±0,006
<i>P. semipinnata</i> * <sup>M</sup>	0,099±0,004	0,063±0,002	0,03±0,007	0,023±0,005	0,012±0,001
Аскорбинска киселина	2,113±0,032	1,654±0,021	0,0957±0,008	0,0478±0,004	0,0247±0,004

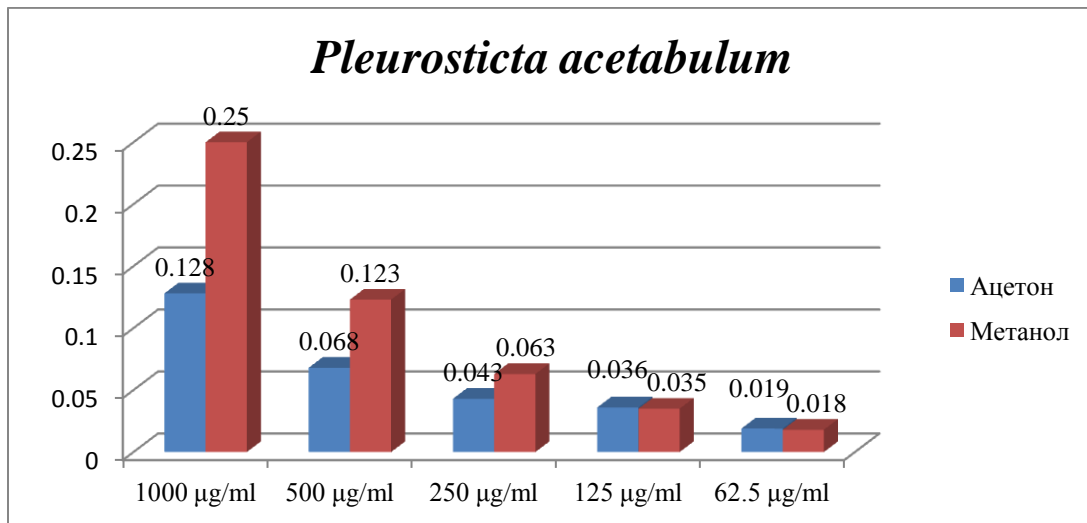
\*<sup>A</sup> – ацетонски екстракт; \*<sup>M</sup> – метанолски екстракт;

На графику 9. приказане су вредности апсорбанце редукционог капацитета ацетонског и метанолског екстракта лишаја *Cladonia subulata*. У серији концентрација двоструких разблажења (1000, 500, 250, 125, 62,5 µg/ml) ацетонски екстракт имао је вредност веће апсорбанце (тј. јачи редукциони капацитет) у односу на метанолски екстракт. Измерене вредности апсорбанце за ацетонски екстракт *C. subulata* биле су у опсегу од 0,093 до 0,011. Вредности апсорбанце редукујућег капацитета за метанолски екстракт *C. subulata* варирале су од 0,048 до 0,004.



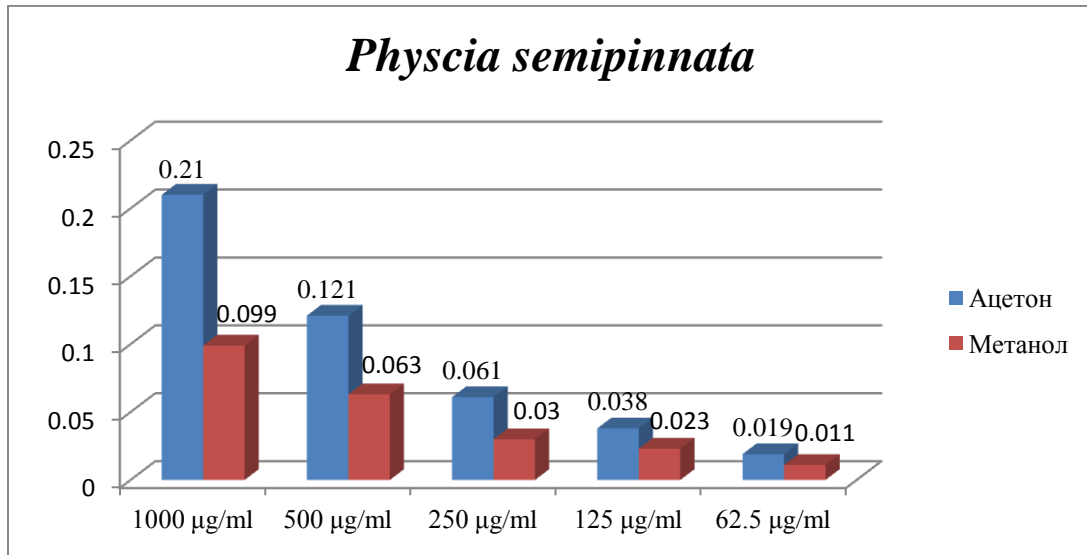
**График 9.** Редукциони капацитет (апсорбанца) екстракта лишаја *C. subulata* при опсегу концентрација од 1000-62,5 µg/ml

На графику 10 приказане су вредности апсорбанце редукционог капацитета ацетонског и метанолског екстракта лишаја *Pleurosticta acetabulum*. При већим концентрацијама (1000, 500 и 250 µg/ml) метанолски екстракт је имао већи редукциони капацитет у односу на ацетонски екстракт. Међутим, при нижим концентрацијама (125 и 62,5 µg/ml) разлика у редукционом капацитету између ацетонског и метанолског екстракта је мала. Измерене вредности апсорбанце за ацетонски екстракт *P. acetabulum* биле су у опсегу од 0,128 до 0,018. Вредности апсорбанце редукујућег капацитета за метанолски екстракт *P. acetabulum* варирале су од 0,25 до 0,019.



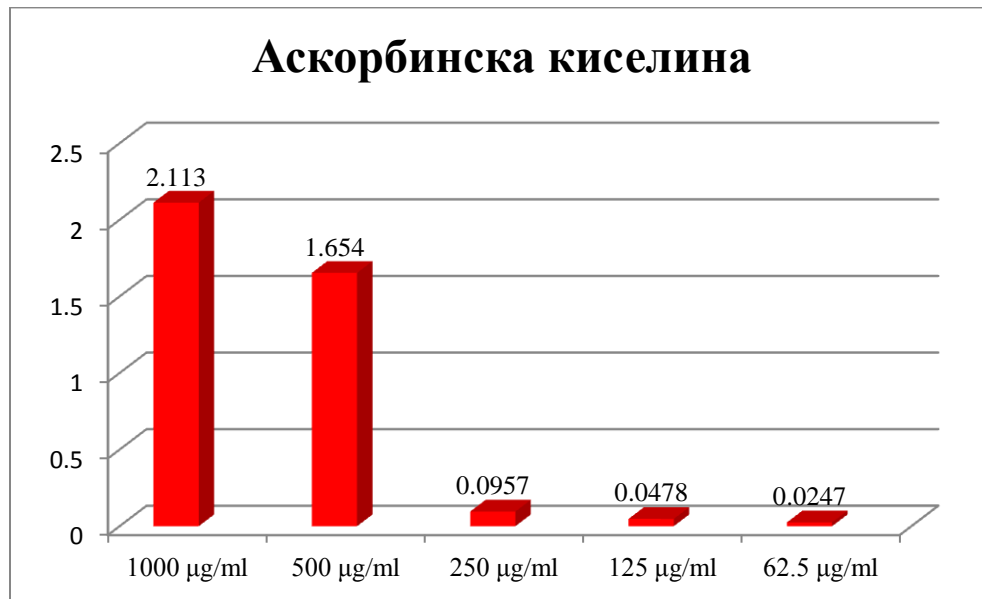
**График 10.** Редукциони капацитет (апсорбанца) екстракта лишаја *P. acetabulum* при опсегу концентрација од 1000-62.5 µg/ml

На графику 11 приказане су вредности апсорбанце редукционог капацитета ацетонског и метанолског екстракта лишаја *Physcia semipinnata*. У серији концентрација двоструких разблажења (1000, 500, 250, 125, 62,5 µg/ml) ацетонски екстракт имао је вредност веће апсорбанце (тј. јачи редукциони капацитет) у односу на метанолски екстракт. Измерене вредности апсорбанце за ацетонски екстракт *P. semipinnata* биле су у опсегу од 0,21 до 0,019. Вредности апсорбанце редуктивног капацитета за метанолски екстракт *P. semipinnata* варирале су од 0,93 до 0,011.



**График 11.** Редукциони капацитет (апсорбанца) екстракта лишаја *P. semipinnata* при опсегу концентрација од 1000-62,5 µg/ml

На графику 12 приказане су измерене вредности апсорбанце за редукујући капацитет аскорбинске киселине која је коришћена као стандард. Вредности апсорбанце су варирале у зависности од коришћене концентрације (1000, 500, 250, 125, 62,5 µg/ml) у опсегу од 2,113 до 0,0247.



**График 12.** Редукциони капацитет (апсорбанца) аскорбинске киселине при опсегу концентрација од 1000-62,5 µg/ml



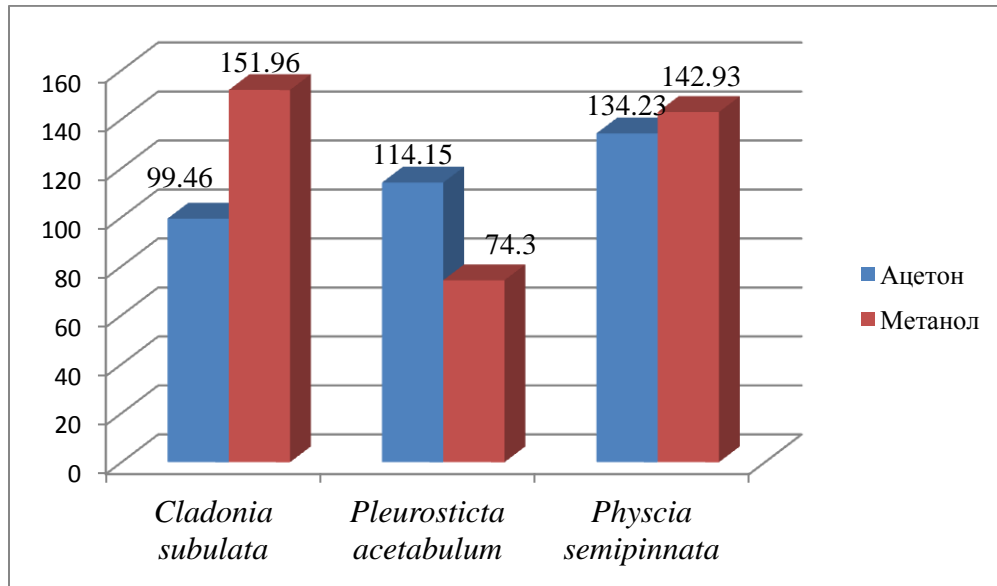
Јачина редукујућег капацитета испитиваних екстраката лишајева опадала је по редоследу: метанолски екстракт *P. acetabulum* > ацетонски екстракт *P. semipinnata* > ацетонски *P. acetabulum* > метанолски *P. semipinnata* > ацетонски *C. subulata* > метанолски *C. subulata*.

#### 4.3.5. Одређивање инхибиције липидне пероксидације испитиваних екстраката

У табели 11 и графику 13 приказане су IC<sub>50</sub> вредности инхибиције липидне пероксидације екстраката лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum*, и *Physcia semipinnata* у односу на стандардне супстанце. IC<sub>50</sub> вредности екстракта кретале су се у опсегу од 74,30±1,48 до 151,96±2,79 µg/ml при чему највећу способност инхибиције липидне пероксидације (а најмању IC<sub>50</sub> вредност) испољио је метанолски екстракт *P. acetabulum*. Најмању способност инхибиције липидне пероксидације активност (највећа вредност IC<sub>50</sub>) показао је метанолски екстракт лишаја *C. subulata*.

**Табела 11.** Потенцијал инхибиције липидне пероксидације испитиваних екстраката и стандардних супстанци

Лишај	Екстракт	IC <sub>50</sub> (µg/ml ±SD)
<i>C. subulata</i>	Ацетонски	99,46±2,52
	Метанолски	151,96±2,79
<i>P. acetabulum</i>	Ацетонски	114,15±1,12
	Метанолски	74,30±1,48
<i>P. semipinnata</i>	Ацетонски	134,23±4,55
	Метанолски	142,93±2,90
Аскорбинска кис.		> 1000
Бутилхидрокситолуол		1,00±0,23
Гална киселина		255,43±11,68
α- токоферол		0,48±0,05



**График 13.** IC<sub>50</sub> (µg/ml) вредности инхибиције липидне пероксидације екстрактима лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*

Употреба ацетона или метанола за екстракцију утицала је на активност појединачних екстраката лишајева па је тако ацетонски екстракт *C. subulata* (IC<sub>50</sub>= 99,46±2,52 µg/ml) испољио већу инхибицију липидне пероксидације него његов метанолски екстракт (IC<sub>50</sub>= 151,96±2,79 µg/ml). Насупрот том резултату метанолски екстракт *P. acetabulum* (IC<sub>50</sub>= 74,30±1,48 µg/ml) испољио је већу активност у односу на његов ацетонски екстракт (IC<sub>50</sub>=114,15±1,12 µg/ml). У случају лишаја *P. semipinnata* ацетонски екстракт (IC<sub>50</sub>= 134,23±4,55 µg/ml) је испољио већу способност инхибиције липиде пероксидације у односу на његов метанолски екстракт (IC<sub>50</sub>= 142,93±2,90 µg/ml).

#### 4.3.6. Компаративна анализа испитиваних ацетонских екстраката лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* са два различита локалитета

Упоредили смо резултате испитивања ацетонских екстраката испитиваних лишајева са два различита локалитета. Показало се да, иако се радило о истим врстама лишаја, због утицаја фактора средине у којој лишај живи, карактеристике екстраката су се разликовале. Температура, количина падавина, влажност земљишта, минерални састав подлоге, надморска висина, квалитет ваздуха, осветљеност и квалитет светлости значајно

утичу на метаболичке процесе и на продукцију метаболита. С обзиром да су лишајеви са локалитета Врело показали боље прелиминарне резултате у односу на локалитет Куршумлијска Бања, тај биљни материјал је коришћен за детаљнију анализу (фитохемијска анализа и билошка активност).

**Табела 12.** Упоредна анализа антиоксидативне активности (инхибиција DPPH<sup>\*</sup> радикала и редукциони капацитет) и садржаја укупних фенола и флавоноида са два различита локалитета

Екстракти лишајева	Инхибиција DPPH <sup>*</sup> радикал IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Редукциони капацитет Апсорбанца (nm)				Садржај укупних фенола	Садржај укупних флавоноида
		1000 µg	500 µg	250 µg	125 µg		
<i>C. subulata</i> <sup>1/</sup>	312,56/	0,034/	0,0273/	0,025/	0,013/	32,39/	5,20 /
<i>C. subulata</i> <sup>2</sup>	128,71	0,093	0,045	0,031	0,026	39,97	12,65
<i>P. acetabulu</i> <sup>1/</sup>	151,01/	0,127/	0,055/	0,046/	0,035/	35,39/	12,74/
<i>P. acetabulum</i> <sup>2</sup>	110,20	0,128	0,068	0,043	0,036	43,72	15,42
<i>P.semipinnata</i> <sup>1/</sup>	334,28/	0,0359/	0,0166/	0,0111/	0,0089/	29,54 /	2,70/
<i>P.semipinnata</i> <sup>2</sup>	99,19	0,21	0,121	0,061	0,038	51,94	19,27

\*<sup>1</sup>Куршумлијска Бања <sup>2</sup>Врело

Ацетонски екстракти добијени од лишајева на локалитету Врело показују бољу антирадикалску инхибицију (IC<sub>50</sub> мања) у случају све три врсте лишаја. Редукциони капацитет (већа апсорбанца) екстраката лишајева сакупљених на локалитету Врело је био углавном јаче изражен при свим концентрацијама, код свих испитиваних лишајних екстраката, у односу на врсте лишајева сакупљених на локалитету Куршумлијска бања. Утврђено да екстракти лишајева сакупљених на локалитету Врело садрже већу количину укупног садржаја фенола и флавоноида (Табела 12).

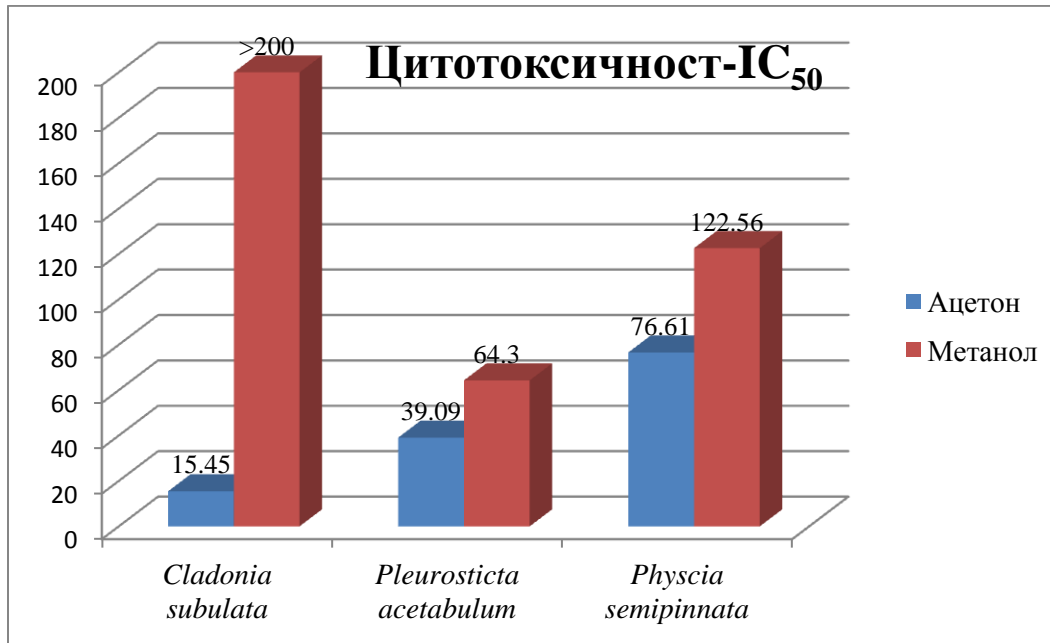
#### 4.4. Антитуморска активност екстраката *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*

##### 4.4.1. Испитивање антитуморске активности екстраката на HeLa S3 ћелије

У табели 13 и графику 14 приказане су IC<sub>50</sub> вредности (концентрација узорка која изазива смањење вијабилности за 50%) цитотоксичне активности ацетонских и метанолских екстраката лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* на HeLa S<sub>3</sub> ћелије након 24 h инкубације. IC<sub>50</sub> вредности екстраката кретале су се у опсегу од 15,45±2,26 до >200 µg/ml при чему највећу антитуморску активност (а најмању IC<sub>50</sub> вредност) испољио је ацетонски екстракт *C. subulata*. Најмању способност цитотоксичне активности (највећа вредност IC<sub>50</sub>) показао је метанолни екстракт лишаја *C. subulata*.

**Табела 13.** Цитотоксична активност испитиваних екстраката и позитивне контроле на ћелијској линији HeLa S<sub>3</sub> након 24 h инкубације

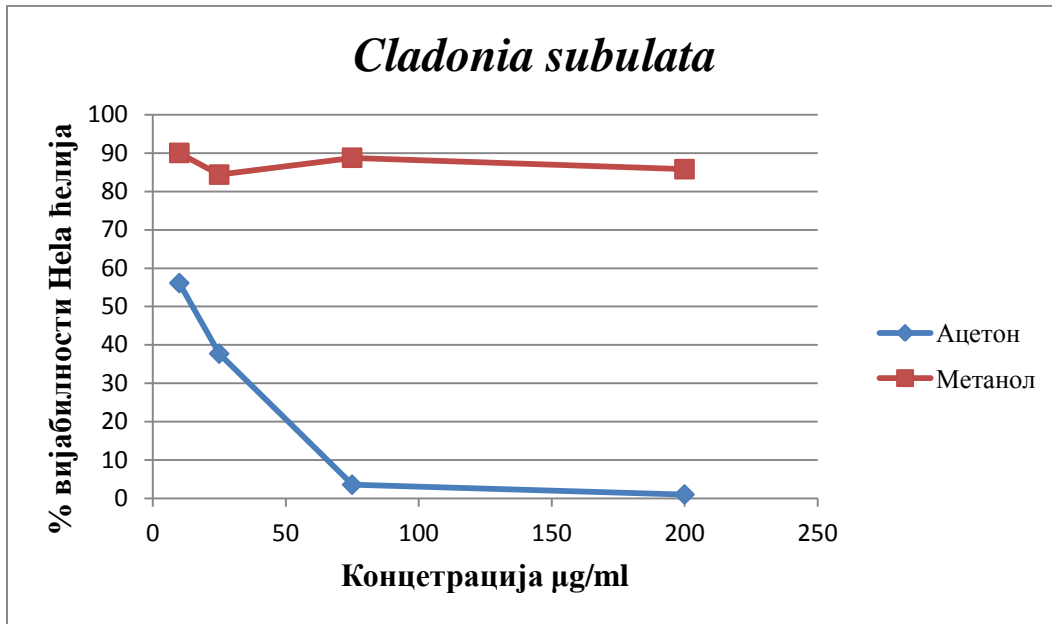
Лишај	Екстракт	IC <sub>50</sub> (µg/ml ±SD)
<i>C. subulata</i>	Ацетонски	15,45±2,26
	Метанолски	>200
<i>P. acetabulum</i>	Ацетонски	39,09±0,94
	Метанолски	64,30±2,89
<i>P. semipinnata</i>	Ацетонски	76,61±9,10
	Метанолски	122,56±8,31
Сапонин (САП)		0,22±0,12



**График 14.** IC<sub>50</sub> (µg/ml) вредности цитотоксичне активности испитиваних екстраката на ћелијској линији HeLa након 24 h инкубације

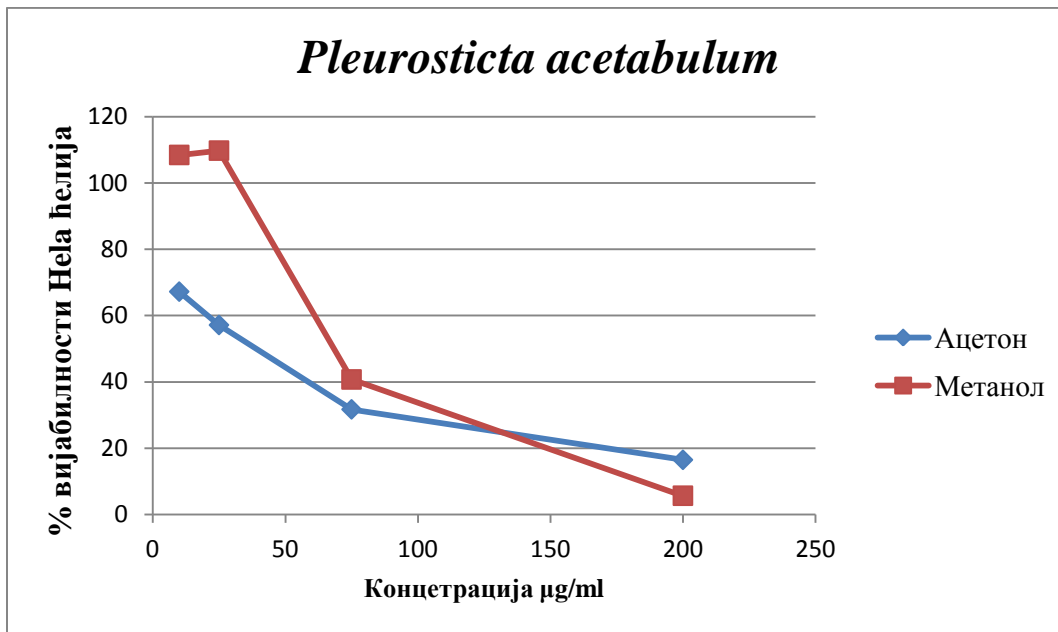
Упоредјујући антитуморске активности према HeLa ћелијама, између екстраката истих врста лишчајева установљена је значајна разлика цитотоксичне активности.

Ацетонски екстракт *C. subulata* испољио је прилично јаку цитотоксичну активност према HeLa ћелијама у испитиваном опсегу концентрација. Јача активност је испољена при вишим концентрацијама, док је при нижим концентрацијама активност била слабија. Метанолски екстракт *C. subulata* није испољио значајну антитуморску активност према HeLa ћелијама и проценат вијабилности се није значајно смањивао при различитим концентрацијама екстракта, тј. активност није дозно зависна (График 15).



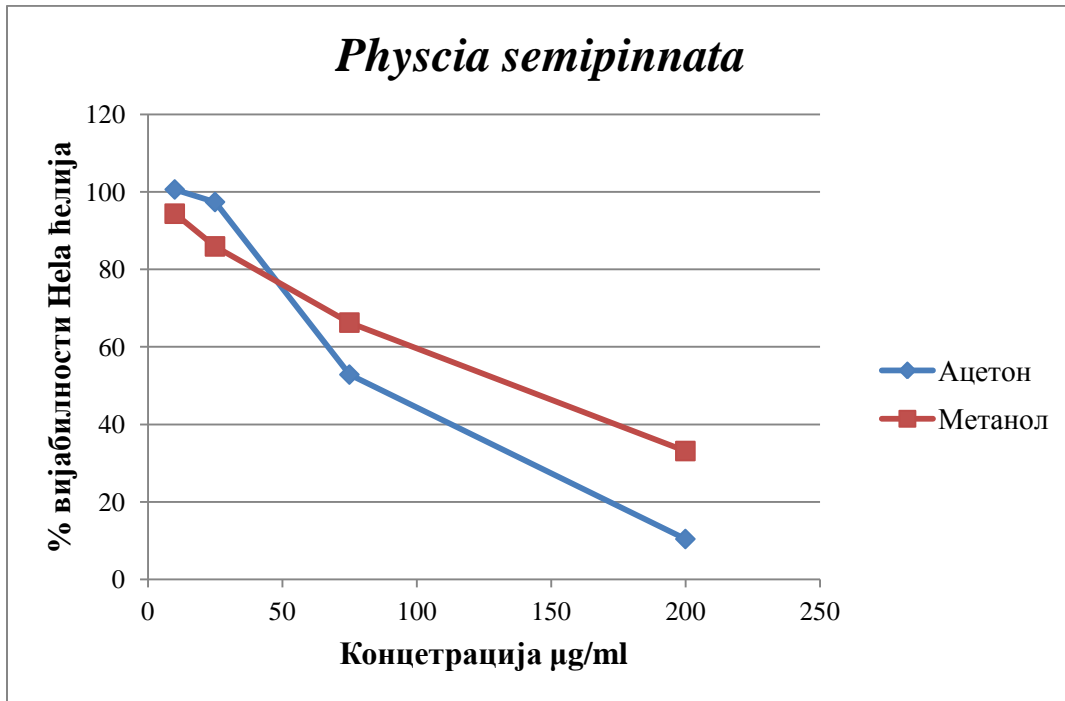
**График 15.** Цитотоксичан ефекат ацетонског и метанолског екстракта *C. subulata* на HeLa ћелије након 24 h инкубације, при опсегу концентрација од 200- 10 µg/ml

Ацетонски и метанолски екстракт лишаја *P. acetabulum* испољили су значајну антитуморску активност према HeLa ћелијама. Најјача цитотоксична активност испољена је при концентрацији од 200 µg/ml, док је при нижим концентрацијама активност била слабија. При нижим концентрацијама метанолског екстракта *P. acetabulum* ефекат је био чак и нецитотоксичан где се проценат вијабилних ћелија повећао (График 16).



**График 16.** Цитотоксичан ефекат ацетонског и метанолског екстракта *P. acetabulum* на HeLa ћелије након 24 h инкубације, при опсегу концентрација од 200- 10 µg/ml

Ацетонски и метанолски екстракт лишаја *P. semipinnata* испољили су солидан цитотоксичан ефекат према HeLa ћелијама, при чему је јачу активност испољио ацетонски екстракт. При вишим концентрацијама у случају оба екстракта била је присутна озбиљна цитотоксична активност, док је при нижим концентрацијама активност била знатно слабија (График 17).



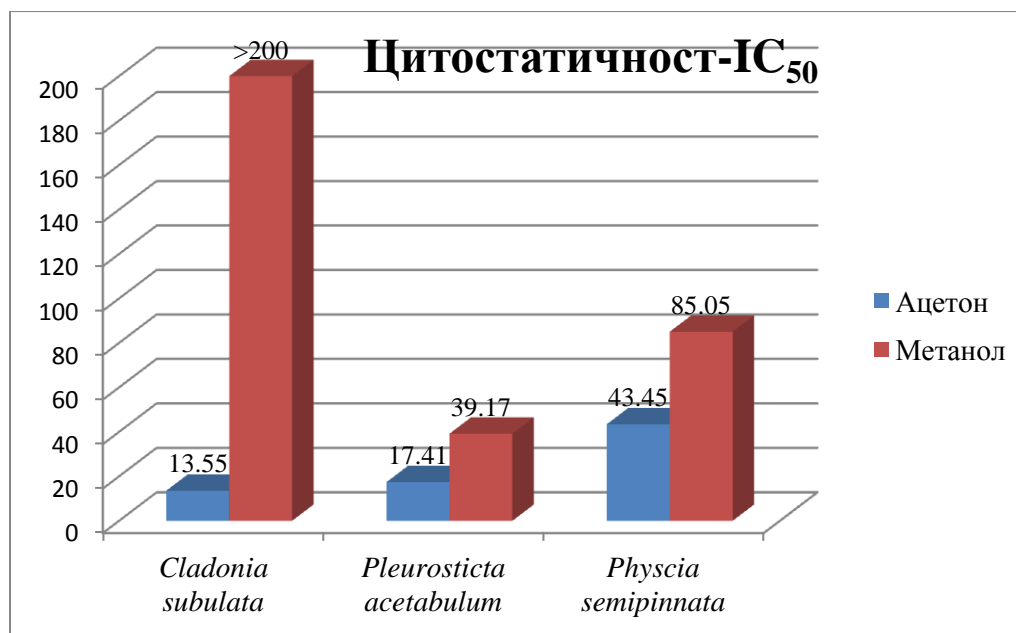
**График 17.** Цитотоксичан ефекат ацетонског и метанолског екстракта *P. semipinnata* на HeLa ћелије након 24 h инкубације, при опсегу концентрација од 200- 10  $\mu\text{g/ml}$

У табели 14 и графику 18 приказане су  $IC_{50}$  вредности (концентрација узорка која изазива смањење пролиферацију ћелија за 50%) цитостатичне активности ацетонских и метанолских екстраката лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* на HeLa S<sub>3</sub> ћелије након 72 h инкубације.  $IC_{50}$  вредности екстраката кретале су се у опсегу од  $13,55 \pm 3,17$  до  $>200 \mu\text{g/ml}$  при чему највећу антипролиферативну активност (а најмању  $IC_{50}$  вредност) испољио је ацетонски екстракт *C. subulata*. Најмању способност антипролиферативне активности (највећа вредност  $IC_{50}$ ) је показао метанолски екстракт лишаја *C. subulata*.



**Табела 14.** Антипролиферативна активност испитиваних екстраката и позитивне контроле на ћелијској линији HeLa S<sub>3</sub> након 72 h инкубације

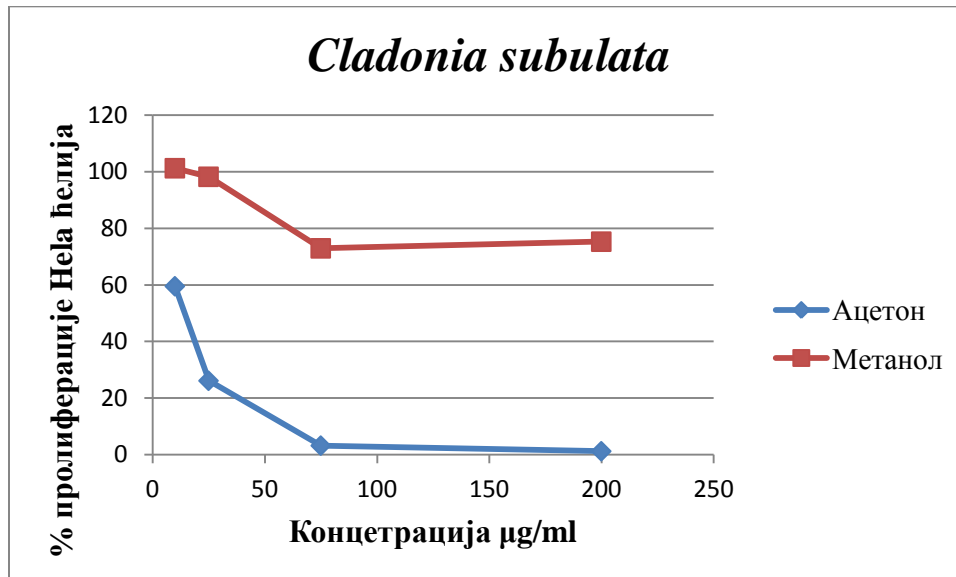
Лишај	Екстракт	IC <sub>50</sub> (µg/ml ±SD)
<i>C. subulata</i>	Ацетонски	13,55±3,17
	Метанолски	>200
<i>P. acetabulum</i>	Ацетонски	17,41±0,11
	Метанолски	39,17±5,54
<i>P. semipinnata</i>	Ацетонски	43,45±0,79
	Метанолски	85,05±5,18
Cis-диаминдихлоро- платина (Cis-ДДП)		0,83±0,19



**График 18.** IC<sub>50</sub> (µg/ml) вредности антипролиферативне активности испитиваних екстраката на ћелијској линији HeLa након 72 h инкубације

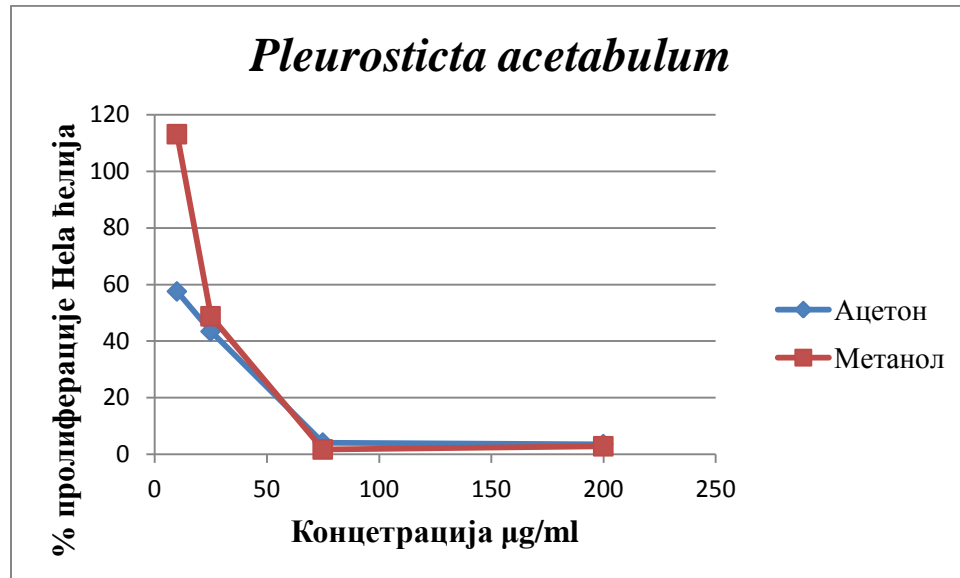
Ацетонски екстракт *C. subulata* испољио је веома јаку антипролиферативну активност према HeLa ћелијама у испитиваном опсегу концентрација. Јача активност је испољена при

вишим концентрацијама, док је при нижим концентрацијама активност била слабија. Метанолски екстракт *C. subulata* није испољио значајну антипролиферативну активност према HeLa ћелијама и проценат пролиферација ћелија се није значајно смањивао, чак ни при високим концентрацијама екстракта (200 µg/ml) (График 19).



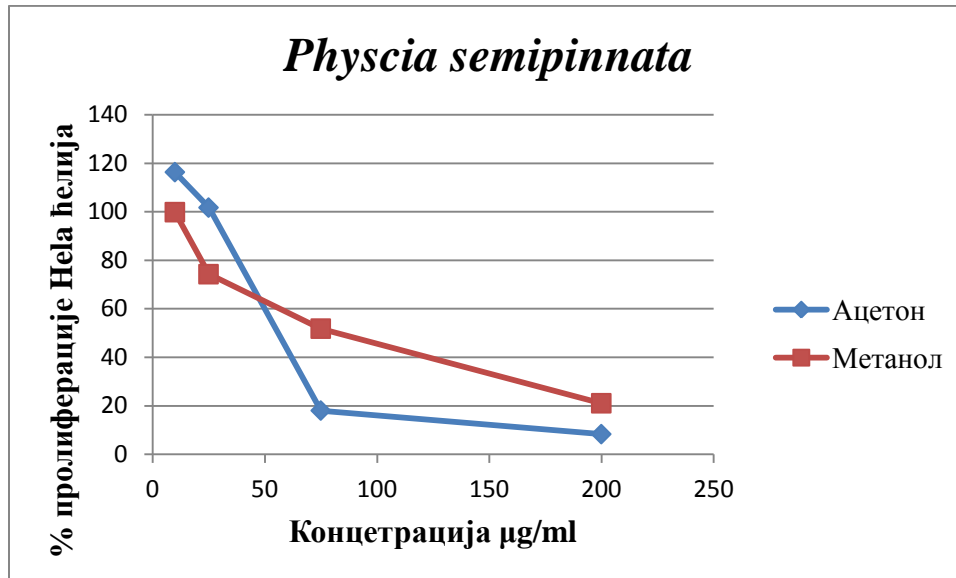
**График 19.** Антипролиферативни ефекат ацетонског и метанолског екстракта *C. subulata* на HeLa ћелије након 72 h инкубације, при опсегу концентрација од 200-10 µg/ml

Ацетонски и метанолски екстракти лишаја *P. acetabulum* испољили су значајну антипролиферативну активност према HeLa ћелијама. Најјача антипролиферативна активност испољена је при вишим концентрацијама од 200 до 75 µg/ml, док је при нижим концентрацијама активност била слабија. При ниским концентрацијама метанолског екстракта *P. acetabulum* (10 µg/ml) ефекат је био чак и нецитостатичан, где се проценат пролиферације ћелија повећао (График 20).



**График 20.** Антипролиферативни ефекат ацетонског и метанолског екстракта *P. acetabulum* на HeLa ћелије након 72 h инкубације, при опсегу концентрација од 200-10  $\mu\text{g/ml}$

Ацетонски и метанолски екстракти лишаја *P. semipinnata* испољили су солидан антипролиферативни ефекат према HeLa ћелијама, при чему је јачу активност испољио ацетонски екстракт. При вишим концентрацијама у случају оба екстракта, била је присутна озбиљна цитостатична активност, док је при нижим концентрацијама активност била знатно слабија. У случају ацетонског екстракта при концентрацији од 10  $\mu\text{g/ml}$  дошло је и до повећања пролиферација ћелија (График 21).



**График 21.** Антипролиферативни ефекат ацетонског и метанолског екстракта *P. semipinnata* на HeLa ћелије након 72 h инкубације, при опсегу концентрација од 200-10 µg/ml

#### 4.4.2. Испитивање анитуморске активности екстракта на LS174 ћелије

Испитивањем цитотоксичне активности екстракта лишајева према LS174 ћелиској линији након 24 h инкубације, добијене су веома високе вредности  $IC_{50}$  које су и биле ван опсега примењених концентрација за испитивање вијабилности (>200). Самим тим, ти резултати нису приказани у докторату. За разлику од 24 h инкубације, после инкубације од 72 h, испитивани лишајеви су показали солидну антипролиферативну активност.

У табели 15 и графику 22 приказане су  $IC_{50}$  вредности (концентрација узорка која изазива смањење пролиферације ћелија за 50%) цитостатичне активности ацетонских и метанолских екстракта лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* на LS174 ћелије након 72 h инкубације.  $IC_{50}$  вредности екстракта кретале су се у опсегу од  $45,94 \pm 1,28$  до преко >200 µg/ml, при чему највећу антипролиферативну активност (а најмању  $IC_{50}$  вредност) испољио је ацетонски екстракт *P. acetabulum*. Најмању способност антипролиферативне активности (највећа вредност  $IC_{50}$ ) показао је метанолски екстракт лишаја *C. subulata*.

Табела 15. Антипролиферативна активност испитиваних екстраката и позитивне контроле на ћелијској линији LS174 након 72 h инкубације

Лишај	Екстракт	IC <sub>50</sub> (µg/ml ±SD)
<i>C. subulata</i>	Ацетонски	68,29±2,43
	Метанолски	>200
<i>P. acetabulum</i>	Ацетонски	45,94±1,28
	Метанолски	66,09±1,61
<i>P. semipinnata</i>	Ацетонски	78,93±0,53
	Метанолски	158,14±4,33
cis-диаминдихлоро- платина (Cis-ДДП)		2,58±0,16

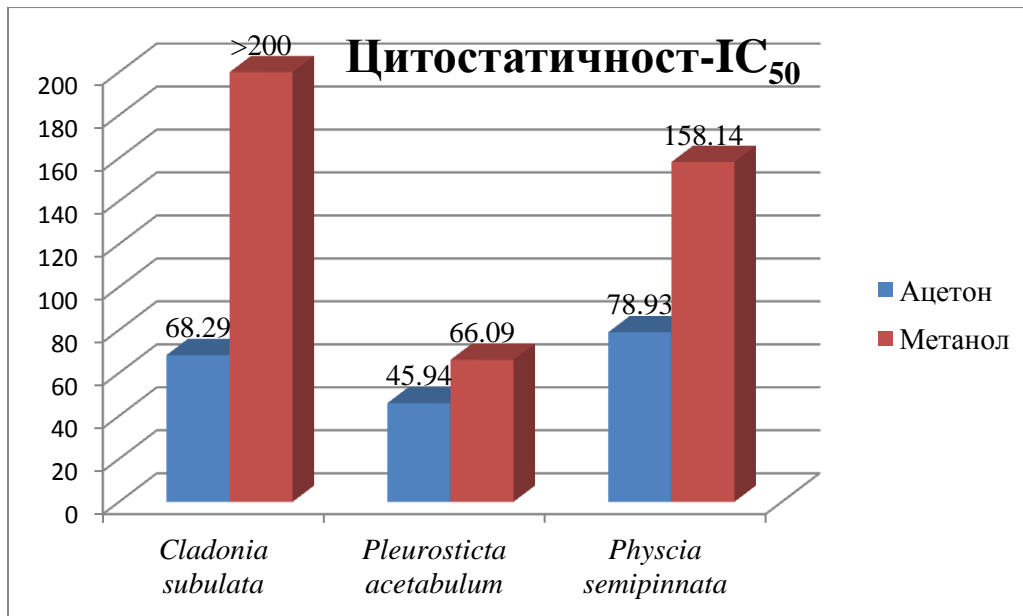
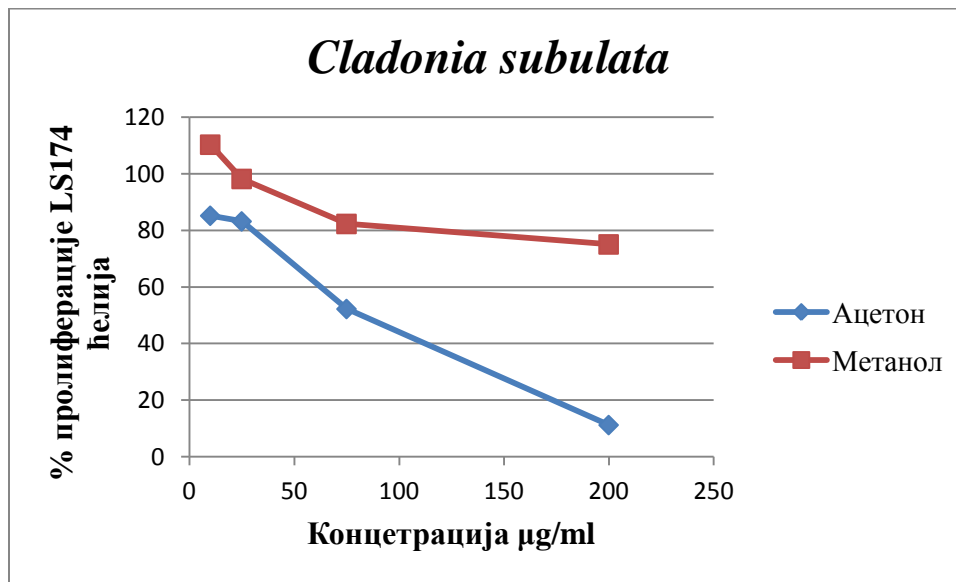


График 22. IC<sub>50</sub> (µg/ml) вредности антипролиферативне активности испитиваних екстраката на ћелијској линији LS174 након 72 h инкубације

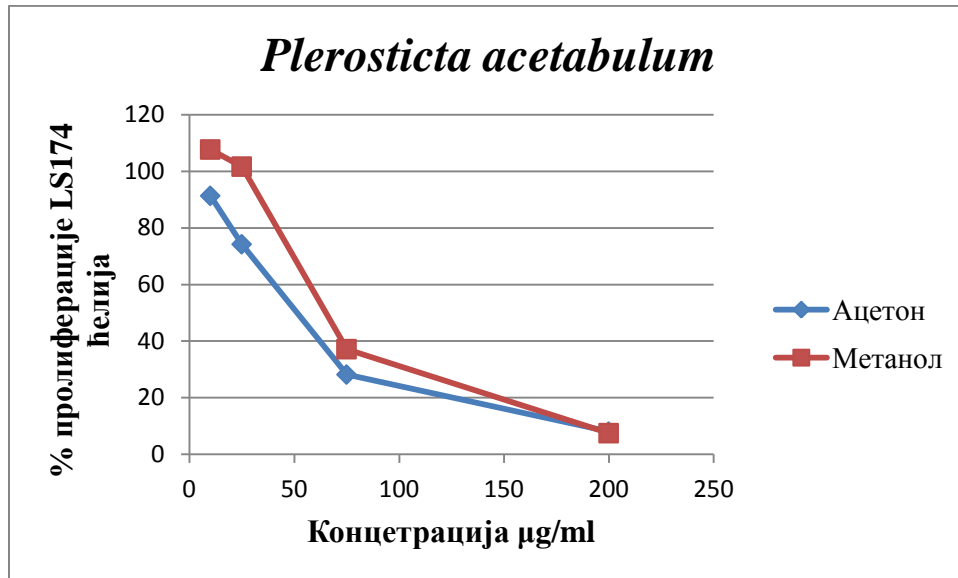
Ацетонски екстракт *C. subulata* испољио је антипролиферативну активност према LS174 ћелијама у испитиваном опсегу концентрација. Јача активност је испољена при

вишим концентрацијама, док је при нижим концентрацијама активност била слабија. Метанолски екстракт *C. subulata* није испољио значајну антипролиферативну активност према LS174 ћелијама и проценат пролиферација ћелија се није значајно смањивао чак ни при високим концентрацијама екстракта (200  $\mu\text{g/ml}$ ), док је при ниским концентрацијама (10  $\mu\text{g/ml}$ ) дошло до повећања пролиферације ћелија (График 23).



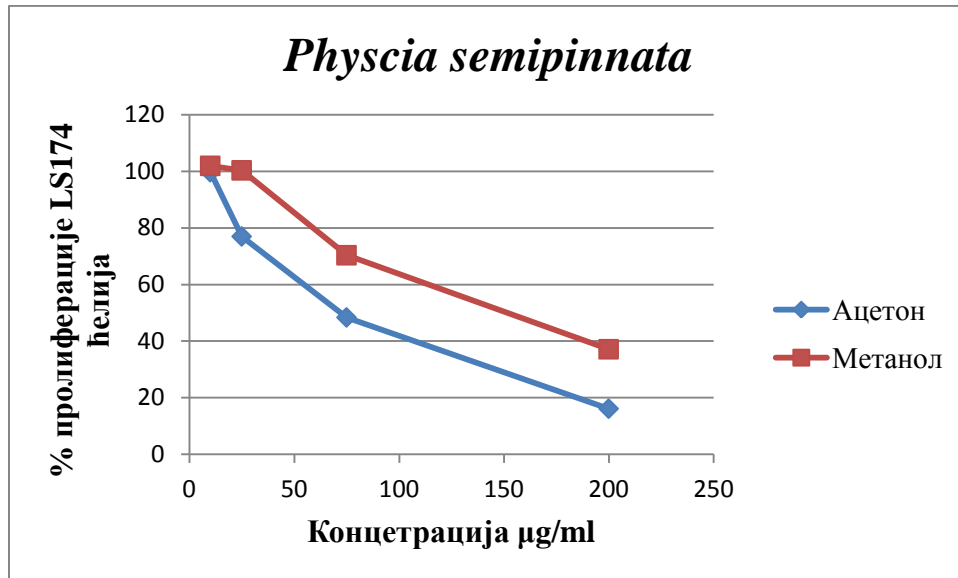
**График 23.** Антипролиферативни ефекат ацетонског и метанолског екстракта *C. subulata* на LS174 ћелије након 72 h инкубације, при опсегу концентрација од 200-10  $\mu\text{g/ml}$

Ацетонски и метанолски екстракт лишаја *P. acetabulum* испољили су значајну антипролиферативну активност према LS174 ћелијама, при чему је ацетонски екстракт испољио јачу антипролиферативну активност. Најјача антипролиферативна активност испољена је при вишим концентрацији од 200  $\mu\text{g/ml}$ , док је при нижим концентрацијама активност била слабија. При ниским концентрацијама метанолског екстракта *P. acetabulum* (10  $\mu\text{g/ml}$ ) ефекат је био чак и нецитостатичан, где се проценат пролиферације ћелија повећао (График 24).



**График 24.** Антипролиферативни ефекат ацетонског и метанолског екстракта *P. acetabulum* на LS174 ћелије након 72 h инкубације, при опсегу концентрација од 200-10 µg/ml

Ацетонски и метанолски екстракт лишаја *P. semipinnata* испољили су солидан антипролиферативни ефекат према LS174 ћелијама, при чему је јачу активност испољио ацетонски екстракт. При вишим концентрацијама у случају оба екстракта била је присутна солидна антипролиферативна активност, док је при нижим концентрацијама (10 µg/ml) активност била знатно слабија или је није било (График 25).



**График 25.** Антипролиферативни ефекат ацетонског и метанолског екстракта *P. semipinnata* на LS174 ћелије након 72 h инкубације, при опсегу концентрација од 200-10  $\mu\text{g/ml}$

#### 4.5. Статистичка обрада података

##### 4.5.1. Једнофакторска анализа варијансе (АНОВА) укупних фенола, флавоноида, антиоксидативне и антитуморске активности

Једнофакторска анализа варијансе (АНОВА) биће коришћена за утврђивање постојања статистичке значајности средњих вредности мерења. Анализом варијансе омогућено је истовремено тестирање разлика између више средњих вредности. Анализом варијансе тестирамо однос варијабилитета резултата екстраката између истих врста лишајева и варијабилитета екстраката између различитих врста испитиваних лишајева. Такође, АНОВА тестом је обухваћен и однос екстраката лишајева са стандардним супстанцама.



**Табела 16.** Анализа варијансе (АНОВА) вредности укупних фенола, флавоноида, укупног антиоксидативног капацитета, неутралисање DPPH<sup>•</sup> и ОН радикала, редукциони капацитет и инхибиције липидне пероксидације

АНОВА						
Укупни феноли	Укупни флавоноиди	Укупни антиоксид. Капацитет	Неутралисање DPPH <sup>•</sup> радикала	Неутралисање ОН радикала	Редукциони капацитет	Инхибиција липидне пероксидације
F 716,282	104,847	722,608	28737,637	5548,689	8117,403	916,285
p 0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*

F-експериментална вредност F дистрибуције  
 p- вероватноћа за прихватање нултне хипотезе  
 \*- разлика је статистички значајна (p<0.05)

**Табела 17.** Анализа варијансе (АНОВА) вредности (IC<sub>50</sub>) цитотоксичне и цитостатичне активности према HeLa ћелијама као и цитостатичне активности према ћелијама меланома LS174

Цитотоксичан ефекат ( HeLa ћелије-24h)	Антипролиферативна активност (HeLa ћелије-72 h)	Антипролиферативна активност (LS174 ћелије-72 h)
F 601,216	1661,080	6594,566
p 0,000*	0,000*	0,000*

F-експериментална вредност F дистрибуције  
 p- вероватноћа за прихватање нултне хипотезе  
 \*- разлика је статистички значајна (p<0.05)

АНОВА тестом утврђено је да постоји статистичка значајна разлика између испитиваних узорака у вредностима укупних фенола, укупних флавоноида, IC<sub>50</sub> вредности (неутралисање DPPH<sup>•</sup> и ОН<sup>•</sup> радикала и инхибиције липидне пероксидације) и вредности апосорбанце (редукциони капацитет). АНОВА тестом је такође утврђена и статистички значајна разлика између испитиваних екстраката у антитуморској активности.

**4.5.2. Tukey's HSD тестирање укупних фенола, флавоноида, антиоксидативне и антитуморске активности**

**Tukey's HSD тестирање укупног фенолног садржаја испитиваних екстраката**

Међу екстрактима лишаја *Cladonia subulata* ацетонски екстракт се статистички значајно разликовао по количини укупних фенола од метанолског. Поређењем екстраката (ацетонски/метанолски) лишајева *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* показано је да се статистички значајно разликују по количини укупних фенола. Међусобном компарацијом екстраката (ацетонског и метанолског) све три врсте лишајева (*C. subulata*, *P. acetabulum* и *P. semipinnata*) установљено је да се статистички значајно разликују по количини укупних фенола (Табела 18).

**Табела 18.** Статистичка анализа добијених резултата укупног фенолног садржаја испитиваних узорака

Tukey's HSD тест			
Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност
<i>C. sub.<sup>A</sup>/C. sub.<sup>M</sup></i>	0,000	<i>C. sub.<sup>M</sup>/P. sem.<sup>M</sup></i>	0,000
<i>C. sub.<sup>A</sup>/P. acet.<sup>A</sup></i>	0,017	<i>P. acet.<sup>A</sup>/P.acet.<sup>M</sup></i>	0,000
<i>C. sub.<sup>A</sup>/P. acet.<sup>M</sup></i>	0,000	<i>P. acet.<sup>A</sup>/P. sem.<sup>A</sup></i>	0,000
<i>C. sub.<sup>A</sup>/P. sem.<sup>A</sup></i>	0,000	<i>P.acet.<sup>A</sup>/P. sem.<sup>M</sup></i>	0,000
<i>C. sub.<sup>A</sup>/P. sem.<sup>M</sup></i>	0,000	<i>P. acet.<sup>M</sup>/P. sem.<sup>A</sup></i>	0,000
<i>C. sub.<sup>M</sup>/P. acet.<sup>A</sup></i>	0,000	<i>P. acet.<sup>M</sup>/P. sem.<sup>M</sup></i>	0,000
<i>C. sub.<sup>M</sup>/P. acet.<sup>M</sup></i>	0,000	<i>P. sem.<sup>A</sup>/P. sem.<sup>M</sup></i>	0,000
<i>C. sub.<sup>M</sup>/P. sem.<sup>A</sup></i>	0,000		

\* *C. sub.*- *Cladonia subulata*; *P. acet.*-*Pleurosticta acetabulum*; *P. sem.*-*Physcia semipinnata*;  
 \*<sup>A</sup>-ацетонски екстракт; \*<sup>M</sup>- метанолски екстракт;

**Tukey's HSD тестирање укупног флавоноидног садржаја испитиваних екстраката**

По садржају укупних флавоноида, ацетонски екстракт лишаја *Cladonia subulata* се статистички значајно разликовао од метанолског екстракта истог лишаја. Упоредивањем укупног флавоноидног садржаја екстраката лишаја *C. subulata*. са екстрактима других врста лишајева показало се да се углавном статистички значајно разликују, сем у случају

ацетонског екстракта *C. subulata* и метанолског екстракта *P. semipinnata*. Екстракти лишајева *P. acetabulum* су се међусобно статистички значајно разликовали по садржају укупних флавоноида. Ацетонски екстракт *P. acetabulum* се статистички није разликовао по садржају укупних флавоноида у односу на метанолски екстракт *P. semipinnata*. У осталим случајевима поређења екстраката *P. acetabulum* са екстрактима других врста лишајева устанољена је статистички значајна разлика садржаја флавоноида. Између ацетонског и метанолског екстракта лишаја *P. semipinnata* постоји статистички значајна разлика (Табела 19).

**Табела 19.** Статистичка анализа добијених резултата укупног флавоноидног садржаја испитиваних узорака

Tukey's HSD тест			
Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>C. sub.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,001
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,020	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,002	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,546
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,315	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,018	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000		

\* *C. sub.*- *Cladonia subulata*; *P. acet.*-*Pleurosticta acetabulum*; *P. sem.*-*Physcia semipinnata*;

\*<sup>A</sup>-ацетонски екстракт; \*<sup>M</sup>- метанолски екстракт;

#### **Tukey's HSD тестирање укупног антиоксидативног капацитета испитиваних екстраката**

Између екстраката лишаја *C. subulata* постоји статистички значајна разлика за вредности укупног антиоксидативног капацитета. Екстракти лишаја *C. subulata* показали су статистички значајну разлику у укупном антиоксидативном капацитету, у односу на екстракте других врста лишајева, осим у случају ацетонског екстракта у односу на ацетонски екстракт *P. acetabulum* где није устанољена статистички значајна разлика.

Екстракти лишаја *P. acetabulum* су се по укупном антиоксидативом капацитету међусобно статистички разликовали. Екстракти *P. acetabulum* у поређењу са екстрактима других врста лишајева су се разликовали, сем у случају са ацетонским екстрактом *C. subulata*. Ацетонски и метанолски екстракти лишаја *P. semipinnata* су се међусобно, а и односу на екстракте других врста лишајева, статистички значајно разликовали (Табела 20).

**Табела 20.** Статистичка анализа добијених резултата укупног антиоксидативног капацитета испитиваних узорака

Tukey's HSD тест			
Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност
<i>C. sub.<sup>A</sup>/C. sub.<sup>M</sup></i>	0,000	<i>C. sub.<sup>M</sup>/P. sem.<sup>M</sup></i>	0,000
<i>C. sub.<sup>A</sup>/P. acet.<sup>A</sup></i>	0,051	<i>P. acet.<sup>A</sup>/P.acet.<sup>M</sup></i>	0,000
<i>C. sub.<sup>A</sup>/P. acet.<sup>M</sup></i>	0,000	<i>P. acet.<sup>A</sup>/P. sem.<sup>A</sup></i>	0,003
<i>C. sub.<sup>A</sup>/P. sem.<sup>A</sup></i>	0,000	<i>P.acet.<sup>A</sup>/P. sem.<sup>M</sup></i>	0,000
<i>C. sub.<sup>A</sup>/P. sem.<sup>M</sup></i>	0,000	<i>P. acet.<sup>M</sup>/P. sem.<sup>A</sup></i>	0,000
<i>C. sub.<sup>M</sup>/P. acet.<sup>A</sup></i>	0,000	<i>P. acet.<sup>M</sup>/P. sem.<sup>M</sup></i>	0,000
<i>C. sub.<sup>M</sup>/P. acet.<sup>M</sup></i>	0,000	<i>P. sem.<sup>A</sup>/P. sem.<sup>M</sup></i>	0,008
<i>C. sub.<sup>M</sup>/P. sem.<sup>A</sup></i>	0,000		

\* *C. sub.*- *Cladonia subulata*; *P. acet.*-*Pleurosticta acetabulum*; *P. sem.*-*Physcia semipinnata*;

\*<sup>A</sup>-ацетонски екстракт; \*<sup>M</sup>- метанолски екстракт;

**Tukey's HSD тестирање способности неутралисања DPPH<sup>•</sup> радикала испитиваних екстраката**

Између свих тестираних екстраката лишајева (*Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*) и стандарда (аскорбинска киселина, бутилхидрокситолуен и гална киселина) постоји статистички значајна разлика у степену неутрализације DPPH<sup>•</sup> радикала односно у IC<sub>50</sub> вредностима. Статистички значајна разлика у неутрализацији DPPH<sup>•</sup> радикала постоји како у поређењу екстраката исте врсте лишаја тако и односу на екстракте других врста испитиваних лишајева (Табела 21).

**Табела 21.** Статистичка анализа добијених резултата способности неутралисања DPPH<sup>\*</sup> радикала испитиваних узорака

<b>Tukey's HSD тест</b>			
<b>Узорци</b>	<b>р-вредност</b>	<b>Узорци</b>	<b>р-вредност</b>
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>C. sub.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> /AA	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> /БХТ	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> /ГА	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> /AA	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> /AA	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> /БХТ	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> /БХТ	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> /ГА	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> /ГА	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> /AA	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> /БХТ	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> /ГА	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> /AA	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>M</sup> /AA	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> /БХТ	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>M</sup> /БХТ	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> /ГА	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>M</sup> /ГА	0,000
<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000	AA/БХТ	0,000
<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000	AA/ГА	0,139
<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000	БХТ/ГА	0,000

\* *C. sub.*- *Cladonia subulata*; *P. acet.*-*Pleurosticta acetabulum*; *P. sem.*-*Physcia semipinnata*;  
<sup>A</sup>-ацетонски екстракт; <sup>M</sup>- метанолски екстракт; AA-аскорбинска киселина; БХТ-бутилхидрокситолуен; ГА- гална киселина;

**Tukey's HSD** тестирање способности неутралисања **OH<sup>\*</sup>** радикала испитиваних екстраката

*Tukey's HSD* тестом је утврђено да статистички значајна разлика постоји између свих тестираних екстраката лишајева и стандарда у способности неутралисања OH<sup>\*</sup> радикала (IC<sub>50</sub> вредности), сем у случају метанолског екстракта лишаја *P. acetabulum* и

аскорбинске киселине где није утврђена статистички значајна разлика. Међу испитиваним екстрактима разлика није постајала само између ацетонског екстракта *P. acetabulum* и метанолског екстракта *P. semipinnata* (Табела 22).

**Табела 22.** Статистичка анализа резултата способности неутралисања ОН<sup>\*</sup> радикала узорака

Tukey's HSD тест			
Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>C. sub.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> /AA	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> /БХТ	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> /ГА	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> /AA	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> /AA	0,980
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> /БХТ	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> /БХТ	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> /ГА	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> /ГА	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> /AA	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> /БХТ	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> /ГА	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> /AA	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>M</sup> /AA	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> /БХТ	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>M</sup> /БХТ	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> /ГА	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>M</sup> /ГА	0,000
<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000	AA/БХТ	0,000
<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000	AA/ГА	0,000
<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,112	БХТ/ГА	0,000

\* *C. sub.*- *Cladonia subulata*; *P. acet.*-*Pleurosticta acetabulum*; *P. sem.*-*Physcia semipinnata*;  
<sup>A</sup>-ацетонски екстракт; <sup>M</sup>- метанолски екстракт; AA-аскорбинска киселина; БХТ-бутилхидрокситолуен; ГА- гална киселина;

**Tukey's HSD** тестирање редукујуће моћи испитиваних екстраката при концентracији од 1000 µg/ml

Tukey's HSD тестом је утврђено да статистички значајна разлика постоји између свих тестираних екстраката лишаја и стандарда (аскорбинска киселина) у редукционом капацитету (вредности апсорбанце) при концентracији узорака од 1000 µg/ml. Статистичка значајна разлика је утврђена између ацетонских и метанолских екстраката истих врста лишајева. Међу испитиваним екстрактима различитих врста лишајева, статистички значајна разлика у редукционом капацитету није установљена поређењем ацетонског екстракта *C. subulata* са ацетонским екстрактом *P. acetabulum* и метанолским екстрактом *P. semipinnata*. Статистички значајна разлика у редукционој моћи не постоји ни између ацетонског екстракта *P. acetabulum* и метанолског екстракта *P. semipinnata*, као ни између метанолског екстракта *P. acetabulum* и ацетонског *P. semipinnata*. У свим осталим случајевима поређења екстраката различитих врста испитиваних лишајева, установљена је статистички значајна разлика у редукционој моћи (Табела 23).

**Табела 23.** Статистичка анализа резултата редукционе моћи испитиваних узорака

Tukey's HSD тест			
Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>C. sub.</i> <sup>M</sup>	0,025	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,108	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,243
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> /AA	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,998	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,051
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> /AA	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> /AA	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> /AA	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,010	<i>P. sem.</i> <sup>M</sup> /AA	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> /AA	0,000		

**Tukey's HSD тестирање инхибиције липидне пероксидације испитиваних екстраката**

Tukey's HSD тестом је утврђено да статистички значајна разлика постоји између свих тестираних екстраката лишаја и стандардних супстанци (гална киселина, бутилхидрокситолуол и  $\alpha$ -токоферол) у инхибицији липидне пероксидације ( $IC_{50}$  вредности). Статистичка значајна разлика је утврђена између ацетонских и метанолских екстраката истих врста лишајева, сем у случају ацетонског и метанолског екстракта лишаја *Physcia semipinnata* чија се међусобна  $IC_{50}$  вредност није статистички значајно разликовала. Међу испитиваним екстрактима различитих врста лишајева, статистички значајна разлика у инхибицији липидне пероксидације није установљена поређењем метанолског екстракта *C. subulata* са метанолским екстрактом *P. semipinnata*. У свим осталим случајевима поређења екстраката разлитих врста испитиваних лишајева установљена је статистички значајна разлика у инхибицији липидне пероксидације (Табела 24).

**Табела 24.** Статистичка анализа резултата инхибиције липидне пероксидације испитиваних узорака

Tukey's HSD тест			
Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>C. sub.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / $\alpha$ -ТФ	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,019	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> /БХТ	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> /ГА	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / $\alpha$ -ТФ	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / $\alpha$ -ТФ	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> /БХТ	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> /БХТ	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> /ГА	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> /ГА	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,359
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> / $\alpha$ -ТФ	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,003	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> /БХТ	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,318	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> /ГА	0,000



<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> /α-ТФ	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>M</sup> /α-ТФ	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> /БХТ	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>M</sup> /БХТ	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> /ГА	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>M</sup> /ГА	0,000
<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000	α-ТФ/БХТ	1,000
<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,001	α-ТФ/ГА	0,000
<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000	БХТ/ГА	0,000

\* *C. sub.*- *Cladonia subulata*; *P. acet.*-*Pleurosticta acetabulum*; *P. sem.*-*Physcia semipinnata*;  
 \*<sup>A</sup>-ацетонски екстракт; \*<sup>M</sup>- метанолски екстракт; АА-аскорбинска киселина; БХТ-  
 бутилхидрокситолуен; ГА- гална киселина; α-ТФ- алфатокоферол;

**Tukey's HSD тестирање цитотоксичне активности испитиваних екстраката на HeLa ћелијама након 24 h инкубације**

Tukey's HSD тестом је утврђено да статистички значајна разлика постоји између свих тестираних екстраката лишајева и позитивне контроле (сапонин) у цитотоксичној активности (IC<sub>50</sub> вредности) према HeLa ћелијама након 24 h инкубације. Статистичка значајна разлика је утврђена између ацетонских и метанолских екстраката истих врста лишајева као и између екстраката који припадају различитим врстама лишајева (Табела 25).

**Табела 25.** Статистичка анализа резултата цитотоксичне активности екстраката на HeLa ћелијама након 24 h инкубације

Tukey's HSD тест			
Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>C. sub.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,001	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> /САП	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,018
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> /САП	0,024	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> /САП	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000

<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> /САП	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>M</sup> /САП	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> /САП	0,000		

\* *C. sub.*- *Cladonia subulata*; *P. acet.*-*Pleurosticta acetabulum*; *P. sem.*-*Physcia semipinnata*;

\*<sup>A</sup>-ацетонски екстракт; \*<sup>M</sup>- метанолски екстракт; САП- сапонин;

**Tukey's HSD тестирање антипролиферативне активности испитиваних екстраката на HeLa ћелијама након 72 h инкубације**

Tukey's HSD тестом је утврђено да статистички значајна разлика постоји између свих тестираних екстраката лишаја и позитивне контроле (Cis-ДДП) у антипролиферативној активности (IC<sub>50</sub> вредности) према HeLa ћелијама након 72 h инкубације. Статистичка значајна разлика је утврђена између ацетонских и метанолских екстраката истих врста лишајева. Међу испитиваним екстрактима различитих врста лишајева статистички значајна разлика у антипролиферативној активности није установљена поређењем ацетонског екстракта *C. subulata* са ацетонским екстрактом *P. semipinnata*, као и поређењем метанолног екстракта *P. acetabulum* и ацетонског екстракта *P. semipinnata*. У свим осталим случајевима поређења екстраката различитих врста испитиваних лишајева установљена је статистички значајна разлика у антипролиферативној активности (Табела 26).

**Табела 26.** Статистичка анализа резултата антипролиферативне активности екстраката на HeLa ћелијама након 72 h инкубације

Tukey's HSD тест			
Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>C. sub.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,673	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> /Cis-ДДП	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,570
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> /Cis-ДДП	0,002	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> /Cis-ДДП	0,000

<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> /Cis-ДДП	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>M</sup> /Cis-ДДП	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> /Cis-ДДП	0,000		

\* *C. sub.*- *Cladonia subulata*; *P. acet.*-*Pleurosticta acetabulum*; *P. sem.*-*Physcia semipinnata*;  
 \*<sup>A</sup>-ацетонски екстракт; \*<sup>M</sup>- метанолски екстракт; Cis-ДДП- *cis*-диаминдихлоро-платина;

**Tukey's HSD тестирање антипролиферативне активности испитиваних екстраката на LS174 ћелијама након 72 h инкубације**

Tukey's HSD тестом је утврђено да статистички значајна разлика постоји између свих тестираних екстраката лишаја и позитивне контроле (Cis-ДДП) у антипролиферативној активности (IC<sub>50</sub> вредности) према HeLa ћелијама након 72 h инкубације. Статистичка значајна разлика је утврђена између ацетонских и метанолских екстраката истих врста лишајева. Међу испитиваним екстрактима различитих врста лишајева статистички значајна разлика у антипролиферативној активности није установљена поређењем ацетонског екстракта *C. subulata* са метанолским екстрактом *P. semipinnata*. У свим осталим случајевима поређења екстраката различитих врста испитиваних лишајева установљена је статистички значајна разлика у антипролиферативној активности (27).

**Табела 27.** Статистичка анализа резултата антипролиферативне активности екстраката на LS174 ћелијама након 72 h инкубације

Tukey's HSD тест			
Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>C. sub.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,526	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / Cis-ДДП	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / Cis-ДДП	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000

<i>C. sub</i> <sup>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>M</sup> / Cis-ДДП	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> / Cis-ДДП	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>M</sup> / Cis-ДДП	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> / Cis-ДДП	0,000		

\* *C. sub*- *Cladonia subulata*; *P. acet.*- *Pleurosticta acetabulum*; *P. sem.*- *Physcia semipinnata*;

\*<sup>A</sup>-ацетонски екстракт; \*<sup>M</sup>- метанолски екстракт; Cis-ДДП- *cis*-диаминдихлоро-платина

## **5. Дискусија**

Морфолошке карактеристике талуса родова лишајева *Cladonia*, *Pleurosticta* и *Physcia* су веома варијабилне због чега је веома тешка идентификација. С тим у вези је веома значајно проучити хемотаксономију, а истовременом идентификацијом хемијских конституената, проучити и њихову потенцијалну фармацетску примену. Досадашњим фитохемијским студијама истражених *Cladonia*, *Pleurosticta* и *Physcia* врста је потврђено присуство активних састојака који по својој структури припадају кумаринима, флавоноидима, бифлавоноидима и депсидима. Ове групе једињења испољавају бројна фармаколошка и физиолошка дејства (157, 158). Посебан значај овог истраживања лежи у томе што до сада, постоји веома мало података о хемијском саставу и биолошкој активности врста лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*. Овим истраживањем се употпуњавају сазнања о нашим недовољно истраженим природним ресурсима лишајева. Рад је обухватио одређивање укупних фенола и флавоноида спектрофотометријском методом, као и идентификацију најзаступљенијих конституената (секундарних метаболита) применом течне хроматографије високих перформанси (*HPLC-UV*). Испитивана је антиоксидативна активност *in vitro* методама: укупни антиоксидативни капацитет, неутрализација DPPH<sup>•</sup> и ОН радикала, редукциони потенцијал и инхибиција липидне пероксидације. Део истраживања посвећен је и испитивању антитуморске активности МТТ тестом.

Испитиване врсте лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* су прикупљане на територији Р. Србије. Екстракти су припремљени екстракцијом по *Soxhlet*-у. Метода екстракција по *Soxhlet*-у у односу на друге методе екстракције као што је мацерација, перколација или класично рефлуктовање биљног материјала даје већи принос екстрактивних материја. Екстракција у *Soxhlet* апаратури се у пракси често користи за одређивање укупне количине екстрактивних материја у биљном материјалу за дати растварач и температуру. Математички опис (Паномерова једначина) се користи као мера масе екстрактивних материја које се растворе након потапања биљног материјала у растварач (159). Екстракција по *Soxhlet* -у се показала као добра метода за екстракцију лишајних материјала и добијања великог приноса секундарних метаболита из лишаја. *Najdenov*-а и сар. су показали да у односу на перколацију и мацерацију *Soxhlet* екстракција даје већи принос уснинске киселине

(дибензофуран) из врсте лишаја *Usnea barbata*, иначе главног носиоца антибактеријске активности лишаја (160, 161).

За припремање екстраката испитиваних врста лишајева коришћени су растварачи ацетон и метанол. Избор растварача често може бити пресудан за добијање већег садржаја фенолних једињења (162). За екстракцију фенолних једињења из биљног материјала најчешће су коришћени растварачи метанол, етанол, ацетон и етилацетат. Биљни феноли се веома разликују по поларности, тако да се често користе органски растварачи различите поларности у циљу да се што више хемијски различитих фенолних једињења екстрахује (163).

Испитивањем укупног фенолног садржаја у анализираним екстрактима лишајева установљен је висок садржај ових једињења. Садржај укупних фенола кретао се у опсегу од  $21,31 \pm 1,19$  до  $73,45 \pm 0,82$  mg GA/g (mg галне киселине по g сувог екстракта), при чему највећи садржај фенола је имао метанолски екстракт лишаја *Pleurosticta acetabulum*. Резултати одређивања укупних флавоноида у испитиваним екстрактима показали су умерени садржај ових једињења који се кретао у опсегу од  $8,48 \pm 0,57$  до  $19,27 \pm 0,37$  mg RU/g (mg рутина по g сувог екстракта), при чему највећи садржај флавоноида је имао метанолски екстракт лишаја *P. semipinnata*. Добијени резултати да метанолски екстракти садрже највећи садржај фенола и флавоноида су у складу са литературним подацима где је показано да су фенолна једињења (феноли, флавоноиди, флавонони...) растворљивија у поларнијим растварачима (164).

Упоређивањем резултата укупних флавоноида и укупних фенола испитиваних екстраката лишајева (*Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*) са литературним подацима врста лишајева из истих родова (*Cladonia*, *Pleurosticta* и *Physcia*), установљено је да испитивани екстракти у овом истраживању садрже исту или већу количину полифенолних једињења (94, 62, 165). Косанић и сар. су испитивали садржај укупних фенола и флавоноида у ацетонским екстрактима лишаја из рода *Cladonia* (*C. furcata*, *C. puxidata* и *C. rangiferina*) чије су се вредности за укупне феноле кретале у опсегу 28,00-35,35 mg GA/g а за флавоноиде 5,13-11,31 mg RU/g. Садржај укупних фенола и флавоноида у испитиваном ацетонском екстракту лишаја из рода *Cladonia* (врста: *Cladonia subulata*) у овом истраживању износио је  $39,97 \pm 0,89$  mg GA/g, односно за укупне

флавоноиде  $12,65 \pm 0,51$  mg RU/g, што је већа количина укупних фенола и флавоноида него у до сада испитиваним врстама из рода *Cladonia* (94).

Испитивање екстраката лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* HPLC-UV анализом обухватило је утврђивање присуства две класе секундарних метаболита: депсидона (хипопротоцетраринска киселина, фумаропротоцетраринска киселина, салазинска киселина, норстихнинска киселина и протоцетраринска киселина) и депсида (евернијска киселина, атранорин, леканорна киселина и обтусинска киселина). Депсидони су једна од класа секундарних метаболита лишајева који садрже 11Н-добензо[б,е][1,4]диоксепин-11-он прстен, супституисан у различитим позицијама. Депсидони као секундарни метаболити показују широк спектар биолошких активности: антимикуробна, антивирусна, антитуморска и антиоксидативна активност (166, 97). Депсиди спадају у једне од најважнијих секундарних метаболита лишајева и представљају полифенолна једињења која садрже две или више моноцикличних ароматичних јединица повезаних естарском везом. Поједини депсиди имају антибиотску, антиоксидаитвну и антипролиферативну улогу (97,167,168).

Поређењем испитиваних ацетонских и метанолских екстраката исте врсте лишајева утврђено је присуство истих метаболита, али су се интезитети сигнала и површина испод апсорпционог максимума одређених секундарних метаболита разликовали, што је у складу са способношћу растварача (ацетона и метанола) да раствори више или мање количине ових метаболита, по принципу «слично се у сличном раствара». Овакви подаци указују на утицај растварача различите поларности на екстракцију појединих компоненти из узорака (169). Испитивањем екстраката лишаја *Cladonia subulata* идентифиована је фумарапротоцетраринска киселина која је поларнији молекул од хипопротоцетраринске киселине, па је интезитет њеног сигнала већи у метанолском екстракту, што упућује на њену већу заступљеност у овим екстрактима. Фумаропротоцетраринска је од раније познат као лишајни метаболит рода *Cladonia* и изолован је из неколико врста овог рода. Досадашња истраживања су потврдила да овај депсидон поседује различите биолошке активности (антимикуробну, антиоксидативну и цитотоксичну) (94). HPLC анализом ацетонског и метанолског екстракта лишајева *Pleurosticta acetabulum*, као најдоминатнији (интезитет сигнала и површина испод апсорпционог максимума) секундарни метаболит се показала норстихнинска киселина. Интезитет сигнала норстихнинске киселине је био



сличан у ацетонском и метанолском екстракту. Норстихнинска киселина је широко распотраћен метаболит лишајева (IUPAC: 5,13,17-трихидрокси-7,12-диметил-9,15-диоксо-2,10,16триоксотетрациклооктадека-1(11),3,5,7,12,14(18)-хексан-4-карбаалдехид), за који је већ испитивана биолошка активност (антимикробна, антиоксидативна, антитуморска) досадашњим истраживањима. Норстихнинска киселина се може користити у таксономској класификацији лишајева (52, 170). Салазинска киселина је такође идентификована у екстрактима лишаја *Pleurosticta acetabulum* и њен интезитет је био израженији у метанолском екстракту. Салазинска киселина је идентификована у неким врстама из рода *Parmelia*, али ово је прво сазнање о присутности салазинске киселине у врсти лишаја *Pleurosticta acetabulum* (95). Остали идентификовани метаболити у екстрактима *Pleurosticta acetabulum* су били слабијег интезитета, што не умањује њихову улогу у биолошкој активности овог лишаја, као на пример атранорин чији је интезитет сигнала мали и за који је утврђено да има значајну биолошку активност (94). Атранорин спада у групу депсида  $\beta$ -орцинолског типа и има примену у медицини (126).

Анализом екстраката *Physcia semipinnata* утврђено је присуство карактеристичних једињења који до сада нису идентификовани у неким другим врстама из рода *Physcia*. И ацетонски и метанолни екстракт су истоветни квалитативно, али квантитативно по процентуалној заступљности појединачних пикова, метанолски екстракт се истиче са већим вредностима. Најинтензивнији сигнали потичу од секундарних метаболита: леканорне и евернијске киселине, који су идентификовани у неким другим лишајним врстама, и код којих су неке од биолошких активности раније испитане (99, 171). Осим ових метаболита, у ацетонском и метанолском екстракту лишаја *Physcia semipinnata* идентификовани су и обтусинска киселина и атранорин.

Досадашња истраживања су показала да многа фенолна једињења, а посебна она из групе флавоноида поседују антиоксидативну и антитуморску активност (172). Антиоксидативна активност фенолних једињења показана је у великом броју *in vitro* студија (173). Потенцијални механизми деловања фенолних једињења заснивају се на: хватању (неутралисање-*scavenging*) реактивних кисеоничних врста, спречавање стварања реактивних кисеоничних врста везивањем метала или инхибицијом ензима (174). Разноврсност и велики број структура флавоноида су резултат су бројних модификација њихових основних структура као што су додатне хидроксилације, о-метиловање

хидроксилних група, димеризације, везивање неорганског сулфата и гликолизација хидроксилних група или флавоноидног језгра. Флавоноиди показују широк спектар антиоксидативних својстава: везују металне јоне градећи хелате и способни су да прекину реакцију стварања слободних радикала (175). Осим антиоксидативне активности флавоноиди као и већина фенолних једињења поседују велики број биолошких активности: вазодилаторно, имуностимулаторно, антибактеријско, антиинфламаторно, антивирусно, и антиканцерогено (176, 177). С обзиром, да су фенолна једињења фармаколошки активна, а ми смо у нашем истраживању идентификовали фенолне компоненте, створила се потреба да испитамо и антиоксидативну и антитуморску активност екстракта лишјајева. Како фенолна једињења могу да делују антиоксидативно путем горе наведених различитих механизма, потребно је извршити више различитих *in vitro* тестова како би се надоместила комплексност дејства антиоксиданата (178).

Укупни антиоксидативни капацитет кретао се у опсегу од 25,36 до 74,29 mg AA/g (mg аскорбинске киселине по g сувог екстракта), при чему је највећи укупни антиоксидативни капацитет показао метанолски екстракт *P. acetabulum*, а најмањи метанолски екстракт *C. subulata*. Наведени резултати за укупни антиоксидативни капацитет су у позитивној корелацији хемијског састава и испољене активности, јер метанолски екстракт *P. acetabulum* је имао и највећи фенолни садржај, док је метанолски екстракт *C. subulata* имао најмањи садржај фенола и флавоноида.

Одређивање неутрализације DPPH• радикала је метода која је широко прихваћена због брзине, тачности методе као и због доступности DPPH реагенса. У овој методи долази до трансфера електрона са феноксидног аниона (179). Такође, у овом истраживању смо испитивали и неутралисање OH• радикала. Хидрокси радикали су кисеоничне реактивне врсте слободних радикала који настају метаболичким процесима (180). Добијене IC<sub>50</sub> вредности деловања екстракта лишјајева *C. subulata*, *P. acetabulum* и *P. semipinnata* на неутрализацију DPPH• радикала кретале су се у опсегу од 48,52± 0,77 до 296,75±0,61 µg/ml. Метанолски екстракт *P. acetabulum* је показао највећу антирадикалску активност у односу на остале испитиване екстракте (најмања IC<sub>50</sub>=48,52± 0,77 µg/ml), док је најмању антирадикалску активност показао метанолски екстракт лишјаја *C. subulata*. Уколико се међусобно пореде екстракти добијени од исте врсте лишјајева (ацетонски/метанолски) може се запазити да је у случају лишјајева *C. subulata* и *P.*

*semipinnata*, ацетонски екстракт показао бољу активност, док је у случају лишаја *P. acetabulum* то био метанолски екстракт. Поређењем са вредностима укупних фенола у екстрактима лишаја *P. semipinnata*, утврдило се да не постоји потпуна корелација фенолног и флавоноидног садржаја и способности неутралисања DPPH<sup>•</sup> радикала. Ацетонски екстракт *P. semipinnata* имао је мање вредности фенолног и флавоноидног садржаја а јачу антирадикалску активност мерену DPPH методом у односу на метанолски екстракт. Одсуство ове корелације је услед присуства нефенолних компоненти које имају антиоксидативну активност, као и услед синергизма или антагонизма појединих метаболита. Испитивани екстракти лишајева показали су антиоксидативну активност процењену преко способности неутралисања OH<sup>•</sup> радикала (IC<sub>50</sub>=163,83±0,95 до 595,35±7,78 µg/ml). Редослед антирадикалске активности испитиваних екстраката лишајева према неутралисању OH<sup>•</sup> радикала је истоветни као у претходним испитивањима антиоксидативне активности.

Редукциона способност може се користити као значајна мера антиоксидативне активности испитиваних екстраката лишајева. Принцип методе се заснива на томе да редукциони капацитет екстраката зависи од једињења које садрже а који могу донирати електроне и довести до разбијања слободно-радикалске ланчане реакције. Већа апсорбанца указује на већи редукциони капацитет (181). Испитивањем редукционе способности екстраката лишајева утврђено да је метанолски екстракт *P. acetabulum* испољио најјачи редукциони капацитет а метанолски екстракт *C. subulata* најслабији. У случају екстраката лишаја *P. semipinnata* не постоји корелација са резултатима укупног фенолног и флавоноидног садржаја.

Инхибиција липидне пероксидације почиње да се дешава након настанка липидног радикала. Испитивана једињења екстраката (потенцијални антиоксидатни) предају свој протон радикалу да би настала масна киселина (155). Анализом инхибиције липидне пероксидације испитиваних екстраката установљено да највећу способност инхибиције липидне пероксидације (а најмању IC<sub>50</sub> вредност=74,30±1,48 µg/ml) је испољио метанолски екстракт *P. acetabulum*, док је најмању способност инхибиције липидне пероксидације (највећа вредност IC<sub>50</sub>=151,96±2,79 µg/ml) показао метанолни екстракт лишаја *C. subulata*. Активности инхибиције липидне пероксидације испитиваних екстраката су се подударали са другим *in vitro* методама, једино је ацетонски екстракт *C.*

*subulata* показао бољу антиоксидативну активност у инхибицији липидне пероксидације него у осталим *in vitro* антиоксидативним методама.

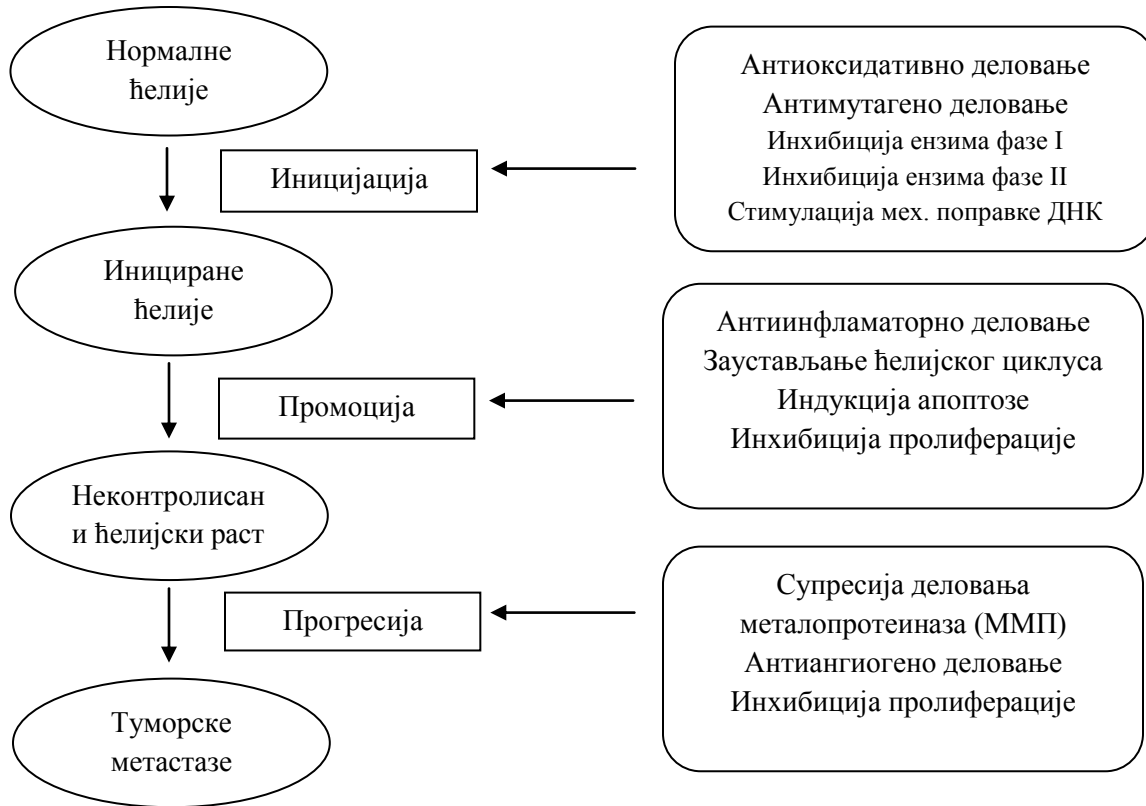
Испитивани екстракти лишајева *C. subulata*, *P. acetabulum* и *P. semipinnata* у овом истраживању испољили су различиту антиоксидативну активност. Њихова антиоксидативна активност је углавном била у позитивној корелацији са вредностима фенолног и флавоноидног садржаја. Ови резултати везе укупних фенола и антиоксидативне активности су у складу са другим литературним подацима (182). Одступања, где није постојала веза између укупних фенола и антиоксидативне активности (редукциони капацитет, неутралисање ОН радикала) лишаја *P. semipinnata* може се приписати деловању нефенолних састојака. *Odabasoglu* и сар. су испитивали редукциони капацитет метанолских и водених екстраката различитих врста лишајева и утврдили да не постоји корелација између антиоксидативне активности и укупних фенола (81). Такође, допринос појединачних компоненти у антиоксидативној активности је тешко одредити. Самим тим антиоксидативна активност екстраката се не може приписати дејству само једне компоненте, већ та активност зависи од интеракција супстанци које се налазе у екстракту, при чему може доћи до синергистичког или антагонистичког дејства различитих једињења (183).

Антиоксидативна активност је била предмет проучавања и других истраживача, који су испитивали антиоксидативне ефекте неких других врста лишајева. У поређењу са њиховим резултатима, резултати ове студије показују релативу јаку антиоксидативну активност (184).

Антитуморска активност испитиваних ацетонских и метанолских екстраката лишајева *C. subulata*, *P. acetabulum* и *P. semipinnata* на вијабилност и пролиферацију ћелијских линија одређивана је путем МТТ теста. Због својих потврђених антиоксидантних, антипролиферативних и цитотоксичних активности фенолна једињења биљних организама се могу користити као потенцијални антитуморски агенси.

Трансформација неизмењене „нормалне“ ћелије у малигну карактерише се низом генетичких и епигентетичких промена који обухватају процесе иницијацију, промоцију, прогресију, инвазију и метастазу. Контрола ћелијског циклуса се спроводи на одређеним контролним тачкама у току циклуса (185). Постоји много радова који показују да фенолна једињења могу деловати на G1/S или G2/M контролне тачке блокирајући пролиферацију.

(186, 187). Индукција апоптозе (програмирана ћелијска смрт) је један од главних механизма деловања антитуморских агенаса при чему долази активације протеолитичких ензима каспаза. Показано је да фенолна једињења индукују апоптозу активацијом каспазе (188).



**Слика 30.** Потенцијални механизми антитуморског деловања фенолних једињења

Испитивани ацетонски и метанолски екстракти углавном су показали антитуморску активност према циљним ћелијским линијама. Резултати испитивања вијабилности и пролиферације HeLa ћелија након деловања екстраката, показали су да најбољу цитотоксичну/цитостатичну активност су испољили ацетонски екстракт лишаја *C. subulata* ( $IC_{50} = 15,45 \mu\text{g/ml}$  -након 24 h инкубације;  $IC_{50} = 13,55 \mu\text{g/ml}$  - након 72 h инкубације) и ацетонски екстракт *P. acetabulum* ( $IC_{50} = 39,09 \mu\text{g/ml}$  -након 24 h инкубације;  $IC_{50} = 17,41 \mu\text{g/ml}$  - након 72 h инкубације). Према *American National Cancer Institute* (NCI), критеријум за цитотоксичну активност екстракта је  $IC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$  (189). Антипролиферативна активност испитиваних екстраката према ћелијама LS174 била је знатно слабија него према HeLa ћелијама. Најбољу антипролиферативну активност према LS174 ћелијама

испољио је ацетонски екстракт лишаја *P. acetabulum* ( $IC_{50} = 45,94 \mu\text{g/ml}$ ). Најслабију антитуморску активност према обе ћелијске линије испољио је метанолски екстракт лишаја *C. subulata* ( $IC_{50} = >200 \mu\text{g/ml}$ ). Упоредјујући врсту растварача који се користио за екстракцију установили смо да је у случају све три врсте лишајева, ацетонски екстракти имали већу способност инхибиције ћелијског раста него метанолски екстракти. Облик криве зависности инхибиције ћелијског раста од концентрације, показује инхибицију ћелијског раста на дозно зависан начин.

Разлике у антитуморском деловању између различитих врста испитиваних лишајева се могу тумачити присуством различитих секундарних метаболита како у квалитативном тако и у квантитативном смислу. Тешко је одредити и утврдити допринос појединачних идентификованих фенолних секундарних метаболита на укупан антитуморски ефекат. Активност екстраката може бити резултат синергистичког или антагонистичког деловања различитих једињења. *Seeram* и сарадници су установили повећање апоптотског ефекта и инхибиције ћелијске пролиферације код туморских ћелија (HT-29 и HCT116) након њиховог третирања смешом пуникалагина и елагне киселине у екстракту нара, у поређењу са утицајем појединачних супстанци (190).

Неки од идентификованих секундарних метаболита у испитиваним врстама лишајева су били предмет испитивања антитуморске активности од стране и других студија: фумаропротоцетраринска киселина и атранорин (94), салазинска и протоцетраринска киселина (95), евернијска киселина (99), обтусинска киселина (120), леканорна киселина (191), норстихнинска киселина (192). Прегледом литературе устанољено је да постоји веома мали број података о антитуморској активности екстраката лишајева с обзиром на до сада већ огромни број идентификованих врста лишајева.

## **6. Закључак**

Циљ проучавања ове докторске дисертације био је испитивање хемијског састава ацетонских и метанолских екстраката лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* као и њихове антиоксидативне и антитуморске активности. На основу добијених резултата изведени су следећи закључци:

- Екстракцијом по *Soxhlet*-у употребом ацетона и метанола, добијени су ацетонски и метанолски екстракти лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*.
- *HPLC-UV* анализом испитиваних екстраката лишајева, утврђено је присуство секундарних метаболита из група депсидона (хипопротоцетраринска киселина, фумаропротоцетраринска киселина, салазинска киселина, норстихнинска киселина и протоцетраринска киселина) и депсида (евернијска киселина, атранорин, леканорна киселина и обтусинска киселина).
- Фумаропротоцетраринска и хипопротоцетраринска киселина су присутни у екстрактима врсте лишаја *C. subulata*. Релативна заступљеност изражена као % удела пика у укупној површини пикова *HPLC* хроматограма била је за фумаропротоцетраринску киселину (као најинтензивнијег пика у оба екстракта) 46,2 % (ацетонски екстракт) и 90,8 % (метанолски екстракт), респективно.
- Салазинска, норстихнинска, протоцетраринска, евернијска киселина и атранорин су присутни у екстрактима врсте лишаја *P. acetabulum*, при чему атранорин није идентификован у метанолском екстракту ове врсте лишаја. Релативна заступљеност изражена као % удела пика у укупној површини пикова *HPLC* хроматограма била је за норстихнинску киселину (као најинтензивнијег пика у оба екстракта) 75,4 % (ацетонски екстракт) и 71,8 % (метанолски екстракт), респективно.
- Леканорна, евернијска, обтусинска киселина и атранорин су присутни у екстрактима врсте лишајева *P. semipinnata*. Релативна заступљеност изражена као % удела пика у укупној површини пикова *HPLC* хроматограма била је за: леканорну киселину 32,8% (ацетонски екстракт), 33,1% (метанолски екстракт), за евернијску киселину 31,8% (ацетонски екстракт), 38,8% (метанолски екстракт) као два најдоминантнија метаболита у испитиваним екстрактима ове врсте лишајева.



- У погледу садржаја укупних фенола испитивани екстракти су имали значајне количине истих. Највећи садржај укупних фенола имали су метанолски екстракт лишаја *P. acetabulum* ( $73,45 \pm 0,82$  mg EGA/g) и метанолски екстракт *P. semipinnata* ( $59,20 \pm 2,13$  mg EGA/g).
- Испитивани екстракти лишаја садрже и значајне количине флавоноида, при чему највећи садржај укупних флавоноида су имали метанолски екстракт *P. semipinnata* ( $19,27 \pm 0,37$  mg ERU/g) и метанолски екстракт лишаја *P. acetabulum* ( $15,42 \pm 0,55$  mg ERU/g).
- Укупни антиоксидативни капацитет екстраката лишајева био је опсегу  $25,36$  до  $74,29$  mg AA/g. Највећи антиоксидативни капацитет имао је метанолски екстракт *P. acetabulum* ( $74,29 \pm 1,36$  mg AA/g), што је у сагласности са испитивањем укупног фенолног садржаја.
- Испитивани екстракти лишајева показали су способност неутрализације DPPH<sup>•</sup> радикала, при чему је највећу способност испољио метанолски екстракт лишаја *P. acetabulum* (IC<sub>50</sub> =  $48,52 \pm 0,77$  µg/ml), а најслабији ефекат показао је метанолски екстракт *C. subulata* (IC<sub>50</sub> =  $296,75 \pm 0,61$  µg/ml)
- Резултати испитивања су показали да екстракти лишајева имају и способност неутралисања OH<sup>•</sup> радикала али при већим концентрацијама екстраката. Најбољи ефекат неутралисања OH радикала показао је метанолски екстракт *P. semipinnata* (IC<sub>50</sub> =  $163,83 \pm 0,95$  µg/ml).
- Јачина редукујућег капацитета испитиваних екстраката лишајева опадала је по редоследу: метанолски екстракт *P. acetabulum* > ацетонски екстракт *P. semipinnata* > ацетонски *P. acetabulum* > метанолски *P. semipinnata* > ацетонски *C. subulata* > метанолски *C. subulata*.
- Потенцијал инхибиције липидне пероксидације испитиваних екстраката лишајева креће се у опсегу IC<sub>50</sub> вредности од  $74,30 \pm 1,48$  до  $151,96 \pm 2,79$  µg/ml при чему највећу способност инхибиције липидне пероксидације (а најмању IC<sub>50</sub> вредност) испољио је метанолски екстракт *P. acetabulum*.
- Процена антитуморске активности одређена је на две ћелијске линије (HeLa S3 и LS174) у *in vitro* условима, при чему је антипролиферативна и цитотоксична активност екстраката лишајева била израженија према HeLa ћелији.

- У случају цитотоксичне активности према HeLa ћелијској линији након 24 h инкубације, најбоље инхибиторно дејство је показао ацетонски екстракт *C. subulata* ( $IC_{50} = 15,45 \pm 2,26 \mu\text{g/ml}$ ).
- Испитивањем антипролиферативне активности према HeLa ћелији након 72 h инкубације, најбољу активност су показали ацетонски екстракт *C. subulata* ( $IC_{50} = 13,55 \pm 3,17 \mu\text{g/ml}$ ) и ацетонски екстракт *P. acetabulum* ( $IC_{50} = 17,41 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$ ). Ова два екстракта се статистички значајно не разликују по испољеној антипролиферативној активности ( $p > 0,05$ ).
- Резултати испитивања антипролиферативне активности према LS174 ћелијској линији након 72 h инкубације, показали су да најбољу активност испољава метанолски екстракт *P. acetabulum* ( $IC_{50} = 45,94 \pm 1,28$ ).

На основу добијених резултата (идентификација секундарних метаболита, укупан садржај фенола и флавоноида, антиоксидативна и антитуморска активност) се може препоставити да *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* у будућности могу наћи своју потенцијалну примену у медицини, фармацеутској, прехранбеној и козметичкој индустрији, као и у развоју нових фитопрепарата. Фитохемијском анализом лишајних метаболита расте могућност да се пронађе ново, биолошки и фармаколошки активно једињење.

## **7. Литература**

1. Firenzuoli F, Luigi G. Herbal Medicine Today: Clinical and Research Issues. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2007; 4(1): 37–40.
2. Evans WC. Trease and Evans' pharmacognosy. Elsevier Health Sciences, 2009.
3. Honegger R. Functional aspects of the lichen symbiosis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 1991; 42(1): 553–578.
4. Kirk PM, Cannon PF, Minter DW. Dictionary of the fungi, 10th edn. CAB, 2008; Wallingford, Oxon, UK.
5. Lücking R, Lawrey JD, Sikaroodi M, Gillevet PM, Chaves JL, Sipman HJM, Bungartz F. Do lichens domesticate photobionts like farmer domesticate crop? Evidence from previously unrecognized lineage of filamentous cyanobacteria. American Journal of Botany 2009; 96 (8):1409-1418.
6. Oksanen I. Ecological and biotechnological aspects of lichens. Applied Microbiology and Biotechnology 2006; 73(4): 723-734.
7. Hale ME. The biology of lichens 1983; Edward Arnold, London,
8. Nash TH. Lichen biology 1996; Cambridge University Press, Cambridge.
9. Ahmadijan V. The lichen symbiosis 1993; Wiley, New York, pp 1–250.
10. Hawksworth DL, Hill DJ. The Lichen-forming Fungi 1984. Glasgow: Blackie.
11. DePriest PT. Early molecular investigation of lichen-forming symbionts 1986-2001. Annual Review of Microbiology 2004; 58: 273-301.
12. Molnár K, Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites, a review. Z Naturforsch 2010; 65(3-4): 157-173.
13. Bačkor M, Fahselt D. Lichen photobionts and metal toxicity (review article). Symbiosis, 2008; 46(1): 1–10.
14. Nash TH. III (ed) Lichen biology, 2nd edn 2008; Cambridge University Press, Cambridge
15. Johnson EA. Vegetation Organization and Dynamics of Lichen Woodland Communities in the Northwest Territories, Canada. Ecology society of America 1981; 62(1): 200–215.
16. Herderb DM, Kytöviita MM, Niemelä P. Growth of reindeer lichens and effects of reindeer grazing on ground cover vegetation in a Scots pine forest and a subarctic heathland in Finnish Lapland. Ecography 2003; 26(1): 3-12.
17. Hawksworth DL. Lichens as a litmus for air pollution: a historical review. International Journal of Environmental Studies 1971; 1(1-4): 281–296.

18. Tiwari P K. Lichens as an indicator for Air Pollution: A Review. *Indian Journal of Industrial Pollution Control*, 2008; 1: 8-17.
19. Rosentreter R, Eldridge D J. Monitoring biodiversity and ecosystem function: grasslands, deserts, and steppe. In *Monitoring with Lichens – Monitoring Lichens*. Nato Science Series IV: Earth and Environmental Sciences, ed. P. L. Nimis, C. Scheidegger and P. A. Wolseley, 2002; pp. 223–237. Dordrecht: Kluwer Academic.
20. Cislaghi C, Nimis PL. Lichens, air pollution and lung cancer. *Nature* 1997; 387: 463–464.
21. Hawksworth, DL. (2002). Bioindication: calibrated scales and their utility. In *Monitoring with Lichens – Monitoring Lichens*, Nato Science Series IV: Earth and Environmental Sciences, ed. P. L. Nimis, C. Scheidegger and P. A. Wolseley, pp. 11–20. Dordrecht: Kluwer Academic.
22. Nash TH, Gries C. Lichens as bioindicators of sulfur dioxide. *Symbiosis* 2002; 33(1): 1–21.
23. Cicek A, Kopaal AS, Aslan S, Yazici K. Accumulation of Heavy Metals from Motor Vehicles in Transplanted Lichens in an Urban Area. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 2008; 39(1-2): 168-176.
24. Richardson DHS. Pollution monitoring with lichens. The Richmond Publishing Co. Ltd., Slough 1992; 76 pp.
25. Richardson DHS. (1988). Medicinal and other economic aspects of lichens. In *Handbook of Lichenology*, Vol. 3, ed. M. Galun, pp. 93–108. Boca Raton: CRC Press.
26. Richardson DHS. Lichens and man. In Hawksworth DL, ed., *Frontiers in Mycology* 187-210, 1991. Wallingford: CAB International
27. Moxham TH. Lichens and perfume manufacture. *Bulletin of the British Lichen Society*, 1980; 47: 1–2.
28. Henderson A. Lichen dyes. An historical perspective. *Lees Museums and Galleries Review* 1999; 2: 30–34.
29. Crawford S. Ethnolichenology of *Bryoria fremontii*: wisdom of elders, population ecology, and nutritional chemistry. M.Sc. thesis 2007. University of Victoria, Canada.
30. Upreti DK, Chatterjee S. Significance of lichens and their secondary metabolites: a review. In: Ganguli BN, Deshmukh SK (eds) *Fungi: multifaceted microbes*. Anamaya, New Delhi 2007; 2: 169–188.

31. Richardson DHS. The vanishing lichens: their history and importance. Hafner, New York. 1974.
32. Llano GA. Economic uses of lichens. *Economic Botany* 1948; 2 (1): 15–45.
33. Kari PR. Tanaina Plantlore. US National Park Service, Anchorage, AK. 1987.
34. Wang LS, Narui T, Harada H. Ethnic uses of lichens in Yunnan, China. *The Bryologist* 2001; 104 (3): 345–349.
35. Chevallier A. The encyclopedia of Medicinal Plants, Dorling Kindersley, London 1996.
36. Black PL, Arnason JT, Cuerrier A Medicinal plants used by the Inuit of Qikiqtaaluk (Baffin Island, Nunavut). *Botany* 2008; 86 (2):157–163.
37. Bown D. Encyclopedia of herbs and their uses. Dorling Kindersley.2001.
38. Powers S. Aboriginal botany. In: Tribes of California. Government Printing House, Washington 1877; pp 419–431.
39. Agelet A, Valle`s J. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part III. Medicinal uses of non-vascular plants. *J Ethnopharmacol* 2003; 84: 229–234.
40. Kiringe JW. A survey of traditional health remedies used by the Maasai of Southern Kaijiado District. *Kenya Ethnobot Res Appl* 2008; 4:61–74.
41. Allen DE, Hatfield G. Medicinal plants in folk tradition: an ethnobotany of Britain and Ireland. Timber, Portland, 2004.
42. Malhotra S, Subban R, Singh A. Lichens-role in traditional medicine and drug discovery. *The Internet Journal of Alternative Medicin* 2008; 5(2): 1-5.
43. Guvenc A, Kupeli AE, Suntar I. Biological activities of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf extracts and isolation of the active compounds. *J Ethnopharmacol* 2012; 144(3): 726–734.
44. Hellson JC, Gadd M. Ethnobotany of the Blackfoot Indians. National Museum of Man. Mercury Series 19. Ottawa, Canada 1974.
45. Smith HH. Ethnobotany of the Forest Potawatomi Indians. *Bull Public Mus Milwaukee* 1933; 7:1–3.
46. Uprety Y, Asselin H, Dhakal A, Julien N. Traditional use of medicinal plants in the boreal forest of Canada: review and perspectives. *J Ethnobiol Ethnomed* 2012; 8 (1):7.
47. Fahselt D. Carbon metabolism in lichens. *Symbiosis* 1994; 17: 127–182.

48. Rankovic B (ed.). Lichen Secondary Metabolites: Bioactive properties and pharmaceutical potential. Springer, 2014; 1:1-26.
49. Mosbach K. Biosynthesis of lichen substances, products of a symbiotic association. *Angewandte Chemie, International Edition* 1969; 8:240–250.
50. Bačkorová M, Jendželovský R, Kello M, Bačkor M, Mikeš J, Fedoročko P. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicology in Vitro* 2012; 26(3): 462-468.
51. Dayan FE, Romagni JG, Lichens as a potential source of pesticides. *Pestic Outlook* 2001. 12(6): 229-232.
52. Ranković B, Kosanić M, Stanojković T, Vasiljević P, Manojlović N. Biological activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* together with their norstictic acid and usnic acid constituents. *International journal of molecular sciences* 2012; 13(11): 14707-14722.
53. Marques J. A framework for assessing the vulnerability of schist surfaces to lichen-induced weathering in the Upper Douro region (NE Portugal). Directores: Rubim Almeida y Graciela Paz. Universidad: Universidade de Porto. Fecha de lectura 2013;
54. Stocker-Wörgötter E. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Nat Prod Rep* 2008; 25(1):188–200.
55. Zhou OM, Guo SY, Huang MR, Wei JC. A study of the genetic variability of *Rhizoplaca chrysoleuca* using DNA sequences and secondary metabolic substances. *Mycologia* 2006; 98(1): 57–67.
56. Hager A, Brunauer G, Türk R, Stocker-Wörgötter E. Production and bioactivity of common lichen metabolites as exemplified by *Heterodea muelleri* (Hampe) Nyl. *Journal of chemical ecology* 2008; 34(2): 113-120.
57. Nelsen MP, Gargas A. Phylogenetic distribution and evolution of secondary metabolites in the lichenized fungal genus *Lepraria* (Lecanorales: Stereocaulaceae). *Nova Hedwigia* 2008; 86 (1-2): 115–131.
58. Culberson CF, Elix JA. Lichen substances. In *Methods in Plant Biochemistry, Vol. 1: Plant Phenolics*, ed. P. M. Dey and J. B. Harborne, pp. 509–535. London: Academic Press 1989.
59. Huneck S. New results on the chemistry of lichen substances. In *Progress in the Chemistry of Organic Products*, ed. W. Herz, H. Falk, G. W. Kirby and R. E. Moore,

- pp. 1–276. New York: Springer 2001.
60. Yamamoto Y, Kinoshita Y, Matsubara H. Screening of biological activities and isolation of biological-active compounds from lichens. *Recent Res Dev Phytochem* 1998; 2:23–34.
  61. Boustie J, Grube M. Lichens—a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genet Resour* 2005; 3(2): 273–287.
  62. Kosanić MM, Ranković BR, Stanojković TP. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of three *Parmelia* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2012; 92(9): 1909-1916.
  63. Ranković BR, Kosanić MM, Stanojković TP. (2011). Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. *BMC complementary and alternative medicine* 2011; 11(1):97.
  64. Zhang XY, Chen C, Xiu MH. The novel oxidative stress marker thioredoxin is increased in first-episode schizophrenic patients. *Schizophrenia Research* 2009. 113(2): 151–157.
  65. Lu Y, Foo LY. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry* 2001; 75(2): 197–202.
  66. Vagi E, Rapavi E, Hadolin M, Vasarhelyine Peredi K, Balazs A, Blazovics A., Simandi B. Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. *Journal of agricultural and food chemistry* 2005; 53(1): 17-21.
  67. Kumar J, Dhar P, Tayade AB, Gupta D, Chaurasia OP, Upreti DK, Srivastava RB. Antioxidant capacities, phenolic profile and cytotoxic effects of saxicolous lichens from trans-Himalayan cold desert of Ladakh 2014; *PloS one* 2014; 9(6): e98696.
  68. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996; 16(1): 33–50.
  69. Lobo V, Patil A, Phatak A et al (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev* 2010. 4(8): 118–126.
  70. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000; 49(2):3–8.
  71. Souri E, Amin G, Farsam H, Jalalizadeh H, Barezi S. Screening of thirteen medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Iran J Pharm Res* 2008; 7:149–154.
  72. Heinonen IM, Meyer AS, Frankel EN., Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation, *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46(10): 4107-4112.



73. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry* 2000; 55(6): 481–504.
74. Paudel B, Datta Bhattarai H, Prasad Pandey D, Seoun Hur J, Gyu Hong S, Kim IC, Han Yim J. Antioxidant, antibacterial activity and brine shrimp toxicity test of some mountainous lichens from Nepal. *Biological research* 2012; 45(4): 387-391.
75. Watson RR. Polyphenols in plants: isolation, purification and extract preparation. Academic press, London 2014.
76. Sawa T, Nakao M, Akaike T, Ono K, Maeda H. Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999; 47(2): 397-402.
77. Moure A, Cruz J.M, Franco D, Domínguez JM., Sineiro J, Domínguez H, Parajó JC. Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry* 2001; 72(2): 145-171.
78. Odabasoglu F, Aslan A, Cakir A, Suleyman H, Karagoz Y, Halici M, Bayir Y. Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species. *Phytotherapy Research* 2004; 18(11): 938-941.
79. Poornima G, Kekuda PTR, Vinayaka KS. Antioxidant efficacy of *Olea dioica* Roxb (Oleaceae) leaves. *Biomedicine* 2012; 32(4): 506–510.
80. Rekha C, Poornima G, Manasa M, Abhipsa V, Devi PJ, Kumar VHT, Kekuda PTR. Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. *Chemical Science Transactions* 2012; 1(2): 303-310.
81. Odabasoglu F, Aslan A, Cakir A, Suleyman H, Karagoz Y, Bayir Y, Halici M. Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia* 2005; 76(2): 216-219.
82. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews* 1998; 56(11): 317-333.
83. Kleemann R, Verschuren L, Morrison M, Zadelaar S, van Erk MJ, Wielinga PY, Kooistra T. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models. *Atherosclerosis* 2011; 218(1); 44-52.
84. Yamamoto Y, Miura Y, Higuchi M, Kinoshita Y, Yoshimura I. Using lichen tissue cultures in modern biology. *Bryologist* 1993; 96:384-393.

85. Aslan A, Güllüce M, Sökmen M, Adıgüzel A, Sahin F, Özkan H. Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Lichens *Cladonia foliacea*., *Dermatocarpon miniatum*., *Everinia divaricata*., *Evernia prunastri*., and *Neofuscella pulla*. *Pharmaceutical biology* 2006; 44(4): 247-252.
86. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Tošić S, Stanković M, Radojević I, Marković S. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International Journal of Molecular Sciences* 2011. 12(8): 5428-5448.
87. Kumar SP, Kekuda TP, Vinayaka KS, Sudharshan SJ. Anthelmintic and antioxidant efficacy of two macrolichens of Ramalinaceae. *Pharmacognosy Journal*, 2009; 1(4): 238-242.
88. Yücel O, Odabaşoğlu F, Güllüce M, Zeki Z, Çalik AÇ, Aslan A, Halici M. Antioxidant and antimicrobial properties of a lichen species, *Cladonia rangiformis* growing in Turkey. *Turkish J. Pharm. Sci* 2007; 4(2): 101-109.
89. Verma N, Behera BC, Makhija U. Antioxidant and hepatoprotective activity of a lichen *Usnea ghattensis* in-vitro. *Appl Biochem Biotechnol* 2008; 151(2-3):167–181.
90. Kumar SP, Kekuda TP, Vinayaka KS, Sudharshan SJ, Mallikarjun N, Swathi D. Studies on antibacterial, anthelmintic and antioxidant activities of a macrolichen *Parmotrema pseudotinctorum* (des. Abb.) Hale (Parmeliaceae) from Bhadra wildlife sanctuary, Karnataka. *International Journal of PharmTech Research* 2010; 2(2):1207-1214.
91. Kosanić M, Ranković B, Vukojević J. Antioxidant properties of some lichen species. *Journal of Food Science and Technology* 2011; 48(5):584–590.
92. Tomović J, Rančić A, Vasiljević P, Mašković P, Živanović S, Manojlović N, Sovrlić M. Antioxidant activity of lichen *Cetraria aculeata*. *Praxis medica* 2016; 45(3-4): 93-99.
93. Kosanić M, Ranković B. Lichens as possible sources of antioxidants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011; 24: 165–170.
94. Kosanić M, Ranković B, Stanojković T, Rančić A, Manojlović N. *Cladonia* lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *LWT-Food Science and Technology* 2014; 59(1): 518-525.
95. Manojlović N, Ranković B, Kosanić M, Vasiljević P, Stanojković T. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine* 2012; 19(13): 1166-1172.

96. Vivek MN, Kambar Y, Manasa M, Kekuda TR, Vinayaka KS. Radical scavenging and antibacterial activity of three Parmotrema species from Western Ghats of Karnataka, India. *J App Pharm Sci* 2014; 4:086–091.
97. Hidalgo ME, Ferna, E, Quilhot W, Lissi, E. Antioxidant activity of depsides and depsidones. *Phytochemistry*, 1994; 37(6): 1585-1587.
98. Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, Piovano M, Garbarino JA, Nicoletti M, Celenza G. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study. *Phytotherapy research*, 2013; 27(3): 431-437.
99. Kosanić M, Manojlović N, Janković S, Stanojković T, Ranković B. Evernia prunastri and Pseudoevernia furfuraceae lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food and chemical toxicology*, 2013; 53: 112-118.
100. Ranković B, Kosanić M, Manojlović N, Rančić A, Stanojković T. Chemical composition of Hypogymnia physodes lichen and biological activities of some its major metabolites. *Medicinal Chemistry Research*, 2014; 23(1): 408-416.
101. Karikas GA. Anticancer and chemopreventing natural products: some biochemical and therapeutic aspects. *J BUON* 2010; 15(4) :627–638.
102. Vidya Priyadarsini R, Nagini S. Cancer chemoprevention by dietary phytochemicals: promises and pitfalls. *Current pharmaceutical biotechnology* 2012; 13(1): 125-136.
103. Tsuda H, Ohshima Y, Nomoto H, Fujita KI, Matsuda E, Iigo M, Moore MA. Cancer prevention by natural compounds. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 2004; 19(4): 245-263.
104. Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and cancer* 2009; 62(1): 1-20.
105. Lam KS. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in microbiology* 2007; 15(6): 279-289.
106. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod* 2016; 79(3), 629-661.
107. Muggia L, Schmitt I, Grube M. Lichens as treasure chests of natural products. *SIM NEWS* 2009. 85–97.

108. Zeytinoglu H, Incesu Z, Tuylu BA, Turk AO, Barutca B. Determination of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic potential of the extract from lichen *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. in vitro. *Phytotherapy Research* 2008; 22(1): 118-123.
109. Ingólfssdóttir K, Kook Lee S, Bhat KP, Lee K, Chai HB, Kristinsson H, Jang MS. Evaluation of selected lichens from Iceland for cancer chemopreventive and cytotoxic activity. *Pharmaceutical biology* 2000; 38(4): 313-317.
110. Bézivin C, Tomasi S, Lohezic-Le Devehat F, Boustie J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine* 2003; 10(6-7): 499-503.
111. Manojlović NT, Vasiljević P, Jusković M, Janković SNS. HPLC analysis and cytotoxic potential of extracts from the lichen, *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*. *Journal of Medicinal Plants Research* 2010; 4(9): 817-823.
112. Ari F, Celikler S, Oran S, Balikci N, Ozturk S, Ozel MZ, Ulukaya E. Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. on breast cancer cells. *Environmental toxicology* 2014; 29(7): 804-813.
113. Türkez H, Aydın E, Aslan A. Effects of lichenic extracts (*Hypogymnia physodes*, *Ramalina polymorpha* and *Usnea florida*) on human blood cells: cytogenetic and biochemical study. *Iranian journal of pharmaceutical research IJPR* 2012; 11(3): 889-896.
114. Shibata S, Nishikawa Y, Tanaka M, Fukuoka F, Nakanishi M. Antitumour activities of lichen polysaccharides. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1968; 71(1): 102-104.
115. Morris Kupchan S, Kopperman HL. L-Usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1975; 31(6): 625-625.
116. Hirayama T, Fujikawa F, Kasahara T, Otsuka M, Nishida N, Mizuno D. Anti-tumor activities of some lichen products and their degradation products (author's transl). *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 1980; 100(7), 755.
117. Cain BF. Potential anti-tumour agents. IV. Polyporic acid series. *J Chem Soc Perkin* 1966; 11:1041–1045.
118. Shibamoto T, Wei CL. Mutagenicity of lichen constituents. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1984; 6(5): 757-762.
119. Kosanic M, Rankovic B, Stanojkovic T, Vasiljevic P, Manojlovic N. Biological activities and chemical composition of lichens from Serbia. *EXCLI journal* 2014; 13: 1226.

120. Ristic S, Rankovic B, Stamenkovic S. Biopharmaceutical potential of two Ramalina lichens and their metabolites. *Current pharmaceutical biotechnology* 2016; 17(7): 651-658.
121. Nishikawa Y, Ohno H. Studies on the water-soluble constituents of lichens. IV. Effect of antitumor lichen-glucans and related derivatives on the phagocytic activity of the reticuloendothelial system in mice. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1981; 29(11): 3407-3410.
122. Demleitner S, Kraus J, Franz G. Synthesis and antitumour activity of sulfoalkyl derivatives of curdlan and lichenan. *Carbohydrate research*, 1992; 226(2): 247-252.
123. Rundel PW. The ecological role of secondary lichen substances. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1978; 6(3): 157-170.
124. Burkholder PR, Evans AW, McVeigh I, Thornton HK. Antibiotic activity of lichens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1944; 30(9): 250-255.
125. Yılmaz M, Türk AÖ, Tay T, Kıvanç M. The Antimicrobial Activity of Extracts of the Lichen *Cladonia foliacea* and Its (-)-Usnic Acid, Atranorin, and Fumarprotocetraric Acid Constituents. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2004; 59(3-4): 249-254.
126. Ingoldsdottir K. Usnic acid. *Phytochemistry* 2002; 61(7): 729-736.
127. Hale ME. *The biology of lichens*. Arnold, London 1974.
128. Huneck S, Schreiber K. Wachstumsregulatorische eigenschaften von flechten-und moos-inhaltsstoffen. *Phytochemistry* 1972; 11(8): 2429-2434.
129. Ranković B, Mišić M, Sukdolak S. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. *World journal of microbiology and biotechnology* 2008; 24(7): 1239-1242.
130. Ranković B, Mišić M. The antimicrobial activity of the lichen substances of the lichens *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna*, *Parmelia caperata* and *Parmelia conspresa*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2008; 22(4): 1013-1016.
131. Odimegwu DC, Ejikeugwu C, Esimone CC. Lichen secondary metabolites as possible antiviral agents. In *Lichen Secondary Metabolites* (pp. 165-177). Springer International Publishing 2015.
132. Vijayakumar CS, Viswanathan S, Reddy MK, Parvathavarthini S, Kundu AB, Sukumar E. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia* 2000; 71(5): 564-566.

133. Cetin H, Tufan-Cetin O, Turk AO, Tay T, Candan M, Yanikoglu A, Sumbul H. (2008). Insecticidal activity of major lichen compounds,(-)-and (+)-usnic acid, against the larvae of house mosquito, *Culex pipiens* L. *Parasitology research* 2008; 102(6): 1277-1279.
134. Lough WJ, Wainer IW, High Performance Liquid Chromatography, Fundamental principles and practice, CRC press 1995.
135. Milovanović G. Hromatografske metode odvajanja, PMF Univerziteta u Beogradu I Jugoslovenski zavod za produktivnost rada i informacione sisteme, Beograd, 1985.
136. Todorović M. Optičke metode instrumentalne analize, Hemijski fakultet, Beograd, 1997.
137. Манојловић Н. Инструменталне спектроскопске и хроматографске методе анализе. Факултет медицинских наука, Крагујевац, 2016.
138. Weber ex F. H. Wigg. in Wiggers. 1780. In: *Prim. Fl. Holsat.* p. 90
139. Ahti T. *Flora Neotropica Monograph* 78: Cladoniaceae. The New York Botanical Garden Press 2000; Bronx, NY. pp. 1-362.
140. Ahti T, Huovinen K. The composition and contents of aromatic lichen substances in *Cladonia* section *Perviae*. *Annales Botanici Fennici* 1988; 25(4): 371-383.
141. Elix & Lumbsch. 1988. In: *Mycotaxon* Vol.: 33 p. 453.
142. Mattsson JE, Wedin M. Phylogeny of the Parmeliaceae-DNA data versus morfological data. *Lichenologist* 1998; 30(4-5): 463-472
143. Nadyeina O, Lutsak T, Blum O, Grahkov V, Scheidegger C. *Cetraria steppae* Savicz is conspecific with *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. according to morphology, secondary chemistry and ecology. *The Lichenologist* 2013; 45(6): 841-856.
144. Moberg. 1977. In: *Symb. Bot. Upsal.* Vol.: 22 Issue: 1 p. 56
145. Moberg R. The lichen genus *Physcia* in Central and South America. *Nordic Journal of Botany* 2008; 10(3): 319-342.
146. Wirth V. *Die Flechten Baden-Württembergs, Verbreitungsatlas, 1&2*; Eugen Ulmer GmbH&Co: Stuttgart, Germany, 1995.
147. Dobson FS. *Lichens. An illustrated guide to the British and Irish species*, sixth ed. Richmond Publishing Co. London, 2011.
148. Slinkard K, Singleton VL. Total phenolic analyses: automation and comparison with manual method. *Am J Enol Viticult* 1977; 28:49-55.

149. Šeruga M, Novak I, Jakobek L. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry* 2011; 124(3): 1208-1216.
150. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in burkina fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem* 2005; 91(3):571-577.
151. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry* 1999; 269(2): 337-341.
152. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Tech.* 1995; 28(1):25-30.
153. Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 1989; 28: 1057–1060.
154. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction prepared from glucoseamine. *Jpn J Nutr* 1986; 44(6): 307-314.
155. Hsu CK, Chiang BH, Chen YS, Yang JH, Liu CL. Improving the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) sprout with trace element water. *Food Chemistry* 2008; 108(2): 633-641.
156. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 1983; 65(1-2): 55-63.
157. Culberson CF. *Chemical and botanical guide to lichen products* 1969.
158. Ranković B. (Ed.). *Lichen secondary metabolites: bioactive properties and pharmaceutical potential*. Springer 2014.
159. Stanojević Lj, Stanković M, Nikolić Lj, Nikolić V, The influence of the operation conditions and the extraction techniques on the yield, kinetics and the composition of ethanol extracts of *Hieracium pilosella* L, *CI&CEQ* 2007; 13(4): 199-204.
160. Najdenova V, Lisickov K, Đarmati Z. Antimicrobial activity and stability of usnic acid and its derivatives in some cosmetic products, *Olaj, Szapan, Kozmetika* 2001; 50: 158-160

161. Đorđević SM, Ivanović J, Kukić-Marković J, Petrović S, Žižović I, Tadić VM, Marković GM. HPLC determination of usnic acid content in different extracts of *Usnea barbata*. *Planta Medica*, 2010; 76(12): LS1.
162. Alothman M, Bhat R, Karim AA. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia extracted with different solvents. *Food Chemistry* 2009; 115 (3): 785-788.
163. Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li HB. Biological activities of polyphenols from grapes. *International journal of molecular sciences* 2010; 11(2): 622-646.
164. Mohsen SM, Ammar AS. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food chemistry* 2009; 112(3): 595-598.
165. Ghorbanli M, Amirkian TT, Niyakan M. Seasonal changes in antioxidant activity, flavonoid, anthocyanin and phenolic compounds in *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale and *Physcia dubia* (Hoffm.) Lettau from Babol forest sites in north of Iran 2012; 461-469.
166. Perry NB, Benn MH, Brennan NJ, Burgess EJ, Ellis G, Galloway DJ, Tangney RS. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens. *The Lichenologist* 1999; 31(6): 627-636.
167. Reynertson KA, Wallace AM, Adachi S, Gil RR, Yang H, Basile MJ, D'Armiento J, Weinstein IB, Kennelly EJ. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *J. Nat. Prod.* 2006; 69(8): 1228–1230.
168. Kumar KC, Müller K. Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *Journal of natural products*, 1999; 62(6): 821-823.
169. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 1999; 12(4): 564-582.
170. Huneck S, Yoshimura I. Identification of lichen substances. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 1996.
171. Luo H, Yamamoto Y, Kim JA, Jung JS, Koh YJ, Hur JS. Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from *Umbilicaria antarctica* in maritime Antarctica (King George Island). *Polar Biology*, 2009; 32(7): 1033-1040.
172. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* 2009; 26(8): 1001-1043.



173. Halliwell B, Rafter J, Jenner A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *American Journal of Clinical Nutrition* 2005; 81(1): 268S-276S.
174. Matkowski A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants. A review *Biotechnology advances* 2008; 26(6): 548-560
175. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products* 2000; 63(7): 1035-1042.
176. Brown JPA. A review of the genetic affects of naturally occurring flavonoids, anthroquinones and related compounds. *Mutation Research* 1980; 75(3): 243-277.
177. Middleton E, Kandaswami C. Effects of flavonoids and inflammatory functions. *Biochemical Pharmacology* 1992; 43(6): 1167-1179.
178. Pokorná J, Venskutonis PR, Kraujalyte V, Kraujalis P, Dvořák P, Tremlová B, Ošťádalová M. Comparison of different methods of antioxidant activity evaluation of green and roast *C. Arabica* and *C. Robusta* coffee beans. *Acta alimentaria* 2015; 44(3): 454-460.
179. Foti MC, Daquino C, Geraci C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *J Org Chem* 2004; 69(7): 2309-2314
180. Li S, Tan YH, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong W, and Feng YC. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int. J.Mol. Sci.* 2015; 16(11): 26087–26124;
181. Ferreira I, Baptista P, Vilas-Boas M, Barros L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry* 2007; 100(4): 1511-1516.
182. Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food chemistry* 2006; 94(4): 550-557.
183. Greenspan HC, Aruoma OI. Oxidative stress and apoptosis in HIV infection: a role for plant-derived metabolites with synergistic antioxidant activity. *Immunology today* 1994; 15(5): 209-213.
184. Gulluce M, Aslan A, Sokmen M, Sahin F, Adiguzel A, Agar G, Sokmen A. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine* 2006; 13(7):515-521.

185. Abrams G. Neoplasia I. Patients and Populations: Medical Genetics-M1. University of Michigan, US Retrieved, 23, 2012.
186. Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD, Kim TW, Lee YS, Lee SJ. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *International Journal of Oncology* 2001; 19(4): 837-844.
187. Casagrande F, Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin100 dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochemical Pharmacology* 2001; 61(10):1205-1215.
188. Ji BC, Hsu WH, Yang JS, Hsia TC, Lu CC, Chiang JH, Yang JL, Lin CH, Lin JJ, Wu Suen LJ, Wood WG, Chung JG. Gallic acid induces apoptosis via caspase-3 and mitochondrion dependent pathways *in vitro* and suppresses lung xenograft tumor growth *in vivo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009; 57(16): 7596-7604.
189. Itharat A, Houghton P, Eno-Amooguaye E, Burke P, Sampson J, Raman A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plant used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethopharmacology* 2004; 90(1): 33-38.
190. Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D. (2005). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of nutritional biochemistry* 2005; 16(6): 360-367.
191. Bogo D, Matos MFC, Honda NK. In vitro antitumor activity of orsellinates. *Z Naturforsch* 2010; 65:43-48.
192. Millot M, Delebassée S, Liagre B, Vignaud L, Sol V, Mambu L. Screening of lichen extracts on HT-29 human colon-cancer cells. *Planta Med* 2014; 80(16) - P1N5.

## 8. Биографија

Јовица Томовић је рођен 20.01.1987. године у Пећи. Интегрисане академске студије фармације на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу уписао је 2005/2006. године, а дипломирао 22.03.2010. године са просечном оценом 8,43. Докторске академске студије је уписао школске 2011/12. године на Факултету медицинских наука у Крагујевцу – изборно подручје: Клиничка и експериментална фармакологија, на којима је положио све планом и програмом предвиђене испите као и усмени докторски испит 19.06.2015. године. Завршио је приправнички стаж и положио стручни испит за здравствене раднике ВСС- Министарство здравља Републике.

Од 2011. године радио ЗУ Апотека „Нана+“ као одговорни фармацеут. Био је запослен у Средњој медицинској школи са домом ученика „Сестре Нинковић“ као професор на предметима Медицинска биохемија и Фармацеутска хемија у периоду од 2011-2014. Од 22.05.2014. године је запослен као сарадник у настави за ужу научну област Фармацеутска анализа Факултета медицинских наука у Крагујевцу. У звање асистента за ужу научну област Фармацеутска анализа биран је 2016. године. Учествује у извођењу наставе на интегрисаним академским студијама фармације. Активно се бави научноистраживачким радом везаним за изучавање хемијског састава и биолошких активности различитих биљака и лишајева.

Пријавио је тему за израду докторске дисертације под насловом “Испитивање антиоксидативне и антитуморске активности екстраката три одабране врсте лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*” на коју је Веће за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу дало сагласност (одлука IV-03-268/17) 13.04.2016. године на извештај комисије о оцени научне заснованости теме и именovalo ментора докторске дисертације, проф. др Недељка Манојловића.

Јовица Томовић је аутор или коаутор пет научних радова објављених у целости у домаћим и међународним часописима на SCI листи као и рада саопштеног на конференцији са међународним учешћем.

Ожењен је и има двоје деце.

## 9. Библиографија

Списак радова:

1. **Tomović J**, Kosanić M, Ristić S, Ranković B, Stanojković T, Manojlović, N. Chemical composition and bioactive properties of the lichen, *Pleurosticta acetabulum*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2017; 16(12): 2977-2984. **(M23)**
2. Boskovic M, Djokovic J, Grubor I, Guzvic V, Jakovljevic B, Jurisevic M, Ljubisic D, Mijajlovic M, Milicevic I, Milovanovic M, Nikolic L, Nikolic M, Peric S, Petrovic A, Petrovic J, Radonjic K, Simonovic L, Simovic M, Stojanovic S, Stojic I, **Tomovic J**, Vranic S, Vucicevic K, Zdravkovic A, Jankovic S., PhD students' awareness of research misconduct. *J. Empir. Res. Hum. Res. Ethics*. 2013; 8(2): 163-164. **(M21)**
3. Bursać-Mitrović M, Milovanović DR, Mitić R, Jovanović D, Sovrlić M, Vasiljević P, **Tomović J**, Manojlović N, 2016. Effects of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol on biochemical parameters of swimming-induced oxidative stress in serum of guinea pigs. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 13(4): 29-33. **(M23)**
4. **Tomović J**, Rančić A, Vasiljević P, Mašković P, Živanović S, Manojlović N, Sovrlić M. Antioxidant activity of lichen *Cetraria Aculeata*. *Praxis Medica* 2015; 44(1): 107-113. **(M52)**
5. Rančić A, **Tomović J**, Vasiljević P, Aleksić M, Jušković M, Najman S, Manojlović N. Effects of the Toluene and Methanol Extract of *Senna (Cassia angustifolia Vahl)* on viability and proliferation HeLa cells. *Praxis Medica* 2015; 44(4): 1-4. **(M52)**
6. Manojlović N, Ranković B, Kosanić M, Vasiljević P, Rančić S, Mašković P, **Tomović J**, Sovrlic M. HPLC analiza i antimikrobna aktivnost biološki aktivnih jedinjenja izolovanih iz lišaja *Hypogymnia physodes*. XXI savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem. Čačak, 2016. Zbornik radova: Vol 21. (24) 2016 pp. 717-724. **(M63)**

## **10. Прилози**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

<b>Редни број:</b> РБ	
<b>Идентификациони број:</b> ИБР	
<b>Тип документације:</b> ТД	Монографска публикација
<b>Тип записа:</b> ТЗ	Текстуални штампани материјал
<b>Врста рада:</b> ВР	Докторска дисертација
<b>Аутор:</b> АУ	Јовица М. Томовић
<b>Ментор/коментор:</b> МН	др Недељко Т. Манојловић, редовни професор
<b>Наслов рада:</b> НР	Испитивање антиоксидативне и антитуморске активности екстраката три одабране врсте лишајева <i>Cladonia subulata</i> , <i>Pleurosticta acetabulum</i> и <i>Physcia</i> <i>semipinnat</i>
<b>Језик публикације:</b> ЈП	Српски (ћирилица)
<b>Језик извода:</b> ЈИ	Српски/Енглески
<b>Земља публикавања:</b> ЗП	Република Србија

<b>Уже географско подручје: УГП</b>	Шумадија
<b>Година: ГО</b>	2019.
<b>Издавач: ИЗ</b>	Ауторски репринт
<b>Место и адреса: МС</b>	Светозара Марковића 69, 34000 Крагујевац, Република Србија
<b>Физичи опис рада: ФО</b>	Дисертација садржи 10 поглавља, 150 страна, 30 слика, 25 графика 27 табела и 192 референце
<b>Научна област: УДК</b>	Медицина
<b>Научна дисциплина: ДИ</b>	Фармација
<b>Предметна одредница/ кључне речи: ПО</b>	лишајеви, <i>Cladonia subulata</i> , <i>Pleurosticta acetabulum</i> , <i>Physcia</i> <i>semipinnata</i> , фитохемијска анализа, антиоксидативна активност, антитуморска активност;
<b>УДК</b>	
<b>Чува се: ЧУ</b>	Библиотека Факултета медицинских наука у Крагујевцу, Светозара Марковића 69, 34000 Крагујевац, Република Србија
<b>Важна напомена: ВН</b>	Нема

**Извод:****ИД**

Циљ ове докторске дисертације је испитивање хемијског састава, антиоксидативне и антитуморске активности екстракта три врсте лишјајева: *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*. Испитивање хемијског састава ацетонских и метанолских екстракта обухватао је HPLC-UV анализу екстракта као и одређивање укупног садржаја фенола и флавоноида у екстрактима. Испитивани екстракти су показали висок садржај укупних фенола ( $21,31 \pm 1,19$  до  $73,45 \pm 0,82$  mg GA/g) и флавоноида ( $8,48 \pm 0,57$  до  $19,27 \pm 0,37$  mg RU/g). Испитивање екстракта лишјајева HPLC-UV анализом потврђено је присуство две групе секундарних метаболита депсидона и депсида: хипопротоцетраринска киселина, фумаропротоцетраринска киселина, салазинска киселина, норстихнинска киселина, протоцетраринска киселина, евернијска киселина, атранорин, леканорна киселина и обтусинска киселина. Испитивање биолошке активности екстракта обухватало је евалуацију антиоксидативне и антитуморске активности. Антиоксидативна активност је утврђена праћењем укупног антиоксидативног капацитета, способности неутрализације DPPH радикала, способности неутралисања хидроксил радикала, редукционог потенцијала и инхибиције липидне пероксидације. Резултати испитивања *in vitro* антиоксидативне активности показују да екстракти испитиваних врста лишјајева поседују значајан антиоксидативни потенцијал. Антитуморска активност екстракта лишјајева процењена је коришћењем МТТ теста испитивањем вијабилности и пролиферације на ћелијама Hela S3 (аденокарцином цервикса) и LS174 (ћелије карцинома дебелог црева). Испитивани екстракти показали су антитуморску активност у различитим концетрацијама ( $IC_{50} = 13,55$  до  $>200$   $\mu\text{g/ml}$ ), у зависности од екстракта и испитиване ћелијске линије. На основу добијених резултата, може се препоставити да врсте лишјајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata* у будућности могу наћи своју потенцијалну примену у медицини, фармацеутској, прехранбеној и козметичкој индустрији, као и у развоју нових фитопрепарата.

**Датум прихватања теме од стране ННВ:** 06.04.2016.

**ДП**

**Датум одбране:**

**ДО**



**Чланови комисије:  
КО**

1. **Проф. др Драган Миловановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, председник;
2. **Проф. др Перица Васиљевић**, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Експериментална биологија и биотехнологија, члан;
3. **Проф. др Марија Миловановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан;

KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICINAL SCIENCES KRAGUJEVAC

**Accession number:**

ANO

**Identification number:**

INO

**Documentation type:**

DT

Monographic publication

**Type of record:**

TR

Textual printed material

**Contents code:**

CC

Ph.D.Thesis

**Author:**

AU

Jovica M. Tomović

**Menthor/co-mentor**

MN

Full Professor Nedeljko T.  
Manojlović, D.Sc., Faculty of  
Medicinal Sciences, University of  
Kragujevac

**Title:**

Examination of the antioxidant and  
antitumor activity of the extracts of  
three selected lichen species  
Cladonia subulata, Pleurosticta  
acetabulum and Physcia semipinnata  
and Physcia semipinnata

**Language of text:**

LT

Serbian (Cyrillic)

**Language of abstract:**

LA

Serbian/English

**Country of publication:**

CP

Republic of Serbia

<b>Locality of publication:</b> LP	Šumadija
<b>Publication year:</b> PY	2019.
<b>Publisher:</b> PU	Reprint by author
<b>Publication place:</b> PP	Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia
<b>Physical description</b> PD	Thesis contains 10 chapters, 150 pages, 30 pictures, 25 graphics, 27 tables and 192 references
<b>Scientific field:</b> SF	Medicine
<b>Scientific discipline:</b> SD	Pharmacy
<b>Subject/key words:</b> SKW	Lichens, <i>Cladonia subulata</i> , <i>Pleurosticta acetbulum</i> , <i>Phycia</i> <i>semipinnata</i> , phytochemistry, antioxidant activity, antitumor activity;
<b>UDC</b>	
<b>Holding data:</b> HD	Library of Faculty of Medical Sciences Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia
<b>Note:</b> N	None

**Abstract:****AB**

The aim of this doctoral thesis is to investigate the chemical composition, antioxidant and antitumor activity of the extracts of three lichen species: *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* and *Physcia semipinnata*. Examination of the chemical composition of acetone and methanol extracts included the HPLC-UV analysis of the extracts as well as the determination of the total content of phenol and flavonoids in the extracts. The examined extracts showed a high content of total phenols ( $21.31 \pm 1.19$  to  $73.45 \pm 0.82$  mg GA/g) and flavonoids ( $8.48 \pm 0.57$  to  $19.27 \pm 0.37$  mg RU/g). Examination of extracts of lichens by HPLC-UV analysis confirmed the presence of two groups of secondary metabolites of depsidone and depside: hypoprotocetraric acid, fumaroprotocetraric acid, salazinic acid, norstictic acid, protocetraric acid, evernic acid, atranorine, lecanoric acid and obtusic acid. The study of the biological activity of extracts involved the evaluation of antioxidant and antitumor activity. The antioxidant activity was determined by monitoring the total antioxidant capacity, the ability to neutralize DPPH radicals, the ability to neutralize hydroxyl radicals, reducing potential, and inhibiting lipid peroxidation. The results of an in vitro antioxidative activity test show that the extracts of the tested lichen species have a significant antioxidant potential. Antitumor activity of lichen extracts was assessed using the MTT test by testing viability and proliferation of Hela S3 cells (cervix adenocarcinoma) and LS174 (colon cancer cells). The investigated extracts showed antitumor activity in different concentrations ( $IC_{50} = 13.55$  to  $> 200$   $\mu\text{g} / \text{ml}$ ), depending on the extract and the cell line examined. On the basis of the obtained results, it can be assumed that the species of lichens of *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* and *Physcia semipinnata* can find their potential application in the medical, pharmaceutical, food and cosmetic industries, as well as in the development of new phytopharmaceuticals, in the future.

**Accepted by the Scientific Board on:** 06.04.2016.

**ASB**

**Defended on:**

**DE**

**Thesis defended board**

**(Degree/name/surname/title/faculty)**

**DB**

1. **Full Professor, Dragan Milovanović**, M.D., Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, **chairman**;
2. **Assoc. Professor Perica Vasiljević**, D.Sc., Faculty of Science, University of Niš, **member**;
3. **Assoc. Professor Marija Milovanović**, M.D., Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, **member**;

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Јовица Томовић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Испитивање антиоксидативне и антитуморске активности екстраката три одабране врсте лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 27.12.2018. године,

  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Јовица Томовић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Испитивање антиоксидативне и антитуморске активности екстраката три одабране врсте лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- ⑥ Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 27.12.2018. године,

  
\_\_\_\_\_

потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>



## Original Research Article

# Chemical composition and bioactive properties of the lichen, *Pleurosticta acetabulum*

Jovica Tomović<sup>1</sup>, Marijana Kosanić<sup>2</sup>, Svetlana Ristić<sup>2</sup>, Branislav Ranković<sup>2</sup>, Tatjana Stanojković<sup>3</sup>, Nedeljko Manojlović<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, <sup>2</sup>University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology, 34000 Kragujevac, <sup>3</sup>Institute of Oncology and Radiology of Serbia, 11000 Belgrade, Serbia

\*For correspondence: **Email:** [mtnedeljko@gmail.com](mailto:mtnedeljko@gmail.com); **Tel:** +381-691137150; **Fax:** +381-34306800

Sent for review: 18 August 2017

Revised accepted: 22 November 2017

### Abstract

**Purpose:** To investigate the chemical composition and bioactivity of the acetone extract of *Pleurosticta acetabulum* lichen.

**Methods:** Phytochemical analysis of the acetone extract of the lichen (*Pleurosticta acetabulum*) was carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant activity of the lichen extract was evaluated by determining the radical scavenging capacity on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals and reducing power. To determine total phenolics and flavonoids, we used spectrophotometric methods. Antimicrobial activity was estimated by determination of the minimal inhibitory concentration using broth microdilution method. Anticancer activity of the lichen extract was tested using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).

**Results:** Salazinic, norstictic, protocetraric, evernic acid and atranorin were identified as compounds of lichen. *P. acetabulum* extract exhibited moderate free radical scavenging activity (half-maximum inhibitory concentration,  $IC_{50}$  of 151.7301  $\mu\text{g/mL}$ ). The spectrophotometric absorbance of the extract for reducing power varied from 0.035 to 0.127, while the total phenolics and flavonoids in the extract were 35.39  $\mu\text{g PE/mg}$  and 12.74  $\mu\text{g RE/mg}$ , respectively. Minimum inhibitory concentration (MIC) was in the range of 1.25 to 20  $\text{mg/mL}$  while cytotoxic activity (based on  $IC_{50}$  values) ranged from 24.09 to 45.94  $\mu\text{g/mL}$ .

**Conclusion:** The results confirm that lichen extract contains secondary metabolites that possess antioxidant, antimicrobial and anticancer activities, which opens up some possibilities for the extract to be developed as food supplements and pharmaceutical raw materials.

**Keywords:** *Pleurosticta acetabulum*, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Cytotoxic activity, Lichen

This is an Open Access article that uses a funding model which does not charge readers or their institutions for access and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) and the Budapest Open Access Initiative (<http://www.budapestopenaccessinitiative.org/read>), which permit unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited.

Tropical Journal of Pharmaceutical Research is indexed by Science Citation Index (SciSearch), Scopus, International Pharmaceutical Abstract, Chemical Abstracts, Embase, Index Copernicus, EBSCO, African Index Medicus, JournalSeek, Journal Citation Reports/Science Edition, Directory of Open Access Journals (DOAJ), African Journal Online, Bioline International, Open-J-Gate and Pharmacy Abstracts

## INTRODUCTION

A great diversity of living organisms can be used for the improvement of human health, such as biologically active components extracted from the

plants, mushrooms and lichens [1-3]. In searching for new therapeutic alternatives, many different lichen species were investigated, due to significant antiviral, antimicrobial, anticancer, antihyperglycemic, cardioprotective, antiparasitic,

anti-inflammatory and antibiotic effects that they have exhibited so far [3-5].

Many lichen species exert interesting biological and pharmacological activities. However, in the literature, only a few studies have investigated the potential of *Pleurosticta acetabulum* lichen.

Thus, the aim of this study is to present the results of the phytochemical analysis of the acetone extract of *P. acetabulum* lichen and its antioxidant, antimicrobial and anticancer activities in order to search for available natural antioxidant, antibiotic and anticancer agents that can be used as possible food supplements, raw materials for the pharmaceutical industry and remedies for the treatment of various diseases.

## EXPERIMENTAL

### Collection and identification of lichen sample

The samples of lichen *P. acetabulum* (Neck.) Elix & Lumbsch were collected from the mountain Kopaonik, Serbia, during May 2013. Identification was done using the relevant key and monographs by Ranković<sup>2</sup> [6,7]. The samples of collected species of lichen have been herbarium-stored at the Department of Biology and Ecology of Kragujevac, Faculty of Science, (voucher no. 109) for future reference.

### Preparation of lichen extract

The samples of Lichen *Parmelia acetabulum* (100 g) were extracted with a Soxhlet extractor using acetone. The extract was filtered and then concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator. The dried extract was dissolved in DMSO (5 % dimethyl sulphoxide) for further experiments.

### High-performance liquid chromatography (HPLC)

The dry lichen extract was dissolved in 500 µL of acetone and carried out on a 1200 Series HPLC (Agilent Technologies) instrument with C18 column (C18; 25 cm 4.6 mm, 10 µm). A UV spectrophotometric detector was used with methanol-water-formic acid (70:30:0.8, v/v/v) as a solvent. The detection wavelength was 254 nm and the injection volume was 5 µL, with a flow rate of 1 ml/min. Deionized water was purified using a Milli-Q academic water purification system (Milford, MA, USA). Formic acid was used as an analytical-grade reagent. HPLC-grade methanol was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). These lichen substances are not available commercially.

Secondary metabolites were isolated manually from the lichen species using thin-layer chromatography (TLC) and column chromatography. The purity of the isolated metabolites was checked by HPLC. The standards used were obtained from the following sources: salazinic acid ( $t_R = 1.56 \pm 0.20$  min) isolated from the lichen *Lobaria pulmonaria*, norstictic acid ( $t_R = 2.70 \pm 0.10$  min) from the lichen *Ramalina farinacea* and protocetraric acid ( $t_R = 3.24 \pm 0.20$  min) from the lichen *Toninia candida*. Evernic acid ( $t_R = 5.08 \pm 0.10$  min) and atranorin ( $t_R = 14.88 \pm 0.10$  min) were isolated from the lichen *Evernia prunastri*.

### Determination of antioxidant activity

#### Scavenging DPPH radicals

DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) radical was used to evaluate the free radical scavenging activity of the lichen extract [8]. Two millilitres of 0.05 mg/mL methanol solution of DPPH radical and 1 mL of the lichen extract (1 mg/mL) were placed in cuvettes. The mixture was stored at room temperature for 30 min. Then, the absorbance was measured at 517 nm in a spectrophotometer (Jenway, UK). Ascorbic acid was used as a positive control. DPPH radical scavenging activity (D) was calculated using Eq 1.

$$D (\%) = \{(A_0 - A_1)/A_0\}100 \dots\dots\dots (1)$$

where  $A_0$  is the absorbance of the negative control (DPPH solution) and  $A_1$  is the absorbance of the reaction mixture or standard. All the measurements were repeated three times. The inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was the parameter used to compare the radical scavenging activity.

#### Reducing power

The reducing power of the extract was determined according to the method of Oyaizu [9]. One milliliter of extract (1 mg/mL) was mixed with 2.5 mL of phosphate buffer (2.5 mL, 0.2 M, pH 6.6) and potassium ferricyanide (2.5 mL, 1 %). The mixtures were incubated at 50 °C for 20 min. Trichloroacetic acid (10 %, 2.5 mL) was added to the mixture and centrifuged. The upper layer was mixed with distilled water (2.5 mL) and ferric chloride (0.5 mL, 0.1 %). The absorbance of the solution was measured at 700 nm in a spectrophotometer (Jenway UK). Ascorbic acid was used as a positive control. The greater the absorbance of the reaction mixture the higher the reducing power of the samples.

### Determination of total phenolic compounds

Total soluble phenolic compounds in the lichen extract were determined with Folin-Ciocalteu method [10], using pyrocatechol as a standard phenolic compound. One millilitre of the lichen extract (1 mg/mL) was diluted with distilled water (46 mL), and the content was mixed in a volumetric flask after adding one millilitre of Folin-Ciocalteu reagent. After 3 min, 3 mL of 2 % sodium carbonate was added and left for 2 h with intermittent shaking. The reaction mixture absorbance was measured at 760 nm in a spectrophotometer (Jenway UK). The total concentration of phenolic compounds in the extract was expressed as microgram of pyrocatechol equivalent (PE) per milligram of dried extract. The total phenolics content was determined as the pyrocatechol equivalent using an equation obtained from a standard pyrocatechol graph ( $y = 0.0057 \times \text{total phenols} \{\mu\text{g PE/mg of dry extracts}\} - 0.1646$ ,  $R^2=0.9934$ ).

### Evaluation of total flavonoid content

The total flavonoids content in the lichen extract was determined with the spectrophotometric method using aluminium trichloride based on flavonoid-aluminium complex formation [11]. Two millilitres of 2 % aluminium trichloride in methanol was mixed with the same volume of the extract solution (1 mg/mL). The mixture was incubated at room temperature for 10 min, and the absorbance was measured at 415 nm in a spectrophotometer (Jenway UK) against a reagent blank (consisting of all the reagents except the extract or rutin standard solution being substituted with methanol). The total flavonoid content was determined as microgram of rutin equivalent (RE) per milligram of dried extract. The total amount of flavonoid compounds was determined as the rutin equivalent using an equation obtained from a standard rutin graph ( $y = 0.0296 \times \text{total flavonoid} [\mu\text{gRE/mg of dry extracts}] + 0.0204$ ,  $R^2=0.9992$ ).

### Assessment of antimicrobial activity

Antimicrobial activity of the tested sample was evaluated against 15 microorganisms, including five strains of bacteria: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *B. subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus mirabilis* (ATCC 12453) and 10 species of fungi: *Aspergillus flavus* (ATCC 9170), *A. niger* (ATCC 16888), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Mucor mucedo* (ATCC 20094), *Trichoderma viride* (ATCC 13233), *Cladosporium cladosporioides* (ATCC 11275), *Fusarium oxysporum* (ATCC 62506), *Alternaria alternata*

(ATCC 11680), *Penicillium expansum* (ATCC 20466), *P. chrysogenum* (ATCC 10106) obtained from the American Type Culture Collection (ATCC).

The bacterial isolates were isolated from overnight cultures using Müller-Hinton agar and the suspensions were prepared in sterile distilled water by adjusting the turbidity to match that of a 0.5 McFarland standard (approximately  $10^8$  CFU/mL). Fungal suspensions were prepared from 3-7-day-old cultures that grew on a potato dextrose agar, except for *C. albicans* which was maintained on Sabourad dextrose (SD) agar. Sterile distilled water was used to rinse the spores, the turbidity was measured spectrophotometrically at 530 nm, and then further diluted to a concentration of approximately  $10^6$  CFU/mL according to NCCLS recommendations [12].

In order to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the active extract, the 96-well micro-titre assay using resazurin as the indicator of cell growth was employed [13]. The starting solutions of the tested extract were obtained by dissolving it in 5 % dimethyl-sulphoxide. Serial twofold dilutions of the extract were made within a concentration range from 0.04 to 40 mg/mL in sterile 96-well plates containing Mueller-Hinton broth for bacterial cultures and Sabourad Dextrose SD broth for fungal cultures. Resazurin solution was added as an indicator to each well. The MIC was determined visually and defined as the lowest concentration of the tested extract that prevented resazurin colour change from blue to pink. Streptomycin and ketoconazole were used as positive controls, while 5 % DMSO was used as a negative control.

### Determination of cytotoxic activity

Human epithelial carcinoma Hela cells, human lung carcinoma A549 cells and human colon carcinoma LS174 cells were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). All cancer cell lines were cultured as monolayers in the RPMI 1640 nutrient medium with 10 % Fetal Bovine Serum (inactivated at 56 °C), 3 mM of L-glutamine, and antibiotics, at 37 °C in a humidified air atmosphere with 5 % CO<sub>2</sub>. *In vitro* assay for cytotoxic activity of the investigated sample was performed when the cells reached 70 – 80 % confluence. A stock solution of the extract was dissolved in the corresponding medium to the required working concentrations. Neoplastic Hela, A549 and LS174 cells (5000 cells line per well) were seeded into 96-well microtiter plates, and 24 h

later, after cell adherence, five different double-diluted concentrations of the extract were added to the wells. The final concentrations of the extract were 12.5, 25, 50, 100, and 200  $\mu\text{g/mL}$ , except for the control wells where only the nutrient medium was added. The cultures were incubated for the next 72 h.

The cancer cell-survival effect was determined 72 h after adding the extract, using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay [14]. To each well was added 20  $\mu\text{L}$  of MTT solution (5 mg/mL PBS) and they were further incubated in humidified air containing 5 %  $\text{CO}_2$  at 37  $^\circ\text{C}$  for 4 hours. Subsequently, 100  $\mu\text{L}$  of 10 g/L SDS was added to solubilise the MTT formazan crystals converted by mitochondrial dehydrogenases in viable cells. The absorbance proportional to the number of viable cells was measured at 570 nm using a microplate reader (Multiskan EX, Thermo Scientific, Finland). Each experiment was performed in triplicate and independently repeated at least four times. Cis-dichlorodiammineplatinum (cis-DDP) was used as a positive control.

### Statistical analysis

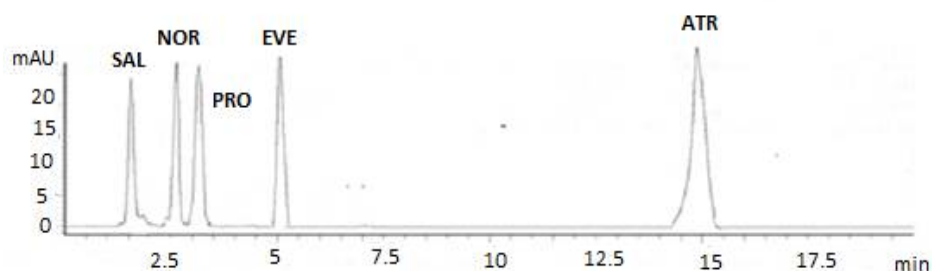
All data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (mean  $\pm$  SD) of three parallel measurements. Statistical analyses were performed using Microsoft Excel and SPSS software (version 18) package. Student's *t*-test was used to determine statistically significant differences which were considered significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

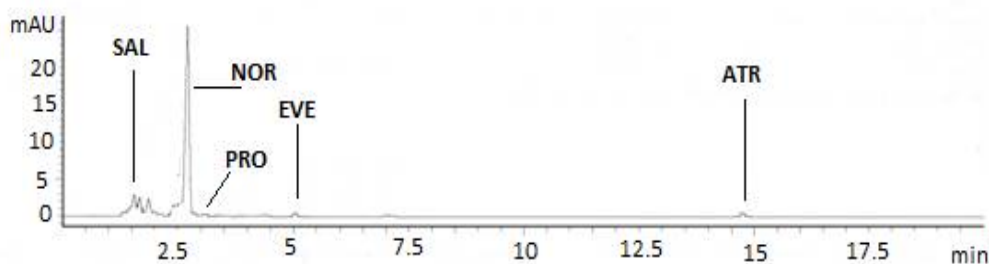
Secondary metabolites in the lichen *P. acetabulum* were identified using HPLC. The chromatograms for standards (salazinic, norstictic, protocetraric, evernic acid and atranorin) and lichen acetone extract eluted by HPLC are represented in Figure 1 and Figure 2.

Identification of these compounds was achieved by comparison of their retention times ( $t_R$ ) and UV spectra (200 - 400 nm) from HPLC-UV with the standard substances previously isolated from lichens in our laboratory. The dominant peak in the chromatogram ( $t_R = 2.70 \pm 0.10$  min) originates from depsidone compound, norstictic acid (bryopogonic acid, 1,3-Dihydro-1,4,10-trihydroxy-5,8-dimethyl-3,7-dioxo-7H-isobenzofuro(4,5-b)(1,4)benzodioxepin-11-carboxaldehy-de). The UV spectrum of norstictic acid has 3 absorption maxima (212, 239 and 320 nm). Besides norstictic acid, the tested extract of *P. acetabulum* contains salazinic acid ( $t_R = 1.56 \pm 0.20$  min), protocetraric acid ( $t_R = 3.24 \pm 0.20$  min), evernic acid ( $t_R = 5.08 \pm 0.10$  min) and atranorin ( $t_R = 14.88 \pm 0.10$  min) in different amounts.

Protocetraric, evernic acid and atranorin have very small peaks and present satellite substances in the chromatogram. The UV spectra of salazinic (212, 238 and 310 nm) and protocetraric (212, 242 and 320 nm) are very similar to those of norstictic acid. Norstictic,



**Figure 1:** HPLC chromatogram for lichen standards at 254 nm. Peaks: SAL= salazinic acid; NOR= norstictic acid; PRO= protocetraric acid; EVE= evernic acid; ATR= atranorin



**Figure 2:** Chromatogram of the acetone extract of *Pleurosticta acetabulum* at 254 nm

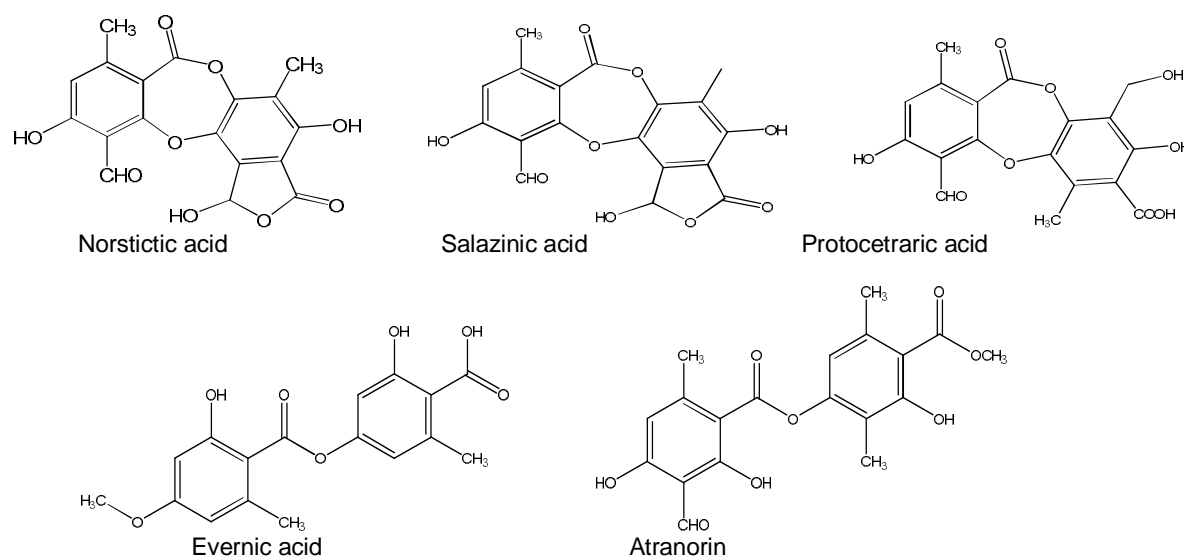
salazinic and protocetraric acid are categorized into  $\beta$ -orcinoldepsidones. Absorbance maxima at 213, 270 and 305 nm are characteristic for evernic acid and at 212, 278 and 312 nm for atranorin. Salazinic and protocetraric acid belong to depsidones while atranorin and evernic acid belong to depsides. The retention times and UV absorbance maxima of the standards are shown in Table 1.

**Table 1:** Retention times of the lichen compounds and their absorbance maxima (nm)

Compound	Retention time ( $t_R \pm SD$ ) (min)	Absorbance maxima (nm) UV spectrum
Salazinic acid	1.56 $\pm$ 0.20	212, 238, 310
Norstictic acid	2.70 $\pm$ 0.10	212, 239, 320
Protocetraric acid	3.24 $\pm$ 0.20	212, 242, 320
Evernic acid	5.08 $\pm$ 0.10	213, 270, 305
Atranorin	14.88 $\pm$ 0.10	212, 278, 312 <sup>m</sup>

\*Values are mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ );  $m =$  minor absorbance maximum

The structures of the detected compounds are shown in Figure 3. The antioxidant activity (scavenging DPPH radicals and reducing power) of the acetone extract is presented in Table 2.



**Figure 3:** Chemical structures of the isolated compounds

**Table 2:** DPPH radical scavenging and reducing power of the acetone extracts of *Pleurosticta acetabulum*

Antioxidant test	DPPH radical scavenging IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	Reducing power Absorbance (700 nm)			
		1000 $\mu$ g/mL	500 $\mu$ g/mL	250 $\mu$ g/mL	125 $\mu$ g/mL
<i>Pleurosticta acetabulum</i>	151.01 $\pm$ 1.91	0.127 $\pm$ 0.011	0.055 $\pm$ 0.005	0.046 $\pm$ 0.005	0.035 $\pm$ 0.001
Ascorbic acid	6.42 $\pm$ 0.18	2.113 $\pm$ 0.032	1.654 $\pm$ 0.021	0.0957 $\pm$ 0.008	0.0478 $\pm$ 0.004

Values are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ )

The IC<sub>50</sub> value of the lichen extract was 151.01  $\mu$ g/mL for DPPH radicals. As shown in Table 2, reducing power was concentration dependent. The values of absorbance for reducing power varied from 0.035 to 0.127. In various antioxidant activities, there was a statistically significant difference between the extract and the control ( $p < 0.05$ ).

The amounts of total phenolics and flavonoids in the extract were 35.39  $\mu$ g PE/mg and 12.74  $\mu$ g RE/mg, respectively.

The antimicrobial activity of the lichen extract against the test microorganisms is shown in Table 3.

The MIC for the acetone extract of *P. acetabulum* fluctuated in a range of 1.25 – 20 mg/mL for bacteria and 5 – 20 mg/mL for fungi. The extract did not show inhibitory activity against *E. coli* and *A. flavus*, which have been shown to be the most resistant bacteria, and fungi. The antimicrobial activity was compared with the streptomycin and ketoconazole which were more active than the tested lichen. In a negative control, DMSO had no inhibitory effect on the tested organisms.

The data obtained for the anticancer effect of *P. acetabulum* extract are shown in Table 4.

**Table 3:** Minimum inhibitory concentration (MIC) of the acetone extracts of *Pleurosticta acetabulum*

Microorganism	<i>Pleurosticta acetabulum</i>	Streptomycin	Ketoconazole
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	0.031	/
<i>Bacillus subtilis</i>	5	0.016	/
<i>Bacillus cereus</i>	1.25	0.016	/
<i>Escherichia coli</i>	/	0.062	/
<i>Proteus mirabilis</i>	10	0.062	/
<i>Mucor mucedo</i>	10	/	0.156
<i>Trichoderma viride</i>	10	/	0.078
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	5	/	0.039
<i>Fusarium oxysporum</i>	5	/	0.078
<i>Alternaria alternata</i>	10	/	0.078
<i>Aspergillus flavus</i>	/	/	0.312
<i>Aspergillus niger</i>	20	/	0.078
<i>Candida albicans</i>	5	/	0.039
<i>Penicillium expansum</i>	20	/	0.156
<i>Penicillium chrysogenum</i>	10	/	0.078

Values given as mg/mL; Antibiotics: S – streptomycin, K – ketoconazole. Slash (/)-No activity

**Table 4:** Growth inhibitory activity of acetone extracts of *Pleurosticta acetabulum* on HeLa, A549 and LS174 cell lines

Sample	IC <sub>50</sub> (µg/mL)		
	HeLa	A549	LS174
<i>Pleurosticta acetabulum</i>	26.95±1.54	24.09±0.36	45.94±1.28
cis-DDP	0.83±0.19	3.56±0.23	2.58±0.16

IC<sub>50</sub> values are expressed as mean ± SD determined from the results of MTT assay in three independent experiments

The IC<sub>50</sub> values of the lichen extract against HeLa, A549 and LS174 cell lines were 26.95, 24.09 and 45.94 µg/mL, respectively.

## DISCUSSION

The identification of secondary metabolites in the acetone extract of *P. acetabulum* and its antioxidant, antimicrobial and anticancer potentials were presented in this study.

By analyzing the composition of lichen *P. acetabulum* the presence of five secondary metabolites has been confirmed. Protocetraric and evernic acid were identified from the lichen *P. acetabulum* for the first time during this study research.

Norstictic acid as major lichen substance in the tested extract is a widespread secondary metabolite produced by lichen-forming fungi [15]. The identified metabolites could be used in the taxonomic classification of lichen species and as sources of commercial products.

In this study, the lichen extract showed relatively powerful levels of antioxidant activity. Some metabolites of lichens, including depsides, depsidones and dibenzofurans, contain phenolic groups considered to have an important role in antioxidative efficiency. The lichen used for the investigation contains secondary metabolites that

have been shown to exhibit powerful antioxidant activity. Free radical scavenging and antioxidant activities of atranorin were evaluated using various *in vitro* assays for scavenging activity against hydroxyl radicals, hydrogen peroxide, superoxide radicals and nitric oxide.

Kosanic *et al* and Melo *et al* found that atranorin exerts differential effects towards reactive species production, enhancing hydrogen peroxide and nitric oxide production and acting as a superoxide scavenger, and then the activity towards hydroxyl radical production scavenging was observed [16,17].

Also, total reactive antioxidant potential and total antioxidant reactivity analysis indicate that atranorin acts as a general antioxidant, although it appeared to enhance peroxy radical-induced lipoperoxidation *in vitro* [16]. Similarly, strong antioxidant activities were found for salazinic, protocetraric, evernic and norstictic acids [4,5,17].

In the literature sources that we examined, no data were found about the antimicrobial activity of *P. acetabulum* extracts. However, a relatively strong antimicrobial effect against numerous bacteria and fungi was found in the extract of the lichen *Parmelia acetabulum* where secondary metabolites were identified. Manojlović *et al* [5] reported about the antimicrobial activity of

salazinic and protocetraric acids. Also, strong antimicrobial activity was found for atranorin [18,19].

The strong antimicrobial activities of evernic and norstictic acids have previously been reported [4,17]. They observed that they both exerted antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, but Gram-negative bacteria were more resilient. This resistance is likely due to the fact that Gram-negative bacteria have a wall associated with an outer complex membrane, which slows down the passage of hydrophobic compounds. Lacking outer membrane, Gram-positive bacteria are more susceptible to antibiotic agents [17].

Compared to bacteria, fungi are more resistant due to the more complex structure of the cell wall [3]. Similar to this research, the acetone extract of the lichen *P. acetabulum* and its major compound norstictic acid were previously tested for anti-proliferative activity towards HT29 cells [20]. The results showed that acetone extracts of *P. acetabulum* had the strongest anticancer activity with an IC<sub>50</sub> value of 6 µg/mL after 48h treatment. Also, other constituents of *P. acetabulum* (evernic, salazinic, protocetraric acids and atranorin) have been shown as promising anticancer agents [5,17,21].

## CONCLUSION

The foliose lichen, *Pleurosticta acetabulum*, is a source of versatile bioactive compounds, which provide tremendous opportunities for the production of new antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. Lichen is also a potentially suitable source of raw material for food and pharmaceutical industries due to their activities.

However, further studies to elucidate its mechanism of actions are necessary to establish the potential biological properties of lichen extract and its compounds.

## DECLARATIONS

### Acknowledgement

This work was partly financially supported by the Ministry of Science, Technology, and Development of the Republic of Serbia and was carried out within the Framework of the Projects (nos. 173032, 175011 and 172015).

### Conflict of interest

No conflict of interest is associated with this

work.

## Contribution of authors

The authors declare that this work was done by the authors named in this article and all liabilities pertaining to claims relating to the content of this article will be borne by them.

## REFERENCES

1. Morsy N. *Phytochemical analysis of biologically active constituents of medicinal plants. Main Group Chem* 2014; 13(1): 7-21.
2. Wasser SP. *Medicinal Mushroom Science: Current Perspectives, Advances, Evidences and Challenges. Biomed J* 2014; 37(6): 345-356.
3. Ristić S, Ranković B, Kosanić M, Stanojković T, Stamenković S, Vasiljević P, Manojlović I, Manojlović N. *Phytochemical study and antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of Melanelia subaurifera and Melanelia fuliginosa lichens. J Food Sci Tech Mys* 2016; 53(6): 2804-2816.
4. Ranković B, Kosanić M, Stanojković T, Vasiljević P, Manojlović N. *Biological Activities of Toninia candida and Usnea barbata Together with Their Norstictic Acid and Usnic Acid Constituents. Int J Mol Sci* 2012; 13(11): 14707-14722.
5. Manojlović N, Ranković B, Kosanić M, Vasiljević P, Stanojković T. *Chemical composition of three Parmelia lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. Phytomed* 2012; 19(13): 1166-1172.
6. Wirth V. *Die Flechten Baden-Württembergs, Verbreitungsatlas, 1&2; Eugen Ulmer GmbH&Co: Stuttgart, Germany, 1995.*
7. Dobson FS. *Lichens. An illustrated guide to the British and Irish species, sixth ed. Richmond Publishing Co. London, 2011.*
8. Dorman HJ, Bachmayer O, Kosar M, Hiltunen R. *Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. J Agric Food Chem* 2004; 52(4): 762-770.
9. Oyaizu M. *Studies on products of browning reaction prepared from glucoseamine. Jpn J Nutr* 1986; 44(6): 307-314.
10. Slinkard K, Singleton VL. *Total phenolic analyses: automation and comparison with manual method. Am J Enol Viticult* 1977; 28: 49-55.
11. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. *Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in burkina fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chem* 2005; 91(3): 571-577.
12. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi: Proposed standard M38-p. Wayne, PA, USA, 1998.*

13. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 2007; 42(4): 321-324.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
15. Huneck S, Yoshimura I. Identification of lichen substances. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1996.
16. Melo MG, dos Santos JP, Serafini MR, Caregnato FF, Pasquali MA, Rabelo TK, da Rocha RF, Quintans LJr, Araújo AA, da Silva FA, et al. Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. *Toxicol In Vitro* 2011; 25(2): 462–468.
17. Kosanić M, Manojlović N, Janković S, Stanojković T, Ranković B. *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuraceae* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food Chem Toxicol* 2013; 53:112-118.
18. Yilmaz Y, Turk AO, Tay T, Kivanc M. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-usnic acid, atranorin and fumarprotocetraric acid constituents. *Z Naturforsch C* 2004; 59(3-4): 249–254.
19. Thadhani VM, Choudhary IM, Khan S, Karunaratne V. Antimicrobial and toxicological activities of some depsides and depsidones. *Journal of the National Science Foundation Sri Lanka* 2012; 40(1): 43-48.
20. Millot M, Delebassée S, Liagre B, Vignaud L, Sol V, Mambu L. Screening of lichen extracts on HT-29 human colon-cancer cells. *Planta Med* 2014; 80(16) - P1N5.
21. Bačkorova M, Jendzelovsky R, Kello M, Backor M, Mikes J, Fedoročko P. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicol In Vitro* 2012; 26(3): 462-468.



EFFECTS OF L-ASCORBIC ACID AND ALPHA-TOCOPHEROL ON BIOCHEMICAL PARAMETERS OF SWIMMING-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN SERUM OF GUINEA PIGS

<sup>1</sup>Marija Bursać-Mitrović, <sup>2</sup>Dragan R. Milovanović, <sup>1</sup>Radoslav Mitić, <sup>3</sup>Danijela Jovanović, <sup>2</sup>Miroslav Sovrlić, <sup>4</sup>Perica Vasiljević, <sup>2</sup>Jovica Tomović, <sup>\*2</sup>Nedeljko Manojlović

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Medical faculty, University of Kosovska Mitrovica, Serbia

<sup>2</sup>Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia,

<sup>3</sup>Department of Anesthesiology, Clinical Centre “Kragujevac”, Kragujevac, Serbia <sup>4</sup>Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Niš, Niš, Serbia,

\*Corresponding author E-mail: [mtnedeljko@yahoo.com](mailto:mtnedeljko@yahoo.com)

## Abstract

**Background:** The purpose of this study is to determine the effect of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol as well as combination of these vitamins with or without exposure to physical exercise on intensity of lipid peroxidation, activity of xanthine oxidase, activity of total antioxidative system, concentration of glutathione, and activity of catalase in the serum of guinea pigs.

**Materials and Methods:** The experimental measurements of intensity of lipid peroxidation, activity of xanthine oxidase, activity of total antioxidative system, concentration of glutathione, and activity of catalase were done in the serum of guinea pigs. The animals were exposed to the test load to achieve exhaustion and the test was terminated when the animal for the third time to sink into the water.

**Results:** The results of this study demonstrated that endurance exercise of guinea pigs induced oxidative stress response in terms of increased lipid peroxidation and activity of xanthine oxidase in the serum of experimental animals. Our study investigated the antioxidant activity of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol also measuring three protective markers in the serum: total antioxidant activity, content of glutathione and activity of catalase. The results obtained show that the vitamins influence the concentrations of above mentioned biochemical parameters, which points out their protective effect of swimming-induced oxidative stress.

**Conclusion:** Single or combined administration of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol caused significant inhibition of these markers indicating the important antioxidant activity of the vitamins. Results lead to conclude that the combined treatments with vitamins with or without exposure to physical exercise showed the clear synergistic effect..

**Key words:** L-ascorbic acid, alpha-tocopherol, guinea pigs, oxidative stress, biochemical parameters

## Introduction

The term oxidative stress was first defined in 1985 as “a disturbance in the pro-oxidant-antioxidant balance in favor of the former” (Sies, 1985; Sies et al., 1985). Dean Jones has proposed that the term “oxidative stress” should be redefined as “a disruption of redox signaling and control” and this definition is gaining widespread acceptance (Jones, 2006). Practically, under physiological conditions (endogenous sources) as well as under some adverse events (exogenous sources), in biological systems there is continuous production of free radicals i.e. ions, molecules and compounds that have unpaired electron and are highly reactive with biological molecules (Halliwell and Gutteridge, 1999). As a result of their reaction with lipids, proteins or DNA, oxidized products are made (Halliwell and Whiteman, 2004). Cells are equipped with enzymatic and nonenzymatic antioxidant system to eliminate free radicals and to maintain redox homeostasis (Valko et al., 2007). In oxidative stress assessment, instead of measuring free radicals themselves (which have very short half-life) we can rely on measurement of products of biological damage as well as on measurement of antioxidative capacity (enzymatic and nonenzymatic components). Vitamin C and Vitamin E play pivotal role in cellular protection against reactive oxygen species (Halliwell and Whiteman, 2004).

Vitamin E (alpha-tocopherol) as a low-molecular-weight agent is the primary chain-breaking lipid-soluble antioxidant located primarily in the membranes of tissues and it is capable of scavenging reactive oxygen species (Janero, 1991; Packer, 1991). Ascorbic acid (vitamin C) is found in two chemical forms, as reduced (L-ascorbic acid, and its ionized form of L-ascorbate) and oxidized form as (L-dehydroascorbic acid; and its ionized form of L-dehydroascorbate). Ascorbic acid is hydrophilic compound and functions better in an aqueous environment. The ascorbate anion is the predominant form existing at physiological pH (pKa of ascorbic acid is 4.25) (Powers and Jackson, 2008; Yu, 1994). The most striking chemical activity of ascorbic acid is its ability to act as a reducing agent, implicated in detoxifying various oxygen radicals *in vivo*. The speed of conversion of ascorbic acid into dehydroascorbic acid in aerobic conditions is facilitated by the higher pH values, compared to the acidic environment (Carr and Frei, 1999). Mechanism of antioxidant activity involves the conversion of ascorbic acid into its oxidized form (dehydro-ascorbic acid) by donating two electrons to reactive oxygen species (Fischer et al., 2004). Ascorbic acid can act directly scavenging lipid hydroperoxide, superoxide and hydroxyl radicals or, indirectly, playing an important role in recycling of tocopherol, a process that results in the conversion of ascorbic acid into semiascorbyl radical (Packer et al., 1979). Some authors have shown the influence of physical exercise on oxidative stress and changes in sleep pattern (Esteves et al., 2014).

The aim of this work was to study the effect of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol on some biochemical parameters of oxidative stress in the serum of guinea pigs as no previous study known to us investigated their effects on the experimental model exploited in our research. We hypothesized that the combination of two vitamins would achieve significant synergistic effects in the terms of oxidative protection.

## **Materials and methods**

### **Chemicals**

All the chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Germany. Analytical grade chemicals vitamin C (L-Ascorbic acid, ampule 1000 mg) and vitamin E ((+/-)-alpha-tocopherol, ampule 100 mg) were used.

### **Study animals**

Forty guinea pigs were used during the experiment. The animals were obtained from VMA-Department for breeding laboratory and experimental animals, Belgrade, Serbia). At the start of the experiment, the both sexes of guinea pigs weighed 450 g  $\pm$  50 g and were kept under constant environmental conditions (temperature 25°C  $\pm$  2°C; humidity 60  $\pm$  1.5 %, with 12 h light period, 10 days before the beginning experiment and during the experiment). All the animals received human care according to the criteria outlined in the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' prepared by the National Academy of Science and published by the National Institute of Health. The ethic regulations have been followed in accordance with National and institutional guidelines for the protection of animal welfare during experiments.

### **Experimental design**

The animals were randomly assigned into eight groups consisting five animals for each experiment. The first experimental group was the control group. The second experimental group is exposed to a test of excessive physical activity swimming to exhaustion. The third group was administered with 20 mg/kg, L-ascorbic acid (Vitamin C) intraperitoneally (ip), without exposing test physical load. The test substances (alpha-tocopherol and L-ascorbic acid) were administered intraperitoneally in one of the quadrants lower abdominal guinea pigs lateral to the midline, taking care to avoid injury of the bladder, liver or intestines. After the needle stick, before the injection of the substance required aspirated content. The fourth experimental group is exposed to a test of physical load and supplementation of L-ascorbic acid (20 mg/kg). The fifth group was administered with 25 mg/kg, alpha-tocopherol (vitamin E) intraperitoneally (ip), without exposure to physical stress test. The sixth group experimental group is exposed to a test of physical load and supplementation of alpha-tocopherol (25 mg/kg). The seventh group was administered with a combination of 20 mg/kg of L-ascorbic acid and 25 mg/kg alpha-tocopherol ip, without exposure to a test of the physical load. The eighth experimental group is exposed to a test of physical load and supplementation of combination of L-ascorbic acid (20 mg/kg) and alpha-tocopherol (25 mg/kg). The test load was determined by swimming to exhaustion. The experimental animals were swimming around in the water tank depth of 60 cm, with the average amount of water and 20 dm<sup>3</sup>, a temperature of 32 °C. The animals were exposed to the test load to achieve exhaustion and the test was terminated when the animal for the third time to sink into the water.

### **Biochemical evaluation**

The extent of lipid peroxidation (LPx) was determined after Buege and Aust (1988), activities of xanthine oxidase (XOD) after Bergmayer (1976), catalase (CAT) after Beers and Sizer (1952), the content of reduced glutathione (GSH) after Beuthler et al. (1983) and total antioxidant status (TAS) after Miller et al. (1993). The experimental measurements of above-mentioned parameters were done in the serum of guinea pigs. The results of biochemical analysis are presented as mean value  $\pm$  standard deviation. The difference between the control and test groups was analyzed by the last significant difference at the  $p \leq 0.005$  confidence levels.

### **Statistical analysis**

The results obtained from 5 replicates (n = 5) of each experiment. The descriptive values are presented as the mean, standard deviation (SD), minimal (min) and maximal (max) values, standard error (SE) and coefficient of variation (CV%). The significance of the difference between the experimental groups was tested two-sided using Student's t-test or Mann-Whitney test depending on the data distribution pattern (normal or non-parametric). SPSS version 19.0 was employed to analyze data. The level of probability of statistical significance was set up at  $p \leq 0.05$ .

## **Results and Discussion**

The results of the influence of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol and the combination of these vitamins with or without exposure to physical stress on the intensity of lipid peroxidation, the activity of xanthine oxidase, the activity of total antioxidative system, content of glutathione, and the activity of catalase in guinea pigs are given in Tables 1-5. The experimental measurements of above-mentioned parameters were done in the serum of guinea pigs.

The endurance exercise of guinea pigs significantly increased the lipid peroxidation values (LPx) in their serum (Table 1). Single administration of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol decreased significantly activity of this pro-oxidative enzyme in both the control and the endurance-exercise group of experimental animals.

The endurance exercise of guinea pigs significantly increased the activity of xanthine oxidase (XOD) in their serum (Table 2). Single administration of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol gave significantly lower increase in comparison with both the

control and the endurance-exercise group of experimental animals. In addition, the combination of the vitamins showed the clear synergistic effect.

The endurance exercise of guinea pigs slightly increased the activity of total antioxidant system (TAS) in their serum but the effect was not statistically significant (Table 3). Single administration of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol slightly reduced the activity in the comparison with both the control and the endurance-exercise group of experimental animals but the effect was not significant.

The endurance exercise of guinea pigs very slightly increased the content of glutathione (GSH) in their serum but the effect was not statistically significant (Table 4). Single administration of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol slightly reduced the activity in comparison with the control group but the effects were not significant. On the other side, the combination of the vitamins had variable effects on glutathione content and the oscillation which they induced was not significantly different from both the control and the endurance activity groups.

The endurance exercise of guinea pigs significantly increased the activity catalase (CAT) in their serum (Table 5). In comparison with the control, single administration of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol increased catalase activity but only in the case of L-ascorbic acid the effect was statistically significant. The combination of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol had the effect of lesser magnitude than the individual vitamins and in comparison with the control the difference was not statistically significant. In comparison with endurance-exercise group, single administration of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol decreased serum catalase activity and their combination increased it but only in the case of L-ascorbic acid the difference was statistically significant.

The results of our study showed that the endurance exercise of guinea pigs induced oxidative stress response in terms of increased lipid peroxidation and activity of xanthine oxidase in the serum of experimental animals. Single or combined administration of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol caused significant inhibition of both markers indicating the important antioxidant effects of the vitamins.

It is well-known that exercise induced metabolic stress by the generation of wide range of reactive oxygen species (Mason et al., 2014). Reactive oxygen species, in turn, react with cellular lipids producing lipid peroxides within tissues (Zsolt et al., 2013). Vitamin C and vitamin E are among the most widely studied dietary antioxidants. Both, vitamin E and vitamin C, react with and scavenge various reactive oxygen species providing protection from oxidative stress induced by different triggers (Janero, 1991; Packer, 1991; Fischer et al., 2004; Wu et al., 2014). Finally, vitamin C has been cited as being capable of regenerating vitamin E (Krishnamurthy and Wadhvani, 2012). This all explain our results about synergistic effects of vitamin E and vitamin C in diminishing lipid peroxidation and it support our hypothesis of usefulness of the vitamin combination for protection from exercise-induced oxidative stress damage.

In our study, administration of vitamin E and vitamin C suppressed the activity of xanthine oxidase, an enzyme having pro-oxidant nature. The effect of vitamin E was of greater magnitude and the most inhibition was achieved with their combination. Previous investigators proved the inhibitor effect of both vitamin E and, in some lesser extent of vitamin C on xanthine oxidase activity supporting the results of our study (Mohd et al. 2012, Dwenger et al., 1992).

To our knowledge, no previous study investigated the effects of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol combination in similar settings neither in the same or other mammal species, making our results the novelty in the available published literature. Our study investigated the possible mechanism of antioxidant activity of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol measuring three protective markers in the serum samples taken from experimental animals: total antioxidant activity, activity of glutathione and activity of catalase. The major finding was the increase of catalase activity, induced with endurance exercise and L-ascorbic acid but not with alpha tocopherol. The absence of significant changes of total antioxidant capacity and glutathione activity in our study could be, at least partly, explained with methodological issues. Researchers reported that different assays used for detection of these antioxidative markers (including those used in our research) could have different diagnostic performances (Cighetti et al. 2015, Gungör et al., 2011). Consequently, we could not exclude the possibility that the laboratory assays used in our study for these two analytes gave false-negative results, particularly if their changes were of small magnitude.

L-ascorbic acid and alpha-tocopherol had triggered different molecules of oxidative stress defense which played the role in the protection from swimming-induced oxidative stress response. A recent research tracing several biochemical and molecular markers of oxidative damage and antioxidative defense reported dual effects of vitamin C and vitamin E combination, pro-oxidant and antioxidant, depending on the doses and other experimental conditions (de Oliveira et al., 2013). Therefore, the future research with more detailed and focused designs, using various laboratory assays and different experimental conditions, are necessary in order to clarify the exact mechanisms of action of vitamin C and vitamin E on oxidative stress response during endurance exercise.

**Table 1:** The intensity of lipid peroxidation (LPx) in the serum of experimental guinea pigs in different study groups

LPx	Serum							
	C	E	A	E+A	T	E+T	A+T	E+A+T
Mean	2.110	3.178	1.788	2.377	1.496	1.852	1.008	1.198
SD	0.047	0.048	0.158	0.095	0.029	0.013	0.037	0.012
Min	2.03	3.11	1.51	2.29	1.46	1.83	0.96	1.18
Max	2.15	3.25	1.90	2.52	1.53	1.86	1.05	1.21
SE	0.02	0.02	0.08	0.04	0.01	0.01	0.02	0.01
CV%	2.13	1.52	8.84	4.01	1.93	0.70	3.67	0.98
Test		T=30.91; p<0.001*	T=4.07; p<0.001*	T=18.39; p<0.001*	T=20.88; p<0.001*	T=59.1; p<0.001*	T=32.78; p<0.001*	T=97.52; p<0.001*

C = control; E = endurance exercise; A = L-ascorbic acid; T = alpha-tocopherol;  
 \*compared with the control group; \*\*compared with the endurance exercise group  
 Content of LPx is expressed in nmol malondialdehyde/mg protein

**Table 2:** The activity of (XOD) in the serum of experimental guinea pigs in different study groups

XOD	Serum							
	C	E	A	E+A	T	E+T	A+T	E+A+T
Mean	1.123	2.263	0.810	1.438	0.512	0.834	0.240	0.338
SD	0.185	0.464	0.267	0.061	0.205	0.338	0.176	0.189
Min	0.83	1.76	0.52	1.36	0.32	0.32	0.10	0.18
Max	1.36	2.83	1.12	1.53	0.78	1.21	0.53	0.68
SE	0.08	0.21	0.13	0.03	0.10	0.17	0.09	0.08
CV%	16.45	20.51	32.92	4.25	40.08	40.56	73.54	55.87
Test		T=5.59; p<0.001*	T=2.3; p<0.05*	T=4.32; p<0.01**	T=5.2; p<0.001*	T=5.71; p<0.001*	T=8.05; p<0.001*	T=9.41; p<0.001*

C = control; E = endurance exercise; A = L-ascorbic acid; T = alpha-tocopherol;  
\*compared with the control group; \*\*compared with the endurance exercise group  
Content of XOD is expressed in nmol/mg protein·min<sup>-1</sup>

**Table 3:** The total antioxidant status (TAS) in the serum of experimental guinea pigs in different study groups

TAS	Serum							
	C	E	A	E+A	T	E+T	A+T	E+A+T
Mean	1.175	1.478	1.122	0.988	0.814	0.864	0.904	0.918
SD	0.422	0.963	0.470	0.420	0.134	0.156	0.108	0.223
Min	0.71	0.67	0.60	0.68	0.72	0.66	0.75	0.64
Max	1.76	3.28	1.57	1.79	1.02	1.09	1.04	1.20
SE	0.19	0.43	0.24	0.19	0.07	0.08	0.05	0.10
CV%	35.94	65.17	41.91	42.54	16.43	18.05	11.93	24.26
test		T=0.71; ns*	T=0.20; ns*	T=1.14; ns**	T=1.82; ns*	T=1.4; ns**	T=1.39; ns*	T=1.39; ns**

C = control; E = endurance exercise; A = L-ascorbic acid; T = alpha-tocopherol;  
\*compared with the control group; \*\*compared with the endurance exercise group  
Content of TAS is expressed in mmol/l

**Table 4:** The glutathione (GSH) content in the serum of experimental guinea pigs in different study groups

GSH	Serum							
	C	E	A	E+A	T	E+T	A+T	E+A+T
Mean	0.307	0.338	0.257	0.262	0.264	0.387	0.222	0.293
SD	0.067	0.092	0.012	0.082	0.076	0.114	0.059	0.038
Min	0.218	0.247	0.24	0.15	0.21	0.26	0.14	0.26
Max	0.418	0.508	0.27	0.34	0.39	0.55	0.28	0.36
SE	0.03	0.04	0.01	0.04	0.04	0.06	0.03	0.02
CV%	21.87	27.24	4.84	31.46	28.83	29.50	26.43	12.99
Test		T=0.66; ns*	T=1.62; ns*	T=1.51; ns**	T=0.99; ns*	T=0.8; ns**	T=2.21; ns*	T=1.1; ns**

C = control; E = endurance exercise; A = L-ascorbic acid; T = alpha-tocopherol;  
\*compared with the control group; \*\*compared with the endurance exercise group  
Content of GSH is expressed in nmol GSH/mg protein

**Table 5:** The activity of catalase (CAT) in the serum of experimental guinea pigs in different study groups

CAT	Serum							
	C	E	A	E+A	T	E+T	A+T	E+A+T
Mean	77.826	168.912	148.494	123.629	105.829	139.600	90.403	178.756
SD	15.388	47.175	53.294	7.492	60.091	82.048	29.382	49.899
Min	47.60	125.77	60.11	113.96	26.06	71.22	60.80	108.40
Max	87.90	247.03	204.29	132.03	183.45	230.00	139.67	247.72
SE	6.88	21.10	26.65	3.35	30.05	41.02	14.69	22.32
CV%	19.77	27.93	35.89	6.06	56.78	58.77	32.50	27.91
Test		T=4.5; p<0.01*	T=3.13; p<0.05*	T=2.32; p<0.05**	T=1.11; ns*	T=0.74; ns**	T=0.92; ns*	T=0.35; ns**

C = control; E = endurance exercise; A = L-ascorbic acid; T = alpha-tocopherol;  
\*compared with the control group; \*\*compared with the endurance exercise group  
Content of CAT is expressed in nmol/mg protein·min<sup>-1</sup>

## Conclusion

L-ascorbic acid and alpha-tocopherol and the combination of these vitamins with or without exposure to physical exercise influence on the changes of important biochemical parameters in the serum of guinea pigs. The combined treatments with vitamins has a protective effect on forced swimming-induced oxidative stress and show the clear synergistic effect.

## References

1. Beers, R.F. and Sizer, I.W. (1952). Spectrophotometric method for measuring of breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**: 133-140.
2. Bergmayer, U.H. (1970). *Methoden Der Enzymatischen analyse*. Pharmazie in unserer Zeit Verlag Chemie: Weinheim: 483-484.
3. Beuthler, E., Duron, O. and Kelly, B. (1983). Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* **61(5)**: 882-888.
4. Buege, A.J., Aust, D.S. (1988). *Methods in enzymology*; Fleischer S, Parker L. (Eds.). Academic Press, New York.
5. Carr, A. and Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* **13**: 1007-1024.
6. Cighetti, G, Bamonti, F, Aman, CS, Gregori, D, De Giuseppe, R, Novembrino, C, de Liso F, Maiavacca, R. and Paroni, R. (2015). Oxidative status in different settings and with different methodological approaches compared by receiver operating characteristic curve analysis. *Clin. Biochem.* **48(1-2)**: 73-78.
7. Dwenger A., Funck M., Lueken B., Schweitzer G. and Lehmann U. (1992). Effect of ascorbic acid on neutrophil functions and hypoxanthine/xanthine oxidase-generated, oxygen-derived radicals. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **30(4)**: 187-191.
8. Esteves, A.M., Ackel-D'Elia, C., Tufik, S. and De Mello, M.T. (2014). Sleep patterns and acute physical exercise: the effects of gender sleep disturbances, type and time of physical exercise. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* **54(6)**: 809-815.
9. Fischer, H., Schwarzer, C. and Illek, B. (2004). Vitamin C controls the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **101(10)**: 3691-3696.
10. Glatzle, D. and Vuilleumier, F. (1974). Glutathione reductase test with whole blood a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in human. *Experientia* **30(6)**: 665-667.
11. Güngör, N., Ozyürek, M., Güçlü, K., Cekiç, S.D. and Apak R. (2011). Comparative evaluation of antioxidant capacities of thiol-based antioxidants measured by different *in vitro* methods. *Talanta.* **83(5)**: 1650-1658.
12. Halliwell, B and Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Bras. J Pharmacol.* **142(2)**: 231-255.
13. Halliwell, B and Gutteridge, J. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford, Oxford University Press, 2007.
14. Jones, D.P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxid. Redox. Signal.* **8**: 1865-1879.
15. Janero, D.R. (1991). Therapeutic potential of vitamin E in the pathogenesis of spontaneous atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* **11**: 129-144.
16. Kanagasabai, T. and Ardern, C.I. (2015). Contribution of inflammation, oxidative stress, and antioxidants to the relationship between sleep duration and cardiometabolic health. *Sleep.* sp-00153-15.
17. Mason S. and Wadley G.D. (2014). Skeletal muscle reactive oxygen species: a target of good cop/bad cop for exercise and disease. *Redox Rep.* **19(3)**: 97-106.
18. Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V. and Milner A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **84(4)**: 407-412.
19. Mohd F.N.A., Ibrahim I.A., Kamisah Y. and Mohd I.N. (2012). Palm vitamin E reduces catecholamine, xanthine oxidase activity and gastric lesions in rats exposed to water-immersion restraint stress. *BMC Gastroenterol.* **28**: 12-54.
20. de Oliveira, B.F., Costa, D.C., Nogueira-Machado, J.A. and Chaves, M.M. (2013).  $\beta$ -Carotene,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid: differential profile of antioxidant, inflammatory status and regulation of gene expression in human mononuclear cells of diabetic donors. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **29(8)**: 636-645.
21. Packer, L. (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. *Am. Clin. Nutr.* **53**: 1050S-1055S.
22. Packer, J. E., Slater, T. F., Willson, R. L. (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature.* **278**: 737-738.
23. Powers, S.K., Jackson and M.J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* **88**: 1243-1276.
24. Simon, L.M., Fatrai, Z., Jonas, D. E. and Matkovics, B. (1974). Study of metabolism enzyme during the development of *Phaseolus vulgaris*. *Biochem. Physiol. Pflanz.* **166**: 389-393.
25. Sies, H. (1985). Oxidative stress, Introductory remarks, In: *Oxidative Stress* (H. Sies, ed.) Academic Press, London.
26. Sies, H., Cadenas, E., Symons, M. C. R. and Scott, G. (1985). Oxidative stress: Damage to intact cells and organs [and discussion]. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **311**: 617-631.
27. Valko, M., Morris, H. and Cronin, M.T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* **12(10)**: 1161-1208.
28. Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* **74**: 139-162.
29. Wu, C.M., Cheng, Y.L., Dai, Y.H., Chen, M.F., Wang, C.C. (2014).  $\alpha$ -Tocopherol protects keratinocytes against ultraviolet A irradiation by suppressing glutathione depletion, lipid peroxidation and reactive oxygen species generation. *Biomed. Rep.* **2(3)**: 419-423.
30. Zsolt, R., Orsolya, M., Eniko, N. Erika, K., and Sataro, G. (2013). The complex role of physical exercise and reactive oxygen species on brain. *J. Sport. Health Sci.* **2(2)**: 87-93.



# EFFECTS OF THE TOLUENE AND METHANOL EXTRACT OF SENNA (*CASSIA ANGUSTIFOLIA VAHL*) ON VIABILITY AND PROLIFERATION HELA CELLS

## AUTHORS

Rančić A.<sup>1</sup>, Tomović J.<sup>2</sup>, Vasiljević P.<sup>3</sup>, Aleksić M.<sup>3</sup>, Jušković M.<sup>3</sup>, Najman S.<sup>3</sup>, Manojlović N.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Public Health Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup>Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup>Faculty of Science and Mathematics, University of Niš, Niš, Serbia

## CORRESPONDENT

Nedeljko Manojlović

Faculty of Medical Sciences, Kragujevac  
Republic of Serbia

mtnedeljko@yahoo.com

## SUMMARY

Senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) is used in food and pharmaceutical technologies as officinal drugs and natural laxative. The aim of the study was to investigate the effect of toluene and methanol Senna extracts on the viability and proliferation of HeLa cells. The senna leaves were extracted in Soxhlet's extractor and obtained toluene and methanolic extracts were used for determination of effects on viability and proliferation. Cytotoxic effect of different concentrations (0.1%, 0.01%, 0.001% and 0.0001%) extracts was investigated in HeLa cells *in vitro*. MTT test showed significant cytotoxic activity for toluene extract, especially the concentration of 0.1%, while the tested concentrations methanolic extract did not show cytotoxic activity.

**Key words:** *Cassia angustifolia*, viability, proliferation, HeLa cell, MTT, cytotoxic activity.

## SRPSKI

### EFEKAT TOLUENSKOG I METANOLSKOG EKSTRAKTA SENE (*CASSIA ANGUSTIFOLIA VAHL*) NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU

Rančić A.<sup>1</sup>, Tomović J.<sup>2</sup>, Vasiljević P.<sup>3</sup>, Aleksić M.<sup>3</sup>, Jušković M.<sup>3</sup>, Najman S.<sup>3</sup>, Manojlović N.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Institut za javno zdravlje Kragujevac, 34000 Kragujevac, Srbija

<sup>2</sup>Fakultet Medicinskih Nauka, Univerzitet u Kragujevcu, 34000 Kragujevac, Srbija

<sup>3</sup>Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, 18000 Niš, Srbija

### SAŽETAK

List sene (*Cassia angustifolia* Vahl.) se koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj tehnologiji kao oficinalna droga i prirodni laksativ. Cilj studije je ispitati efekte toluenskog i metanolskog ekstrakta Sene na vijabilnost i proliferaciju HeLa ćelija. Ekstrakcijom lišća sene sa Soxhlet-ovim ekstraktorom dobijeni su toluenski i metanolski ekstrakti, koji su korišćeni za ispitivanje efekta na vijabilnost i proliferaciju. Citotoksični efekat različitih koncentracija (0,1%, 0,01%, 0,001% i 0,0001%) ekstrakata ispitan je na HeLa ćelijama u *in vitro* uslovima. MTT test pokazuje visoku citotoksičnost toluenskog ekstrakta, naročito onog koncentracije 0,1%, dok ispitivane koncentracije metanolskog ekstrakta ne pokazuju citotoksičnost.

**Ključne reči:** *Cassia angustifolia*, vijabilnost, proliferacija, HeLa ćelije, MTT, citotoksična aktivnost.

## INTRODUCTION

In recent years, interest in studying the different extracts of traditional medicinal plants as a source of potential cytotoxic activity has been increasing [1,2]. *Cassia* genus belongs to the family Fabaceae (also called Legumino-

sae), includes over 700 species which because of therapeutic efficacy are used in medicinal purposes [3,4,5]. *Cassia L.* and *Senna Mill.* are commonly used medicinal plants for a broad range of diseases and conditions including constipation, parasitic skin diseases, hypercholesterolemia, hypertension, inflammation, pain relief, and antiplatelet aggregating activity [4,5,6]. *Cassia angustifolia* is a plant widespread in tropical regions of East Africa and Asia, where it

grows as a bush which reaches height of 300 cm [4]. The drug consists of dried leaves of Senna [7]. Cassia angustifolia is used more than the other species of the genus Cassia because the drug is purer, more homogeneous and more stable composition. The mechanism of action of sennosides is well studied. Sennosides pass through the stomach and small intestine unchanged. They are activated only in the large intestine under the action of bacterial enzymes that hydrolyze them and reduce their active form [8,9]. Previous studies of active components from Senna leaves were investigate the genotoxic effects on normal cell lines [10]. The sennosides, main active metabolite of Senna, show a very low toxicity in rats and low genotoxicity in bacterial strains [6,9,10]. The laxative property of Senna is based on two glycosides sennoside A and sennoside B [11]. The strongest laxative sennosides A and B, shows the lowest toxicity, while fraction that contains rhein 8-glycoside with a minimum efficiency laxative, has increased toxicity [12,13]. Emodin and aloe-emodin showed toxic effects on Salmonella typhimurium, on hepatocytes and fibroblasts from mouse [14]. In other studies, such an effect has not been confirmed. In research carried out by Mori mice were treated with 1% hydroxyanthraquinone 480 days, there were neoplasms in the stomach, liver and intestine [15,16]. Sieger and Abendroth in there works show that there is a specifed risk factor in chronic use of laxatives [17,18]. All other tests which were performed did not provide convincing evidence that chronic use of Senna causes functional and structural effects in the body [19].

## STYDY OBJECTIVE

The aim of the study was to investigate the effect of toluene and methanol Senna extracts (Cassia angustifolia Vahl) on the viability and proliferation of HeLa cells.

## MATERIAL AND METHODS

Cells. The extracts were tested on the human cervical carcinoma cell line - HeLa. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Minimal Essential Medium (DMEM, PAA Laboratories GmbH) with supplements of 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin and 10% fetal bovine serum.

Extracts. Toluen and methanol (MeOH) extracts of Senna (Cassia angustifolia) were prepared by extracting finely milled plant leaves in a Soxhlet extractor for 3 hours. After that, the extract was evaporated under reduced pressure in a vacuum evaporator. The toluen and methanol extracts, obtained in this way, were diluted with enriched DMEM up to final concentrations of 0.0001%, 0.001%, 0.01% and 0.1% (v / v).

MTT test. The MTT test is a widely accepted method for the rapid and accurate testing of the cytotoxicity of various materials, as well as of cell viability and cell proliferation. This method is based on the capacity of the mitochondrial dehydrogenase of viable cells to reduce tetrazolium salts and create colored formazan products. The number of living cells is directly proportional to the quantity of generated formazan.

Effects on cell viability. HeLa cells were seeded in a 96-well plate for cultivation. In order to determine the effect of Senna extract on the growth of HeLa cells, there

were seeded  $10^5$  cells in each well. The cells were incubated for 24 hours. After incubation, the medium was replaced with methanol and toluene extracts in different concentration. Saponin (with a concentration of 2 mg/ml) was used as a positive control. The negative control consisted in cells growing in pure DMEM. It was done in triplicate. The cells were incubated for 24 hours in an atmosphere saturated with water vapor, with 5% of CO<sub>2</sub> at 37 °C. (Jouan, EG 110IR)

Effects on cell proliferation. In order to determine the effect of Senna extract on the proliferation of HeLa cells,  $10^4$  cells were seeded in the wells. After 24 hours, Senna extract was added. Cisplatin (with a concentration of  $6 \times 10^{-4}$  mg/ml) was used as a positive control. The cells were incubated for 72 hours in an atmosphere saturated with water vapor, with 5% of CO<sub>2</sub> at 37 °C. It was done in triplicate.

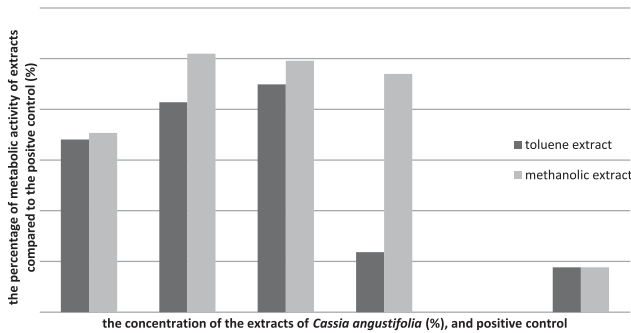
Upon completion of the incubation, the medium was extracted, the cells were washed with 100 µl of PBS and there was added a quantity of 20 µl of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. After 4 hours of incubation at 37 °C, the MTT was removed and 100 µl of isopropanol were added, in order to dissolve the formed formazan crystals. The spectrophotometric measurement of MTT reduction was carried out at 540 nm, on multi-channel photometer Multiscan Ascent No354, Thermo Labsystems, Finland.

The viability/proliferation percentage of HeLa cells was obtained on the basis of the following formula:

% Viability (proliferation) = average value of absorbance of each test extracts / average value of control absorbance

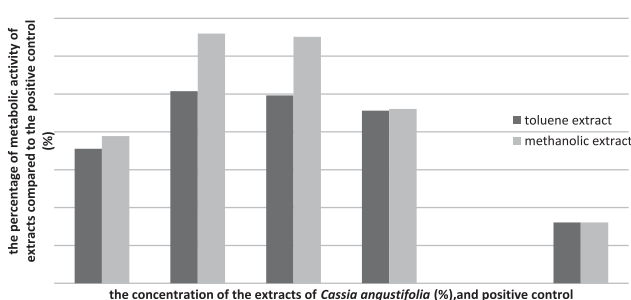
## RESULTS

Effects of the toluene and methanol extract of Senna after incubation for 24 hours. Figure 1 shows that cell viability ranges between 23.64% and 89.98%, after 24 hours of incubation with toluene extract of Senna. The 0.1% toluene extract of Senna shows the largest decrease in the viability of HeLa cells (23.64%), while the extract with a concentration of 0.01% shows the weakest effect on cell viability (89.98%). The viability of the cells with methanol extracts, after 24 hours of incubation is in the range of 70.7% to 101.94%. The lowest viability of HeLa cells was manifested MeOH extract concentrations of 0.0001%. The concentration of 0.001% and 0.01% were showed approximately the same effect on the viability of HeLa cells and which was around 100%. The viability of the HeLa cells at a concentration of 0.1% of MeOH extracts was 93.9%. The results do not indicate the existence of a dose relationship between the concentration of methanol extracts of Cassia angustifolia and cell viability. HeLa cell viability at a concentration of 0.0001% of the extract is 70.70%, which suggested that there was a slight cytotoxic effect. Other concentrations of MeOH extract did not have cytotoxic effect on the cells during the incubation period of 24 hours. The cell viability with the saponin was 17.7%



**Figure 1.** The percentage of the metabolic activity in the HeLa cells compared to the positive control after incubation for 24 hours with different concentrations of toluene and methanol extract of species *Cassia angustifolia*

Effects of the toluene and methanol extract of Senna after incubation for 72 hours. Figure 2 shows the viability of HeLa cells in the presence toluene extract of Senna after 72 hours of incubation. The viability of HeLa cells ranges between 71.10% and 101.51%. The highest reduction of cell proliferation (28.9%) occurs when the concentration of the toluene extract is 0.0001%. All other toluene extracts showed little effect on cell proliferation, while a 0.001% concentration showed an increase in the viability of HeLa cells by 1% in comparison to the negative control. The viability of the cells with methanol extracts, after 72 hours of incubation is in the range of 77.73% to 131.95%. MeOH extract with a concentration of 0.0001% displayed the greatest effect on the reduction of cell proliferation, while cell viability was 77.74%. Concentrations of 0.001% and 0.01% showed an increase in the viability of HeLa cells by about 130%, indicating that the given concentrations of Senna had a pronounced proliferative effect. When the concentration of the MeOH extract of Senna was 0.1%, cell viability amounted to 92.06%, displaying a slight suppression of cell proliferation in comparison to the control group.



**Figure 2.** The percentage of the metabolic activity in the HeLa cells compared to the positive control after incubation for 72 hours with different concentrations of toluene and methanol extract of species *Cassia angustifolia*

## DISCUSSION

The results, after incubation of 24 hours with a toluene extract showed an inhibitory effect on cell viability. The greatest degree of influence had the highest concentration (0.1%). A concentration of 0.0001% to 0.01% showed a smaller cytotoxic effect than the maximum concentration. Based on the results, which were obtained

after 24 hours of incubation HeLa cells with methanol extracts of *Cassia angustifolia* can be concluded that with increasing concentration of 0.0001% to 0.01% increases cell viability, and then at a concentration of 0.1% fell again [2,6,10].

The results obtained for both extracts indicate that there was no dose dependence between the concentration of Senna extracts and cell viability. By comparing the different concentrations of the tested extracts, it is evident that extracts with middle concentrations had the best effect on the viability and proliferation of HeLa cells. By comparing the results of different types of extracts, we can see that the toluene extract of *Cassia angustifolia* had a higher inhibitory effect on the viability and proliferation of HeLa cells, unlike methanol, which has a stimulating effect in certain concentrations. The results obtained in this study should be considered as the consequence of the effects of various chemical compounds. The presence of chemical compounds in the extract depended on the solvent that was used. In addition to that, the incubation process led to the interaction of the compounds in the extract, as well as to the interaction with their metabolic products, which may have had first an inhibitory effect and later a stimulatory effect on cells at certain extract concentrations [12,13].

## CONCLUSION

After analyzing the impact of toluene and methanol extract of *Cassia angustifolia* on the viability of HeLa cells, we can conclude the following: Toluene extract with a concentration of 0.1% displayed a high cytotoxicity after 24 hours of incubation, while extracts with lower concentrations were slightly cytotoxic. After 72 hours of incubation, the tested toluene extracts did not inhibit the growth of cells. The tested methanol extracts displayed no cytotoxicity, except in the case of the lowest concentration, which exhibited low cytotoxicity and cytostaticity. Different (toluene and a methanol) extracts of the same plant species have different effects on the viability and proliferation of HeLa cells. The results could contribute to further research and finding new use of Senna, in order to extend the therapeutic indication and use of the chemotherapy but also the treatment of conditions which may find application.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the financial support of the Ministry of Education, Science and Technology of the Republic of Serbia (Grants No. 172047 and 172015).



---

## REFERENCES

---

1. Gordanian B, Behbahani M, Carapetian J, Fazilati M. In vitro evaluation of cytotoxic activity of flower, leaf, stem and root extracts of five *Artemisia* species. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2014; 9(2): 91-96.
2. Kamal H, Musfizur H, Nazma P, Mahmudul H, Siddiqui I, Ahsanul H. Antimicrobial, cytotoxic and thrombolytic activity of *Cassia senna* leaves. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2012; 02(06): 186-190.
3. Sultana S, Ahmad M, Zafar M, Khan A, Arshad M. Authentication of herbal drug *Senna* (*Cassia angustifolia* Vahl.): A village pharmacy for Indo-Pak Subcontinent. *African journal of pharmacy and pharmacology*, 2012; 6(30): 2299-2308.
4. Seethapathy GS, Ganesh D, Kumar S, Senthilkumar U, Newmaster SG, Ragupathy S, Shaanker RU, Ravikanth G. Assessing product adulteration in natural health products for laxative yielding plants, *Cassia*, *Senna*, and *Chamaecrista*, in Southern India using DNA barcoding. *International Journal of Legal Medicine*, 2014; DOI 10.1007/s00414-014-1120-z.
5. Monkheang P, Sudmoon R, Tanee T, Noikotr K, Bletter N, Chaveerach A. Species diversity, usages, molecular markers and barcode of medicinal *Senna* species (Fabaceae, Caesalpinioideae) in Thailand. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011; 5(26): 6073-6181.
6. Silva CR, Monteiro MR, Rocha HM, Ribeiro AF, Caldeira-de-Araujo A, Leitão AC, Bezerra R, Pádula M. Assessment of antimutagenic and genotoxic potential of *senna* (*Cassia angustifolia* Vahl.) aqueous extract using in vitro assays. *Toxicology in Vitro*, 2008; 22(1): 212-218.
7. Satywanti GV. *Medicinal Plants of India*; ICMR: New Delhi, India. 1976; 1: 197.
8. Chatterjee A, Pakrashi SC. *The Treatise of Indian Medicinal Plants*; PID, CSIR New Delhi 1992; 2: 35-41.
9. Upadhyay A, Chandel Y, Nayak PS, Khan NA. Sennoside contents in *Senna* (*Cassia angustifolia* Vahl.) as influenced by date of leaf picking, packaging material and storage period. *Journal of stored products and postharvest research*, 2011; 2(5): 97-103.
10. Hietala P, Marvola M, Parviainen T, Lainonen H. Laxative potency and acute toxicity of some anthraquinone derivatives, *senna* extracts and fractions of *senna* extracts. *Pharmacology and Toxicology*, 1987; 61(2): 153-156.
11. Yamasaki K, Kawaguchi M, Tagami T, Sawabe Y, Satoshi Takatori. Simple and rapid analysis of sennoside A and sennoside B contained in crude drugs and crude drug products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Natural Medicines*, 2010; 64(2): 126-132.
12. Mengs U, Mitchell J, McPherson M, Gregson R, Tigner J. A 13-week oral toxicity study of *senna* in the rat with an 8-week recovery period. *Archives of Toxicology*, 2004; 78(5): 269-275.
13. Mitchell JM, Mengs U, McPherson S. Anoral carcinogenicity and toxicity study of *senna* (*Tinnevely senna* fruits) in the rat. *Archives of Toxicology* 2006. (80):34-44
14. Sandnes D, Johansen T, Teien G, Ulsaker G. (1992) Mutagenicity of crude *senna* and *senna* glycosides in *Salmonella typhimurium*. *Pharmacology and Toxicology*, 1992; 71(3): 165-172.
15. Mori H, Yoshimi N, Iwata H. Carcinogenicity of naturally occurring 1-hydroxyanthraquinone in rats: induction of large bowel, liver and stomach neoplasms. *Carcinogenesis*, 1990; 11(5): 799-802.
16. Nusko G, Schneider B, Schneider I, Wittekind Ch, Hahn EG. Anthranoid laxative use is not a risk factor for colorectal neoplasia: results of a prospective case control study. *Gut*, 2000; 46(5) :651-655.
17. Siegers CP, Von Hertzberg-Lotton E, Otte M, Schneider B. Anthranoid laxative abuse - a risk for colorectal cancer? *Gut*, 1993; 34(8): 1099-1101.
18. Abendroth A, Klein R, Schlaak J, Metz KA, Dobos GJ, Langhorst J. Impressive picture of a melanosis coli after chronic anthraquinone laxative use--is there an increased risk for colorectal cancer? *Z Gastroenterol*, 2009; 47(6): 579-582.
19. Westendorf J, Marquardt H, Poginsky B, Dominiak M, Schmidt J, Marquardt H. Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones. *Mutation Research*, 1990; 240 (1): 1-12.

# ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LICHEN CETRARIA ACULEATA

## AUTHORS

Tomović J.<sup>1</sup>, Rančić A.<sup>1</sup>, Vasiljević P.<sup>2</sup>, Mašković P.<sup>3</sup>, Živanović S.<sup>4</sup>, Manojlović N.<sup>1</sup>, Sovrlić M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup> Faculty of Science, University of Niš, Niš, Serbia

<sup>3</sup> Faculty of Agriculture, University of Kragujevac, Čačak, Serbia

<sup>4</sup> Faculty of Medicine, University of Niš, Niš, Serbia

## KORESPONDENT

JOVICA TOMOVIĆ

*Faculty of Medical Sciences,  
University of Kragujevac,  
Kragujevac, Serbia*

✉ jovicatomovic2011@gmail.com

## SUMMARY

The aim of the present study is to investigate the antioxidant properties of the lichen *Cetraria aculeata*. Antioxidant activity of the methanol and ethyl acetate extracts of lichen was tested by different methods including determination of total phenolics content, determination of total antioxidant capacity, DPPH free radical scavenging activity, inhibitory activity towards lipid peroxidation, ferrous ion chelating ability and hydroxyl radical scavenging activity. The extracts of the lichen *C. aculeata* showed significant antioxidant activity. The methanol extract showed higher values for total phenolics and total antioxidant capacity compared to the ethyl acetate extract, while the ethyl acetate extract demonstrated better results for DPPH radical scavenging, inhibitory activity towards lipid peroxidation, chelating ability and hydroxyl radical scavenging than the methanol extract. This is the first report of the antioxidant properties of *Cetraria aculeata* growing in Serbia. The results of antioxidant activity indicate the application of this lichen as source of natural antioxidants that could be used as a possible food supplement, in the pharmaceutical industry and in the treatment of various diseases.

**Keywords:** ROS, antioxidant activity, lichen, *Cetraria aculeata*.

## INTRODUCTION

Active oxygen exists in different forms, such as superoxide anion radicals ( $O_2^{\bullet -}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydroxyl radicals ( $OH^{\bullet}$ ) and singlet oxygen ( $^1O_2$ ). These forms of oxygen are highly reactive intermediates, and have a collective name of reactive oxygen species (ROS) [1,2,3,4,5]. ROS are free radicals very important for living organisms, in which are formed in different ways. In normal aerobic respiration, stimulated polymorphonuclear leukocytes and macrophages, and peroxisomes appear to be the main endogenous sources of most oxidants produced by cells. However, despite the fact that ROS are necessary for cell function, in high concentrations leads to oxidative stress and to the development a large number of diseases such as arthritis, carcinogenesis, aging. In addition to endogenous sources of free radicals, a major contribution of the accumulation of free radicals in cells are provided by exogenous sources such as ionizing radiation, tobacco smoke, certain pollutants, organic solvents and pesticides [4, 6, 7, 8, 9, 10]. The above mentioned diseases and accelerated aging are the consequence of oxidative tissue damage by free radicals because of unbalanced mechanisms of antioxidant protection under the influence of endogenous and exogenous factors [11]. ROS attack unsaturated fatty acids in membrane proteins, causing lipid peroxidation, and the result is damage to membrane proteins [12]. This

leads to reduced permeability of membranes, receptors and enzyme activity, and reduced activation of cells. Free radicals attack the DNA, while leading to DNA damage, resulting in mutations that cause cancer. Therefore, the prevention of many diseases are important antioxidant defense systems, including food, drugs and antioxidant enzymes [13,14].

Antioxidants are compounds of natural and synthetic origin, which have the ability to inhibit or delay the process of oxidation caused by free radicals. They prevent the initiation of oxidizing chain reactions. In this way, protect the body from oxidative stress caused by free radicals [15,16,17]. However, despite widespread use of synthetic antioxidants, at the moment it is limited because of suspicions that they manifest toxic and carcinogenic effects such as butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), tertbutylhydroquinone (TBHQ) and propyl gallate (PG). Because of this there is a great interest for finding natural antioxidants, which do not cause adverse effects [18, 19]. Therefore, attention will be focused to the lichen as a natural source of antioxidants due to insufficient research of their antioxidant properties.

Lichens are complex associations composed of fungi ("micobiont") and one or more algae or cyanobacteria ("photobionts") living in symbiosis [20]. So far more than 20.000 known species of lichens have been determined and more than 1000 primary and secondary metabolites

of lichens have been identified [21,22]. Secondary metabolites of lichens represent different classes of chemical compounds (dibenzofurans, depsides, depsidones, depsones, lactones, quinones, etc.), which contain in their structure a phenolic groups that have the ability to scavenge toxic free radicals. Because these metabolites exhibit strong antioxidant activity, about which are reported [23,24,25]. It has been found that depsidones are more efficient antioxidants than depsides [26].

Until now, the extracts of *Cetraria aculeata* have been explored for antimicrobial activity [27] and genotoxic/antigenotoxic and cytotoxic activities [28].

## STUDY OBJECTIVE

The aim of the present study was to investigate the antioxidant properties of *Cetraria aculeata* in order to find an easily accessible source of natural antioxidants that could be used as a possible food supplement, in the pharmaceutical industry and in the treatment of various diseases.

## MATERIAL AND METHODS

### LICHEN MATERIAL

The lichen *Cetraria aculeata* (Schreb.), family Parmeliaceae, was collected from Kopaonik (Ploce) in Serbia during the april 2011. Voucher specimens (9064, HMN) were deposited in the herbarium of the Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Nis.

### PREPARATION OF THE LICHEN EXTRACTS

The extraction of the lichen *Cetraria aculeata* was performed by macerating lichen sample with separately methanol and ethyl acetate. The lichen material was dried one week at room temperature (26°C), after which it was ground to a uniform powder. Then, 500g dry powdered lichen material was soaked in 2000 mL of an appropriate solvent (methanol and ethyl acetate) at room temperature for three days. After which extracts were filtered through a Whatman no. 42 (125 mm) filter paper and concentrated in a rotary evaporator. In this way, both extracts has been prepared.

### DETERMINATION OF THE TOTAL PHENOLICS

Determination of total phenolics content was performed using the Folin-Ciocalteu method [29]. The lichen extract was diluted to the concentration of 1mg/mL, and aliquots of 0.5mL were mixed with 2.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent (previously diluted 10-fold with distilled water) and 2 mL of NaHCO<sub>3</sub> (7.5%). The resulting mixture was staying 15 min at the 45°C, after which absorbance was measured at 765nm on spectrophotometer against blank sample. Total phenolic content in the extracts were expressed in the form of gallic acid equivalents (mg GA/g extract). The values are presented as means of triplicate analyses.

### DETERMINATION OF TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY

The total antioxidant activity of the lichen extracts was determined using the phosphomolybdenum method [30]. This test is based on the reduction of Mo (VI)-Mo (V) by the antioxidant compounds and subsequent formation of a green phosphate/Mo (V) complex at acid pH. 0.3 mL of sample extract was combined with 3 mL of reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The tubes with reaction solution were incubated at 95 °C for 90 min. After which the absorbance of the solution was measured at 695 nm using spectrophotometer versus blank after cooling to room temperature. Methanol in the place of extract was used as the blank. As standard was used ascorbic acid (AA). The total antioxidant capacity was determined as milligrams of ascorbic acid per gram of the dry extract (mg AA/g extract).

### DETERMINATION OF DPPH FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY

The free radical scavenging activity of extracts was measured using the stable radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil) according to method [31] was adopted with suitable modifications from [32]. DPPH (8 mg) was dissolved in 100 mL methanol to obtain a concentration of 80 µg/ mL. Then serial dilutions were carried out with the stock solution (1mg/mL) of the extract. The resulting solutions (2mL each) were mixed with DPPH (2 mL) and allowed to stand for 30 min for any reaction to occur, and the absorbance was measured at 517nm. As reference standards were used ascorbic acid (AA), gallic acid (GA) and butylated hydroxytoluene (BHT) and dissolved in methanol were used to make the stock solution with the same concentration (1mg/ mL). Control sample was prepared containing the same volume without test compounds or reference antioxidants. Methanol 95% was used as blank. Inhibition DPPH free radical scavenging activity (%) of lichen extract was calculated using the following equation:

$$\% \text{ inhibition} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$$

(1) where Ac was the absorbance of the control (containing DPPH of the stock solution and methanol), and As was the absorbance of the sample (containing sample extract solution or standard solution without DPPH of the stock solution).

Results are presented as the IC<sub>50</sub> values (minimum concentration of the each tested sample that reduces 50% of the DPPH radical, was calculated as µg/ mL through sigmoidal dose-response curve).

### DETERMINATION OF THE INHIBITORY ACTIVITY TOWARD LIPID PEROXIDATION

The antioxidant activity of extracts was determined using the thiocyanate method [33]. Serial dilutions were carried out with the stock solution (1mg/mL) of the extracts, and 0.5 mL of each solution was added to linoleic acid emulsion (2.5mL, 40 mM, pH 7.0). The linoleic acid emulsion was prepared by mixing 0,2804 g linoleic acid, 0.2804 g Tween-20 as emulsifier in 50mL 40mM phosphate buffer and the mixture was then homogenized. The final volume was adjusted to 5mL with 40 mM phosphate buffer, pH 7.0. After incubation at 37°C in the

dark for 72 hours, a 0.1 mL aliquot of the reaction solution was mixed with 4.7 mL of ethanol (75%), 0.1 mL FeCl<sub>2</sub> (20 mM) and 0.1 mL ammonium thiocyanate (30%). The absorbance of this mixture was measured at 500 nm, after it was stirred for 3 min. As reference compounds were used ascorbic acid, gallic acid,  $\alpha$ -tocopherol and BHT. To eliminate the solvent effect, the control sample, which contained the same amount of solvent added to the linoleic acid emulsion in the test sample and reference compound, was used. Inhibition of linoleic acid peroxidation (%) was calculated using following formula:

$$\% \text{ inhibition} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$$

(2) where Ac was the absorbance of the control and As was the absorbance of the sample.

The results of inhibitory activity towards lipid peroxidation are presented as the IC<sub>50</sub> values.

#### MEASUREMENT OF FERROUS ION CHELATING ABILITY

Based by decrease in absorbance at 562 nm of the iron (II)-ferrozine complex was measured by ferrous ion chelating ability [34, 35]. One milliliter of 0.125 mM FeSO<sub>4</sub> was added to 1.0 mL sample (with different dilutions), followed by 1.0 mL of 0.3125 mM ferrozine. Before measuring the absorbance, mixture was allowed to equilibrate for 10 min. The ability of the sample to chelate ferrous ion was calculated relative to the control (consisting of iron and ferrozine only) using the formula:

$$\text{Chelating effect (\%)} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$$

(3) where Ac was the absorbance of the control and As was the absorbance of the sample.

The results of ferrous ion chelating ability are presented as the IC<sub>50</sub> values.

#### DETERMINATION OF HYDROXYL RADICAL SCAVENGING ACTIVITY

The ability of lichen *Cetraria aculeata* to inhibit non site-specific hydroxyl radical-mediated peroxidation was carried out according method described by [36]. The reaction mixture contained 100  $\mu$ L of extract dissolved in water, 500  $\mu$ L of 5.6 mM 2-deoxy-D-ribose in KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH buffer (50 mM, pH 7.4), 200  $\mu$ L of premixed 100  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub> and 104 mM EDTA (1:1 v/v) solution, 100  $\mu$ L of 1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 100  $\mu$ L of 1.0 mM aqueous ascorbic acid. Tubes were vortexed and incubated at 50°C for 30 min. Thereafter, 1 mL of 2.8% TCA and 1 mL of 1.0% TBA were added to each tube. The samples were vortexed and heated in a water bath at 50°C for 30 min. The extent of oxidation of 2-deoxyribose was estimated from the absorbance of the solution at 532 nm. The percentage inhibition values were calculated from the absorbance of the control (Ac) and of the sample (As), using following formula:

$$\% \text{ inhibition} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$$

(4) where the controls contained all the reaction reagents except the extract or positive control substance.

The results of hydroxyl radical scavenging activity are presented as the IC<sub>50</sub> values.

#### STATISTICAL ANALYSIS

All computations were made by employing the statistical software (SPSS, version 11.0). Experimental results are presented as mean  $\pm$  standard deviations of three measurements. Statistical analyses were performed using Student's t-test and one way analysis of variance while the probability value of 0.05 was considered significant.

The obtained results of antioxidant activity for methanol extract of *C. aculeata* were compared to the published results of the antioxidant analysis of methanol extract of *T. candida* [40], using the Student's t-test.

#### RESULTS

##### Antioxidant activity

Table 1 shows the results of the determination of the total phenols and antioxidant capacity of the examined *C. aculeata* extracts. Total phenolic contents, expressed as gallic acid equivalents were amounted to 80.8  $\pm$  0.79 mg GA/g and 64.12  $\pm$  0.58 mg GA/g, for the methanol and ethyl acetate extracts, respectively. Results for total antioxidant capacity were amounted to 91.52  $\pm$  0.34  $\mu$ g AA/g and 71.5  $\pm$  0.29  $\mu$ g AA/g, for methanol and ethyl acetate extracts, respectively.

In Table 2 are given the results of DPPH scavenging activity for the examined *C. aculeata* extracts. For the methanol extract IC<sub>50</sub> value was 51.65  $\pm$  1.38  $\mu$ g/mL, while this value for the ethyl acetate extract was 41.4  $\pm$  0.94  $\mu$ g/mL.

The results of inhibitory activity towards lipid peroxidation (Table 2) of the tested extracts of *C. aculeata* were amounted to 45.55  $\pm$  0.99  $\mu$ g/mL and 38.55  $\pm$  0.76  $\mu$ g/mL for methanolic and ethyl acetate extracts, respectively.

In Table 2 are shown IC<sub>50</sub> values for the metal chelating activity for the methanol and ethyl acetate extract. These values were amounted of 50.43  $\pm$  0.98  $\mu$ g/mL and 40.55  $\pm$  0.93  $\mu$ g/mL, respectively.

The hydroxyl radical scavenging activity of the examined extracts are given in Table 2. For the methanol extract IC<sub>50</sub> value was 90.1  $\pm$  0.47  $\mu$ g/mL while for the ethyl acetate extract this value was 79.4  $\pm$  0.65  $\mu$ g/mL.

#### DISCUSSION

Until now, many researchers investigated the antioxidant properties of many species of lichens and some of them have very good antioxidant activity [37, 38, 39, 40]. Secondary metabolites that have been identified from various species of lichen extracts manifested high antioxidant activity [23, 24, 25].

Some metabolites of lichens in their structure contain phenolic groups which are considered to be a key element for the antioxidative efficiency [41]. Protolichesterinic acid (aliphatic  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactone) is the active substance which has been identified and isolated from lichens *C. islandica* and *C. aculeata*. It was shown that this substance exhibits antimicrobial activity against *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* [27] and antiproliferative activity towards three human cancer lines (MCF-7, HeLa and HCT-116), while did not exhibit free radical scavenging activity [42]. How are tested extracts of *C. aculeata* showed significant antioxidant activity which may be the result of high phenolic

Table 1. Total phenolic and total antioxidant capacity of the examined *Cetraria aculeata* extracts

Lichen species	Extracts	Total phenolic (mg GA/g)	Total antioxidant capacity (µg AA/g)
<i>Cetraria aculeata</i>	Methanol	80.8±0.79	91.52±0.34
	Ethyl acetate	64.12±0.58	71.5±0.29

Table 2. The antioxidant activity of the examined *Cetraria aculeata* extracts

<i>C. aculeata</i> extracts/ standards	<sup>a</sup> IC <sub>50</sub> (µg/mL)			
	DPPH scavenging activity	Inhibitory activity against lipid peroxidation	Metal chelating activity	Hydroxyl radical scavenging activity
Methanol	51.65±1.38	45.55±0.99	50.43±0.98	90.1±0.47
Ethyl acetate	41.4±0.94	38.55±0.76	40.55±0.93	79.4±0.65
Gallic acid	3.79±0.69	255.43±11.68	—	59.14±1.10
Ascorbic acid	6.05±0.34	> 1000	—	160.55±2.31
BHT	15.61±1.26	1.00±0.23	—	33.92±0.79
$\alpha$ -Tocopherol	—	0.48±0.05	—	—

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> values were determined by nonlinear regression analysis. Results are mean values±SD from three experiments.

Table 3. IC<sub>50</sub> values (means ± SD) of methanol extract of *C. aculeata* compared with methanol extract of *T. candida*, using the Student's t-test

IC <sub>50</sub> (µg/mL)	<i>Cetraria aculeata</i> methanol extract	<i>Toninia candida</i> methanol extract [40]	t-test
DPPH scavenging activity	51.65±1.38	51.45±1.78	n.s.
Inhibitory activity against lipid peroxidation	45.55±0.99	46.46±1.68	n.s.
Metal chelating activity	50.43±0.98	41.91±0.88	*
Hydroxyl radical scavenging activity	90.1±0.47	67.11±0.23	*

Data were analysed by Student's t-test. (\*  $p < 0.05$ ; n.s. not significant)

content. Future research of lichen *C. aculeata* can be focused to the identification and isolation of compounds on which depends the antioxidant activity of the tested extracts.

Previous studies have reported the antioxidant properties of aqueous extracts of *C. islandica* [43], but this is the first time to study the antioxidant activity of extracts *C. aculeata*.

These results showed that the methanol extract has a higher total phenolic content and total antioxidant capacity than the ethyl acetate extract. The high total phenolic content explains the strong antioxidant activity of *C. aculeata* assessed by the different systems. Recent study have been proved positive correlation between phenolic composition and antioxidant activity [44, 45]. Results of DPPH scavenging activity of ethyl acetate extract (41.4±0.94 µg/mL) shows a higher activity than methanol extract (51.65±1.38 µg/mL). Our study have shown that ethyl acetate extract of *C. aculeata* displayed a higher scavenging activity than the activity of methanol, chloroform and petrol ether extracts of *Toninia candida* [40]. Both tested extracts of *C. aculeata* showed higher scavenging activity compared to the methanol extracts of *Parmelia sulcata*, *Flavoparmelia caperata*, *Evernia prunastri* and *Cladonia foliacea*, while the methanol extract of *C. aculeata* showed the lower scavenging activity than the methanol extract of *Hypogymnia physodes* [46]. Significant antioxidant activity of extract of lichen *Hypogymnia physodes* arises from his lichen compounds (depsides, depsidones and usnic acid), which demonstrated strong antioxidant effects [24]. Phenol compounds are very important plant constituents because their hydroxyl groups contributed to their scavenging ability [47]. The results of inhibitory activity towards lipid peroxidation demonstrated that both tested

extracts exhibited significant inhibitory activity (45.55±0.99 µg/mL and 38.55±0.76 µg/mL for methanolic and ethyl acetate extracts), respectively. The metal chelating activity of ethyl acetate extract with an IC<sub>50</sub> value of 40.55±0.93 µg/mL displayed a higher chelating activity than methanol extract (IC<sub>50</sub> values of 50.43±0.98 µg/mL).

The ethyl acetate extract of *C. aculeata* showed stronger hydroxyl radical scavenging activity than the methanol extract of this lichen. While both tested extracts of *C. aculeata* showed similar hydroxyl radical scavenging activity with the examined extracts of *Umbilicaria cylindrica* [48] and lower scavenging activity than the examined extracts of *Toninia candida* [40]. The results of hydroxyl radical scavenging activity are significant and suggest that the methanol and ethyl acetate extracts of *C. aculeata* acting as primary antioxidants. The tested extracts of *C. aculeata* showed stronger antioxidant activity than the many other species of lichens [38].

Table 3 showed the IC<sub>50</sub> values (means±SD) of the methanol extract of *C. aculeata* compared with the methanol extract of *Toninia candida* [40]. Statistical analysis IC<sub>50</sub> values of the antioxidant potential of the methanol extracts of *C. aculeata* and *T. candida* [40] showed the existence of statistical significance in the metal chelating and hydroxyl radical scavenging activities.

## CONCLUSION

In conclusion, the results of our study showed that the tested extracts of *C. aculeata* demonstrated antioxidant activity. These results indicate the application of this lichen as source of natural antioxidants that could be

used as a possible food supplement, in the pharmaceutical industry and in the treatment of various diseases. The obtained results represent a good basis for a more detailed phytochemical examination of *C. aculeata*. Future research can be focused on the identification and isolation of the active components from *C. aculeata* and examination of their biological activities.

given by the Faculty of Medical sciences, University of Kragujevac.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the grants given by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia (grant no. 5251) and Junior Project (No. 2011/05)

## REFERENCES

- Halliwell B. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem Soc Symp.* 1995; 61:73-101.
- Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M, Ochi H. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J Agric Food Chem.* 1996; 44(1):37-41.
- Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the role of superoxide, peroxyxynitrite and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25(4-5):392-403.
- Yildirim A, Mavi A, Oktay M, Kara AA, Algur ÖF, Bilaloglu V. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf ex DC), sage (*Salvia triloba* L.) and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(10):5030-4.
- Huda-Faujan N, Norriham A, Norrakiah AS, Babji AS. Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. *Afr J Biotechnol.* 2009; 8(3):484-9.
- Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radical in Biology and Medicine.* Oxford: Clarendon Press; 1989.
- Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet* 1994; 344(8924):721-4.
- Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp.* 1995; 61:1-31.
- Robinson EE, Maxwell SR, Thorpe GH. An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Radic Res.* 1997; 26(3):291-302.
- Sangameswaran B, Balakrishnan BR, Deshraj C, Jayakar B. In vitro antioxidant activity of roots of *Thespesia lampas* Dalz and Gips. *Pak J Pharm Sci.* 2009; 22(4):368-72.
- Büyükkokuroğlu ME, Gülçin İ, Oktay M, Küfrevioğlu Öİ. In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacol Res.* 2001; 44(6):491-4.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad of Sci U S A.* 1993; 90(17):7915-22.
- Pietta P, Simonetti P, Mauri P. Antioxidant activity of selected medicinal plants. *J Agric Food Chem.* 1998; 46(11):4487-90.
- Yen GC, Hsieh CL. Antioxidant activity of extracts from *Du-Zhong* (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation in vitro. *J Agric Food Chem.* 1998; 46(10):3952-57.
- Wichi HP. Enhanced tumor development by butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastro-intestinal tract. *Food Chem Toxicol.* 1986; 24(10-11):1127-30.
- Grice HC. Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chem Toxicol.* 1988; 26(8):717-23.
- Souri E, Amin G, Farsam H, Jalalizadeh H, Barezi S. Screening of thirteen medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Iran J Pharm Res.* 2008; 7(2):149-54.
- Rechner AR, Kuhnle G, Bremmer P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol and Med.* 2002; 33(2):220-35.
- Zhang WM, Li B, Han L, Zhang HD. Antioxidant activities of extracts from areca (*Areca catechu* L.) flower, husk and seed. *Afr J Biotechnol.* 2009; 8(16):3887-92.
- Eisenreich W, Knispel N, Beck A. Advanced methods for the study of the chemistry and the metabolism of lichens. *Phytochem Rev.* 2011; 10(3):445-56.
- Devi GK, Anantharaman P, Kathiresan K, Balasubramanian T. Antimicrobial activities of the lichen *Roccella belangeriana* (Awasthi) from mangroves of Gulf of Mannar. *Indian J Geomarine Sci.* 2011; 40(3):449-53.
- Shukla V, Joshi GP, Rawat MSM. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochem Rev.* 2010; 9(2):303-14.

23. Manojlović N, Ranković B, Kosanić M, Vasiljević P, Stanojković T. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine* 2012; 19(13):1166-72.
24. Ranković B, Kosanić M, Manojlović N, Rančić A, Stanojković T. Chemical composition of *Hypogymnia physodes* lichen and biological activities of some its major metabolites. *Med Chem Res.* 2014; 23(1):408-16.
25. Kosanić M, Ranković B, Stanojković T, Rančić A, Manojlović N. *Cladonia* lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *LWT - Food Sci Technol.* 2014; 59(1):518-25.
26. Hidalgo ME, Fernández E, Quilhot W, Lissi E. Antioxidant activity of depsides and depsidones. *Phytochemistry* 1994; 37(6):1585-7.
27. Türk AÖ, Yılmaz M, Kivanç M, Türk H. The Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cetraria aculeata* and its protolicheterrinic acid constituent. *Z Naturforsch C.* 2003; 58(11-12):850-4.
28. Zeytinoglu H, Incesu Z, Tuylu BA, Turk AO, Barutca B. Determination of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic potential of the extract from lichen *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. in vitro. *Phytother Res.* 2008; 22(1):118-23.
29. Singleton V, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999; 299:152-78.
30. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem.* 1999; 269(2):337-41.
31. Takao T, Kitatani F, Watanabe N, Yagi A, Sakata K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci Biotech Biochem.* 1994; 58(10):1780-83.
32. Kumarasamy Y, Byres M, Cox PJ, Jaspars M, Nahar L, Sarker SD. Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytother Res.* 2007; 21(7):615-21.
33. Hsu CK, Chiang BH, Chen YS, Yang JH, Liu CL. Improving the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) sprout with trace element water. *Food Chem.* 2008; 108(2):633-41.
34. Carter P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Anal Biochem.* 1971; 40(2):450-58.
35. Yan LY, Teng LT, Jhi TJ. Antioxidant properties of Guava fruits: comparison with some local fruits. *Sunway Acad J.* 2006; 3:9-20.
36. Hinneburg I, Dorman HJD, Hiltunen R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem.* 2006; 97(1):122-29.
37. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Determination of antioxidative potential of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. *LWT - Food Sci Technol.* 2006; 39(1):80-5.
38. Gulluce M, Aslan A, Sokmen M, Sahin F, Adiguzel A, Agar G, et al. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine* 2006; 13(7):515-21.
39. Ranković B, Ranković D, Kosanić M, Marić D. Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Anaptychia ciliaris*, *Nephroma parile*, *Ochrolechia tartarea* and *Parmelia centrifuga*. *Cent Eur J Biol.* 2010; 5(5):649-55.
40. Manojlović NT, Vasiljević PJ, Mašković PZ. Chemical composition and antioxidant activity of lichen *Toninia candida*. *Rev Bras Farmacogn.* 2012; 22(2):291-98.
41. Marković ZS, Manojlović NT. Analytical characterization of lichexanthone in lichen: HPLC, UV spectroscopic, and DFT analysis of lichexanthone extracted from *Laurera benguelensis* (Mull. Arg.) Zahlbr. *Monatsh Chem.* 2010; 141(9):945-52.
42. Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, Piovano M, Garbarino JA, Nicoletti M, et al. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study. *Phytother Res.* 2013; 27(3):431-7.
43. Gülçin İ, Oktay M, Küfrevioğlu Öİ, Aslan A. Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79(3):325-9.
44. Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* 2006; 94(4):550-7.
45. Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Optimization of culture conditions for lichen *Usnea ghattensis* G. awasthi to increase biomass and antioxidant metabolite production. *Food Technol Biotechnol.* 2009; 47(1):7-12.
46. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Tošić S, Stanković M, Radojević I, et al. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *Int J Mol Sci.* 2011; 12(8):5428-48.
47. Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, et al. Effect of interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull.* 1989; 37(8):2016-21.
48. Manojlović NT, Vasiljević PJ, Mašković PZ, Jušković M, Bogdanović-Dušanović G. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 1-8.

**ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST LIŠAJA CETRARIA ACULEATA**

Tomović J.<sup>1</sup>, Rančić A.<sup>1</sup>, Vasiljević P.<sup>2</sup>, Mašković P.<sup>3</sup>, Živanović S.<sup>4</sup>, Manojlović N.<sup>1</sup>, Sovrlić M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

<sup>2</sup> Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija

<sup>3</sup> Agronomski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Čačak, Srbija

<sup>4</sup> Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu, Niš, Serbia

**SAŽETAK**

Cilj ovog istraživanja je da se odrede antioksidantna svojstva lišaja *Cetraria aculeata* koji raste u Srbiji. Antioksidativna aktivnost metanolnog i etilacetatnog ekstrakta lišaja je testirana različitim metodama: određivanje ukupnog fenolnog sadržaja, određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta, aktivnosti slobodnih radikala DPPH, inhibitorna aktivnost prema lipidnoj peroksidaciji, sposobnost vezivanja ferio jona i aktivnost hidrosil radikala. Ekstrakti lišaja *C. aculeata* pokazali su značajnu antioksidativnu aktivnost. Metanolni ekstrakt je pokazao veće vrednosti za ukupne fenole i ukupni antioksidativni kapacitet u odnosu na etilacetatni ekstrakt, dok je etilacetatni ekstrakt pokazao bolje rezultate za aktivnosti DPPH radikala, inhibitornu aktivnost prema lipidnoj peroksidaciji, sposobnost i aktivnosti hidrosil radikala nego metanolni ekstrakt. Ovo je prvi prikaz antioksidativnih svojstava vrste *Cetraria aculeata*. Rezultati antioksidativne aktivnosti ukazuju na primenu ovog lišaja kao izvora prirodnih antioksidanata koji se mogu koristiti kao mogući dodatak ishrani, u farmaceutskoj industriji i u lečenju različitih bolesti.

**Ključne reči:** ROS, antioksidativna aktivnost, lišaj, *Cetraria aculeata*.