



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

**Јовица М. Томовић**

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

**Докторска дисертација**

**Крагујевац, 2018.**

**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. Биосинтетички 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 (HPLC).....	35
1.7. Ултразубичаста/видљива (UV/VIS) 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 анализа екстраката.....	50
3.5. Испитивање антиоксидативне активности екстраката.....	50
3.5.1. Одређивање укупног антиоксидативног капацитета.....	51
3.5.2. Одређивање неутрализације DPPH <sup>•</sup> радикала.....	52
3.5.3. Одређивање способности неутралисања OH <sup>•</sup> 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. Ћелијске линије.....	57
3.6.2. Експериментални дизајн.....	58
3.6.3. МТТ тест.....	58
3.7. Статистичка обрада података.....	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>Physcia 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>Physcia semipinnata</i> .....	73
4.2. Одређивање укупног фенолног и флавоноидног садржаја у екстрактима лишајева <i>Cladonia subulata</i> , <i>Pleurosticta acetabulum</i> и <i>Physcia 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 врсте лишаја <i>Pleurosticta acetabulum</i> .....	80
4.2.3. Укупни феноли и флавоноиди у испитиваним екстрактима врсте лишаја <i>Physcia semipinnata</i> .....	81
4.3. Антиоксидативне активности екстраката <i>Cladonia subulata</i> , <i>Pleurosticta acetabulum</i> и <i>Physcia 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>Phycia 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 HSD</i> 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>

# **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 проکاریотској 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).

Веgetативно 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 viseћи 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 (секударни 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 настају сваку површину ако има довољно светлости и влаге. Распрострањеност лишајева условљена је различитим еколошким чиниоцима и природним и антропогеним. 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 арктичке јединке сматра да су старе и преко хиљаду година. У хладним областима су лишајеви најбројнији и заузимају читава 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 прашице који испуштају већина домова као и велики део индустрије. Фински научник William Nylander приметио је 1866. године осиромашење лишажске флоре, а 1896. године нестанак лишажева са стабала у Луксембуршком парку у Паризу. Закључио је да је узрок нестанка лишажева штетне материје у ваздух 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 лишажева према процени квалитета ваздуха је последица њене биологије. Повећана концентрација штетних материја у лишажевима може довести до нарушавања симбиозе између фотобионта и микобионта и одумирања лишажја. Тако, присуство лишажја у неком пределу говори о чистоћи његовог ваздуха. Различите врсте лишажева су различито осетљиве на одређене загађиваче ваздуха. На тај начин осетљивије врсте лишажева могу се користити за праћење стања у екосистемима где су присутне одређени загађивачи ваздуха (19). На сличан начин лишажеви се могу користити и у мониторингу здравствених проблема код људи (20). Лишајеви као биониндикатори загађености ваздуха најбоље су се показали за детекцију сумпор диоксид ( $\text{SO}_2$ ). На основу промена у лишажевима 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 лишажу су: деградација хлорофила, промене у морфологији талуса, промене у размножавању, поремећаје у биосинтетским путевима, промене у фотосинтези и у структури самих лишажјних заједница. Широки спектар варијабилних одговора се користи за мерење физиолошког одговора лишажева 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 лишажева нестала доживела поновну реколонизацију заједнице лишажева (21-22). Помоћу лишажева 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 биониндикаторске улоге примена лишажева 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 парадепсиди 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>Cladina rangiferina</i>	Користи се у виду декокта код прехладе, артритиса, грознице, жутице, затвора, конвулзије, кашља и туберколозе (31,35).
<i>Cladina 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 туберколозе, 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 зарастање рана и лечења инфекција (42).
<i>Cetraria islandica</i>	Користи се највише за ублажавање проблема са плућима и дигестивним трактом али и за плућне туберкулозе, 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 производи). 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 метаболитички 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:  $\beta$ -каротен 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 метаболитички 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 бисинтетског 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 хидрат који се ослобађа и преноси 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

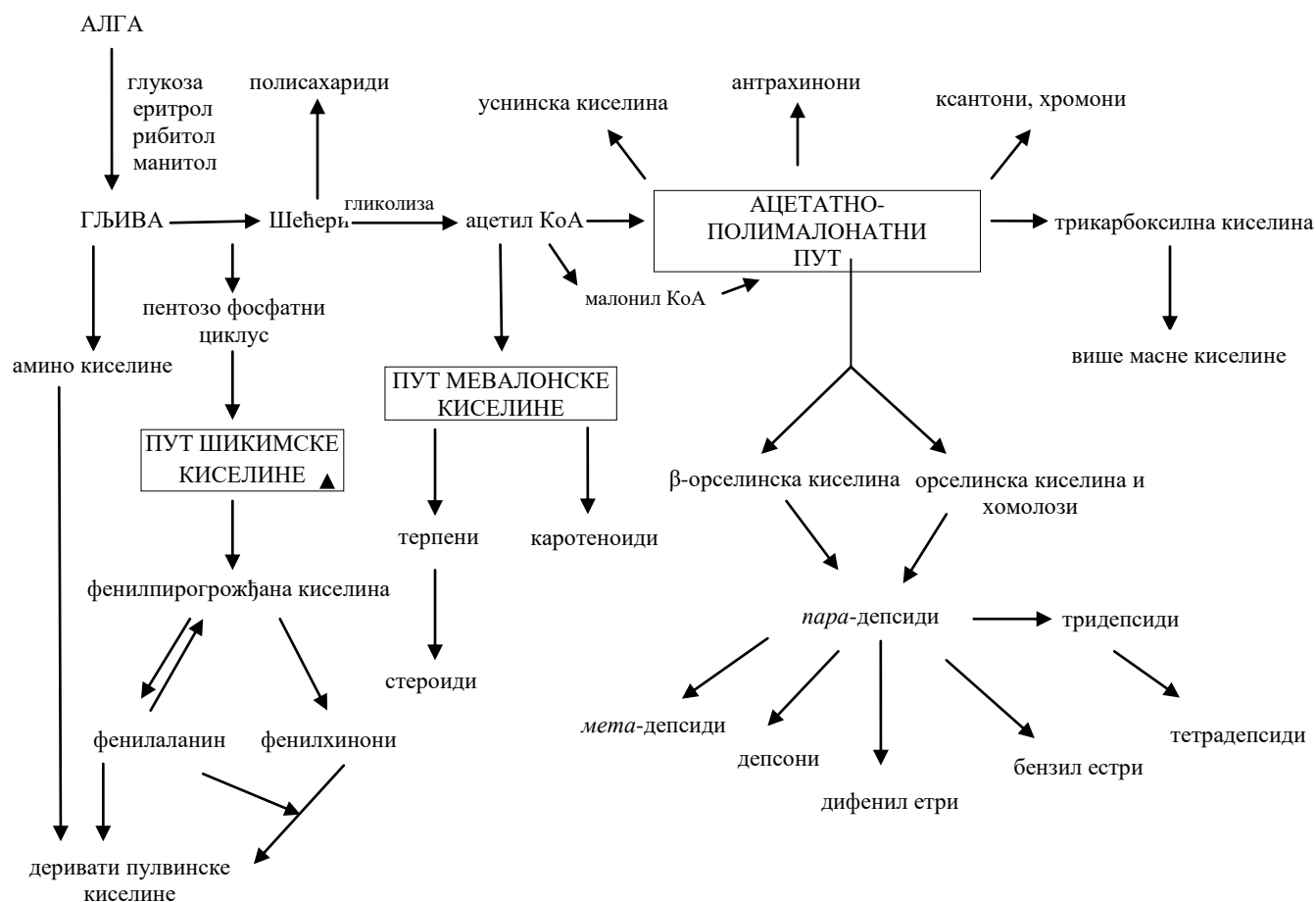


кортексу. Док *Xanthoparmelia* садржи кристале уснинске киселине, род *Neofuscelia* се одликује присуство меланина као кортикалног пигмента. Штавише други припадници породице *Parmeliaceae* садрже искључиво атранорин у кортексу. Секундарни метаболити нису апсолутно неопходни за раст и преживљавање лишајева. Међутим, они су корисни при заштити талуса од раличитих 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. Биосинтетички путеви секундарних метаболита лишајева

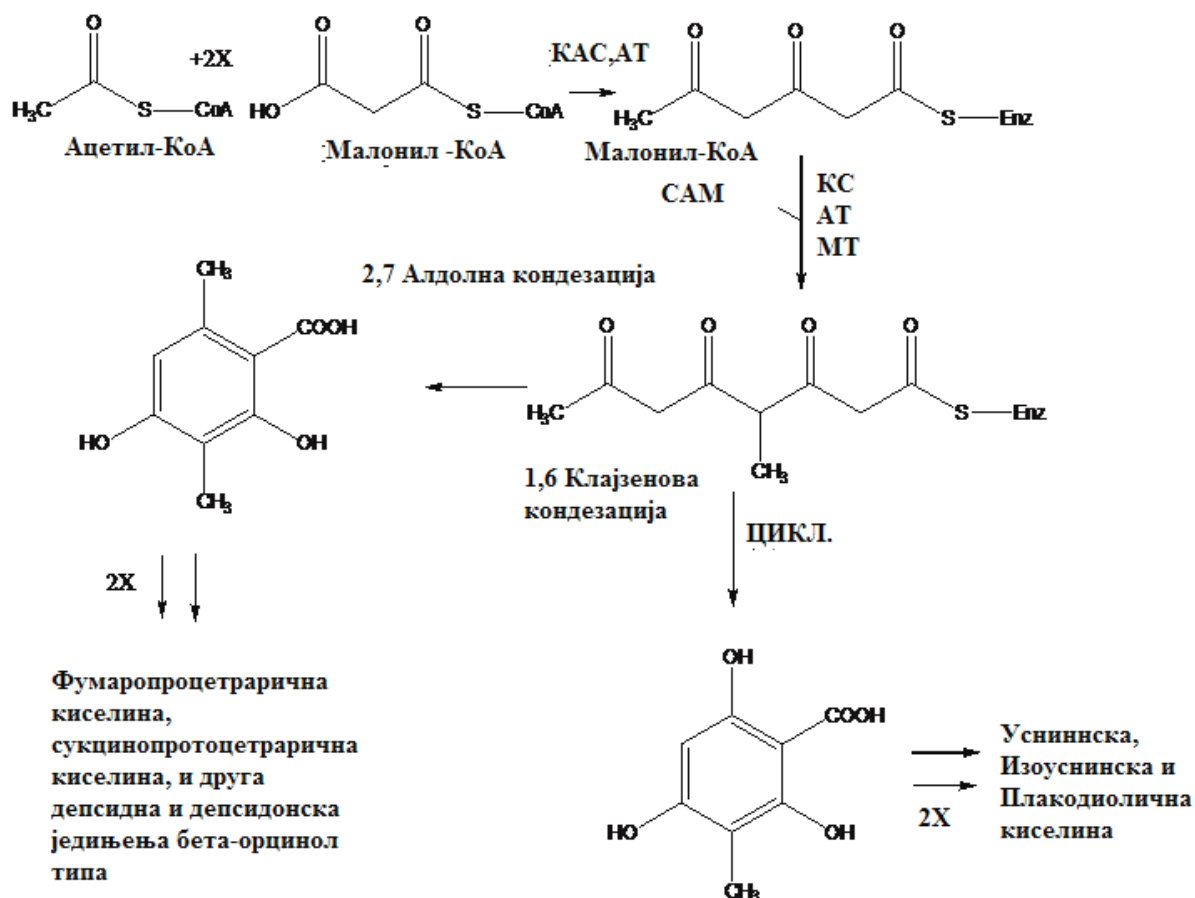
Карактеристика метаболизма секундарних биомолекула је врло висока сложеност биосинтетских путева, који су више-фазни и укључују велики број ензима, мултиензимских система, регулатора ових ензима и њихову ћелијску организацију (58). Главни биосинтетички путеви секундарних метаболита лишајева су:

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
  - Ксанотони
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 С-С 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).

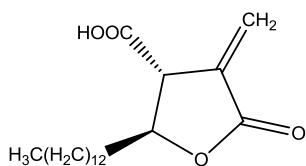
Најчешће јединице фенолних киселина које се добијају ацетатно-полималонатним путем, а које су одговорне за формирање карактеристичних супстанци у одређеним лишајевима, деле се у два типа: јединице орцинол типа и  $\beta$ -орцинол типа. Једињења формирана од ова два типа јединица су слична на много начина, 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

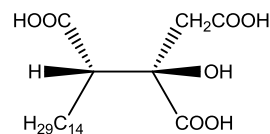
сличне јединице. На пример карбоксилна киселина једне јединице је повезана преко хидрокси хрупe у *пара* положају у односу на карбоксилну киселину друге јединице. Таква врста естерификације доводи до настанка *пара*-депсида. Естерификација још једне јединице доводи до настанка тридепсида. Ако се у естру 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

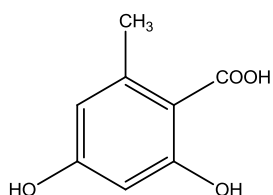


(+)-Протолихестеаринска киселина

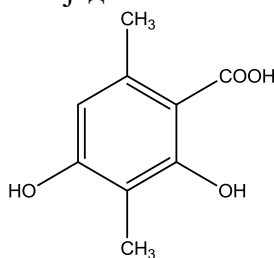


Розалинска киселина

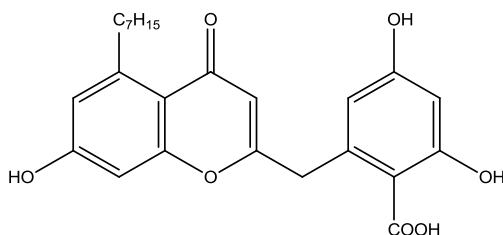
Мононуклеарна фенолна једињења



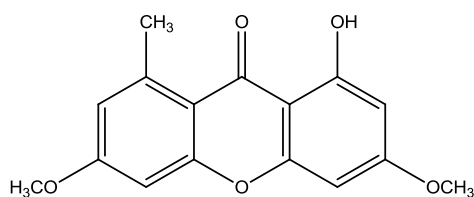
Орселинска киселина



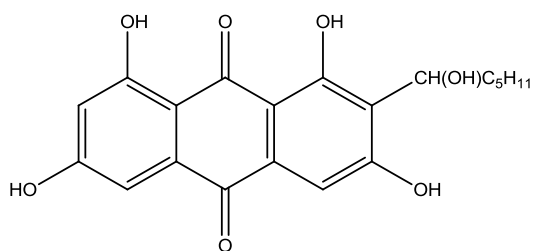
$\beta$ -орселинска киселина



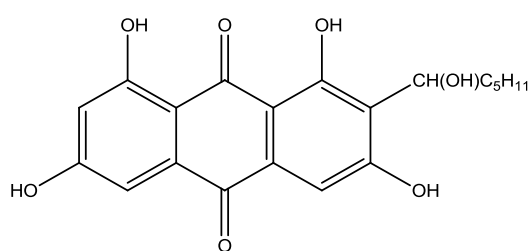
Хромон  
Сифулин



Ксантон  
Лихексантон

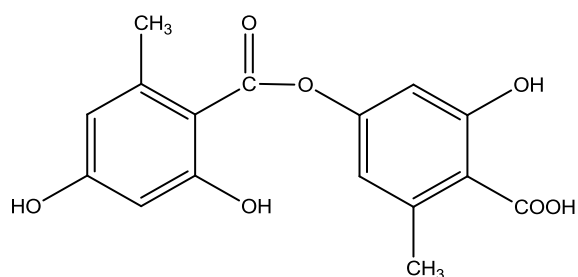


Нафтахинон  
Хемавентозин

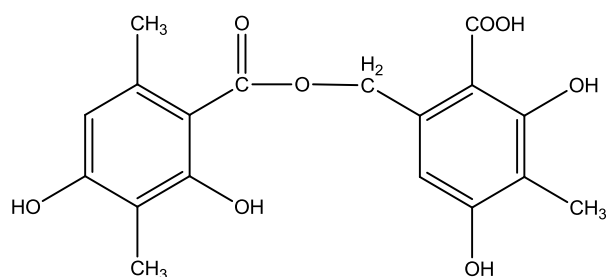


Антрахинон  
Аверитрин

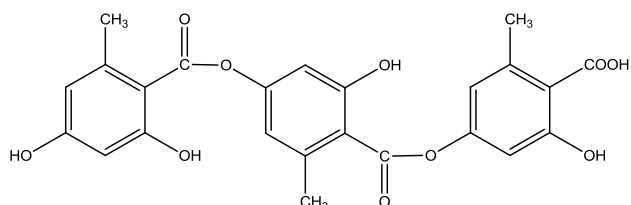
Слика 3. Структуре секундарних метаболита лишајева који настају преко ацетатно-полималонатног биосинтетског пута изведених из једног поликетидног ланца



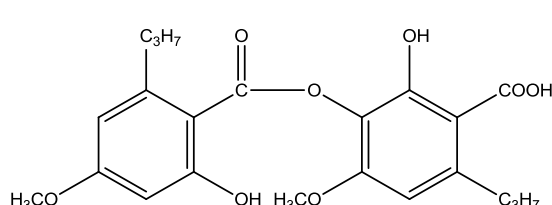
Пара-депсид  
Леканорна киселина



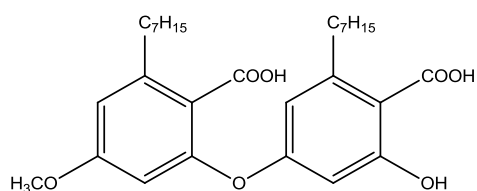
Бензил-естар  
Алекториалична киселина



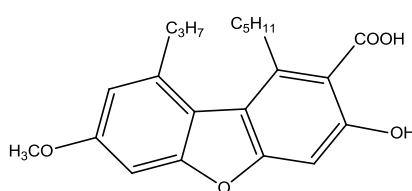
Тридепсид  
Гирофорна киселина



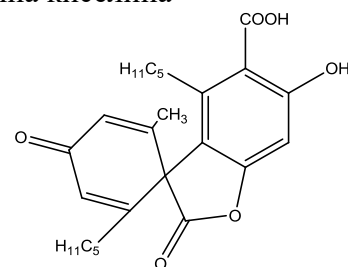
Мета-депсид  
Секикаишна киселина



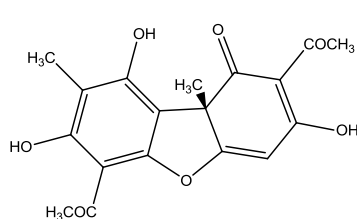
Дифенил-етар  
Микареична киселина



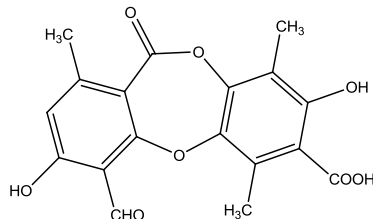
Дибензофуран  
Дидимска киселина



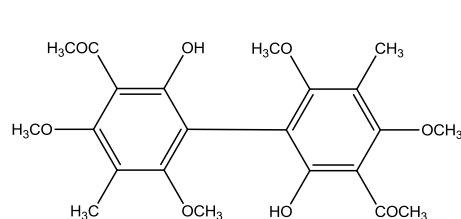
Депсон  
Пикролихенинска киселина



Уснинска киселина



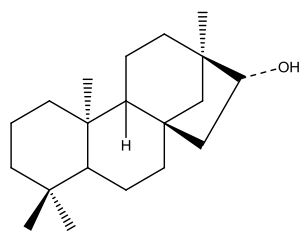
Депсидон  
Виренска киселина



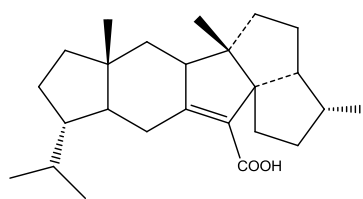
Бифенил  
Контортин

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

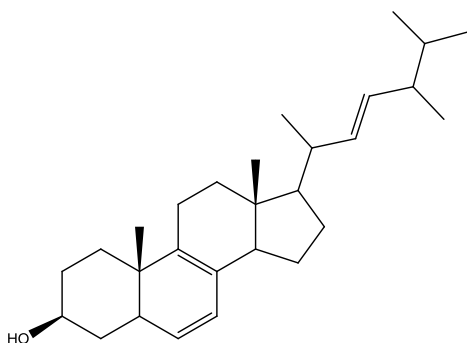
Једињења која настају биосинтетичким путем преко мевалонске киселине подразумевају механизам који укључује ацетил коензим А. Кондензацијом два молекула ацетил-*CoA*, помоћу ензима ацетил-*CoA* ацетилтрансферазе настаје ацетоацетил-*CoA*. Кондензацијом ацетоацетил-*CoA* с једним молекулом ацетил-*CoA*-2-хидрокси-2-метил-глутарил-*CoA*, 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.



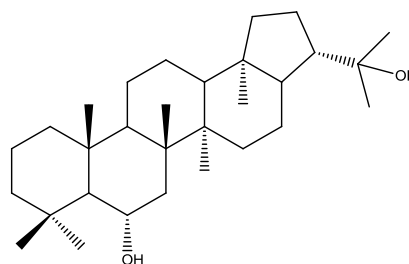
Дитерпен  
16α-хидроксикауран



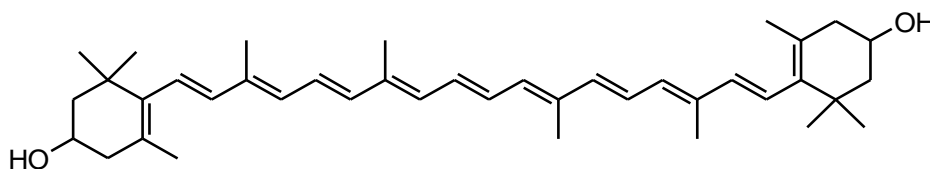
Сесквитерпен  
Ретигеранинска киселина



Стероид  
Ергостерол



Тритерпен  
Зеорин



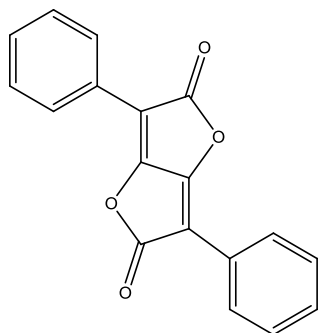
Каротеноид  
Зеаксантин

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

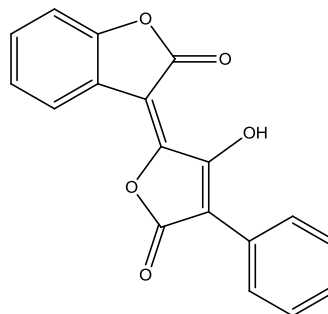
Терфенилхинони и деривати пулвинске киселине су примери секундарних метаболита лишајева који настају биосинтетским путем преко шикимске киселине. Родови лишајева који су најпознатији по продукцији деривата пулвинске киселине припадају фамилији *Stictaceae*. Главна карактеристика фамилије лишајева *Stictaceae* 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

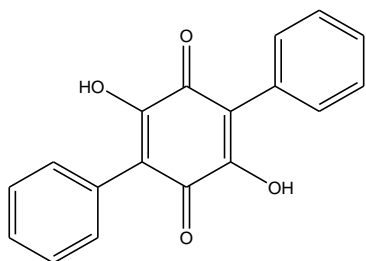


Пулвин дилактон

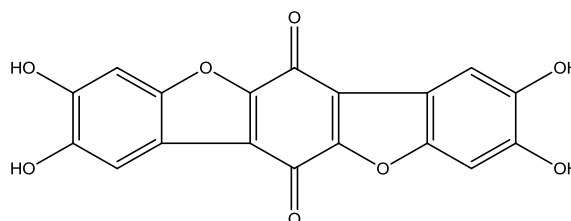


Калицин

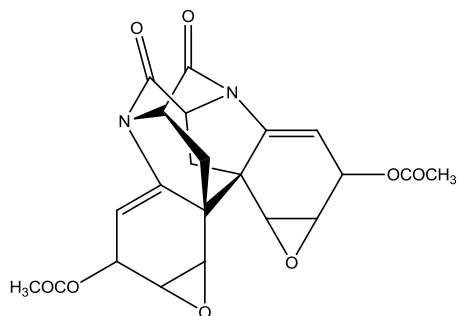
Терфенилхинони



Полипорична киселина



Телефорична киселина



Дериват аминокиселине  
Скаброзин-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 добијања у већој количини и чистоћи који ће бити довољни за структурна одређивања и фармаколошка испитивања (61). Секундарни метаболити лишајева испољавају антимикубно, антиоксидативно, антиинфламаторно, антитуморско, аналгетско, антипиретско, 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 *invitro* 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 оксидационог 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 концентрацијама 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 одрамбени систем (68). Међутим, под утицајем различитих ендогених и егзогених фактора може доћи до нарушавања равнотеже између ћелијских система који производе слободне радикале и оних који одржавају антиоксидативне одрамбене механизме и до феномена који се зове оксидативни стрес (69).

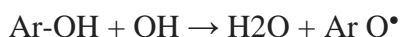
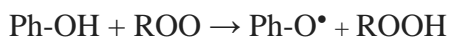
Оксидативни стрес представља штетан процес који може да доведе до појаве низа патолошких стања. Оксидативни стрес може изазвати низ хроничних и дегенеративних болести код човека као што су: кардиоваскуларна и неуродегенеративна обољења, алзхеимерова болест, болести атеросклерозе, емфизема, хемокроматозе, 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 организма. 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 организма (82-83).

### 1.5.1.3. Антиоксидативна активност екстраката лишајева

Лишајеви су се показали као добар извор антиоксиданата и пуно литературних података говори у корист томе. Већина публикација описује антиоксидативне активности екстраката 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 *Iamamoto* и сар. (84). Након тога, *Alslan* је истраживао антиоксидативну активност метанолских екстраката *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  $\mu\text{g/ml}$  (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 врсте *Cetraria islandica*, *Lecanora atra*, *Parmelia pertusa*, *Pseudevernia furfuracea* и *Umbilicaria cylindrica* су показале 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 малигнух 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 хлорофомске, 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 лишајски екстракт 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 количинама 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*, *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 употребљава за санирање спољашњих рана и опекотика а користи се у виду мелема. Молекул уснинске киселине представља бензофуран или дихидробензофуран садржи фенолне, хидроксилне групе, и двострукте везе у дихидроароматичном прстену. Антибиотско деловање уснинске киселине зазива 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 изолвана из *Ramalina celastri*

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

*Vijayakumar* је показао да уснинска киселина изолвана из *Roccella 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 β-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 *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 облику 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 фумаропротоцетраринска 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 (фолиозан) 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 *Elix JA.* и *Lumbsch HT.*

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, 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 *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  $\mu\text{m}$ . 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 adscendensa* 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 culuarus* 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 *Phycia semipinnata* испољавају значајан ниво антиоксидативне активности.
4. Испитивани екстракти лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Phycia semipinnata* испољавају значајан ниво антитуморске активности.
5. Због испољене антиоксидативне и антитуморске активности, екстракти испитиваних лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Phycia 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  $\alpha$ -токоферол су производи од стране компаније *Sigma-Aldrich GmbH*, Sternheim, Germany. Растварачи коришћени у високоефикасној течном хроматографској анализи 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 екстракта

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 лишајева 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 су у тамним стакленим бочицама и коришћени за даља испитивања.

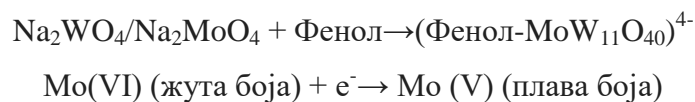
### 3.4. Испитивање хемијског састава екстраката

#### 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

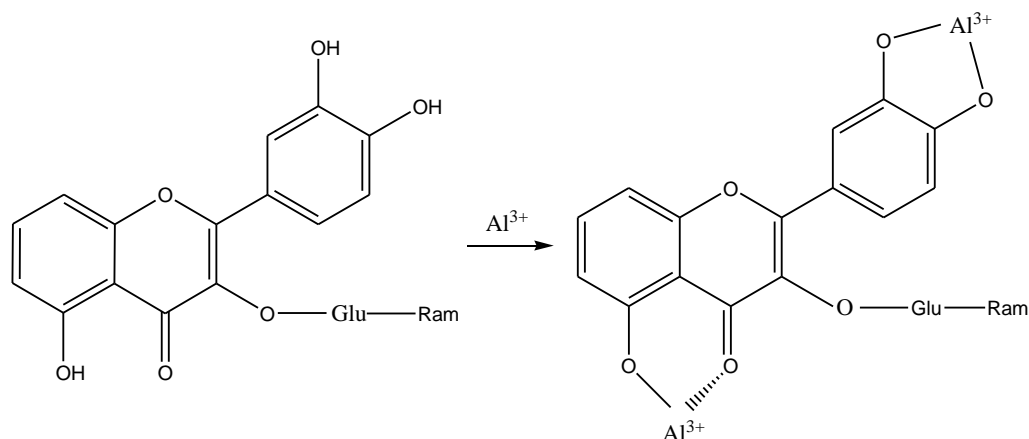
*Поступак*

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 концетрацији. 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

Високоефикасна 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 реагенсе 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

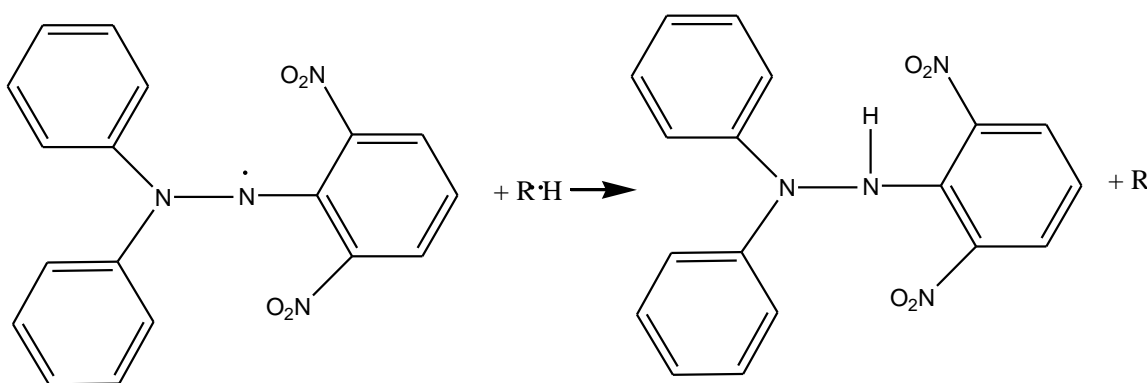
Одређивање способности неутрализације DPPH• (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) радикала анализира се применом спектрофотометријске методе (152). DPPH• је стабилан слободни радикал са делокализованим слободним електроном на азоту, тако да молекул не формира димере, као што би био случај са већином других 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 екстракта да делују као донори 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. Моћ неутралисања DPPH• радикала биће израчуната преко формуле 1:

#### 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• су затим помешани у односу 3 ml раствора DPPH• 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:

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

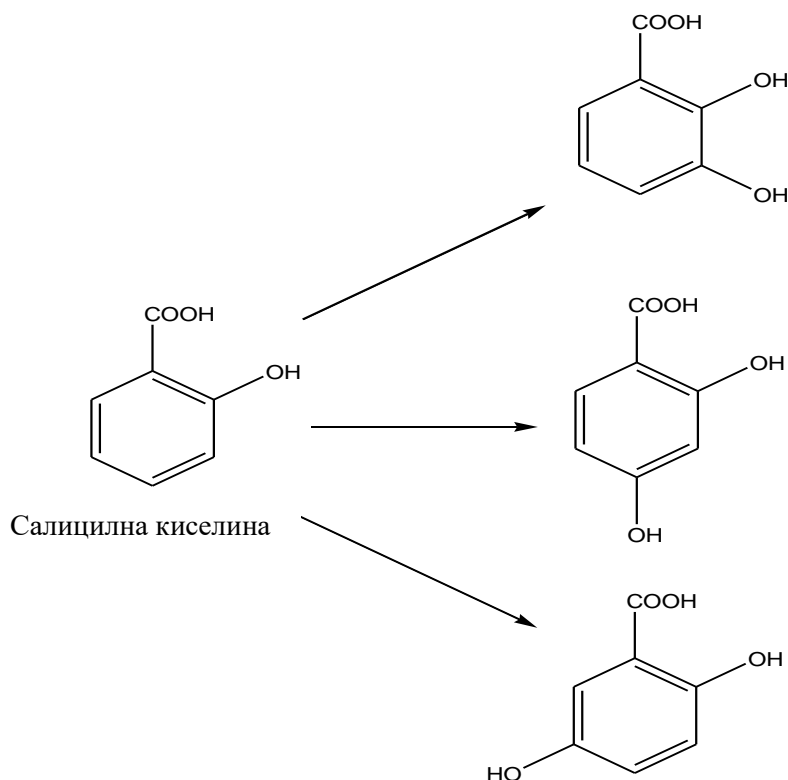
где је  $A_k$ - апсорбанца контролног раствора (негативне контроле),  $A_s$ - апсорбанца раствора узорка или стандарда.

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• 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• радикала**

Да би се одредила способност екстраката за неутралисање генерисаних OH• 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• 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 један 1 ml екстракта или стандарда различитих концетрација (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 хидроксиливаног салицилата је мерена на (односно одсуство хидроксилованог комплекса) је мерена на 562 nm. Процент инхибиције се израчунава према једначини:

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

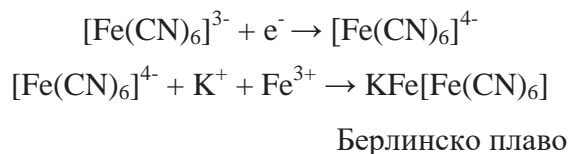
где је  $A_0$  апсорбанца контроле (сви реагенси осим узорка или стандарда уместо њихове запремине додат метанол),  $A_1$  апсорбанца у присуству екстракта или стандарда, и

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 Оуаизу-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)]

Трихлорсирћетна киселина

Гвожђе (III) хлорид FeCl<sub>3</sub>

Фосфатни пуфер (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + KH<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 M, pH 6.6) и са 2,5 ml калијум ферицијанида

(1%). Смеша је инкубирана 20 минута на температури од 50 °C. Затим је смеши додато 2,5 ml трихлор сирћетне киселине и вршено је центрифугирање смеше на 3000 rpm 10 минута. После центрифугирања одвојила су се два слоја. Узима се 2,5 ml горњи слој (супернатанта) дода се 2,5 ml дестиловане воде и 0,5 ml гвожђе три хлорида. Апсорбанца раствора је мерена на 700 nm на спектрофотометру насупрот слепој проби. Слепа проба садржи све 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 ± 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 реагенци*

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 узорака 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 узорака екстраката (концентрација двоструких разблажења) са 0,2 ml емулзије линолеинске киселине (25 mg/ml у 99 % етанолу) и 0,4 ml фосфатног пуферс (50 mM, pH=7.4). Затим се смеша инкубира у мраку 72 h на температури од 40 °C. 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:

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

при чему је  $A_k$  апсорбанца контроле, која се припрема као и узорци, само што се уместо испитиваног раствора додаје иста запремина етанола, а  $A_s$  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 метанолних екстраката врста лишајева : *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 лишајева 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 пеницилина, 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

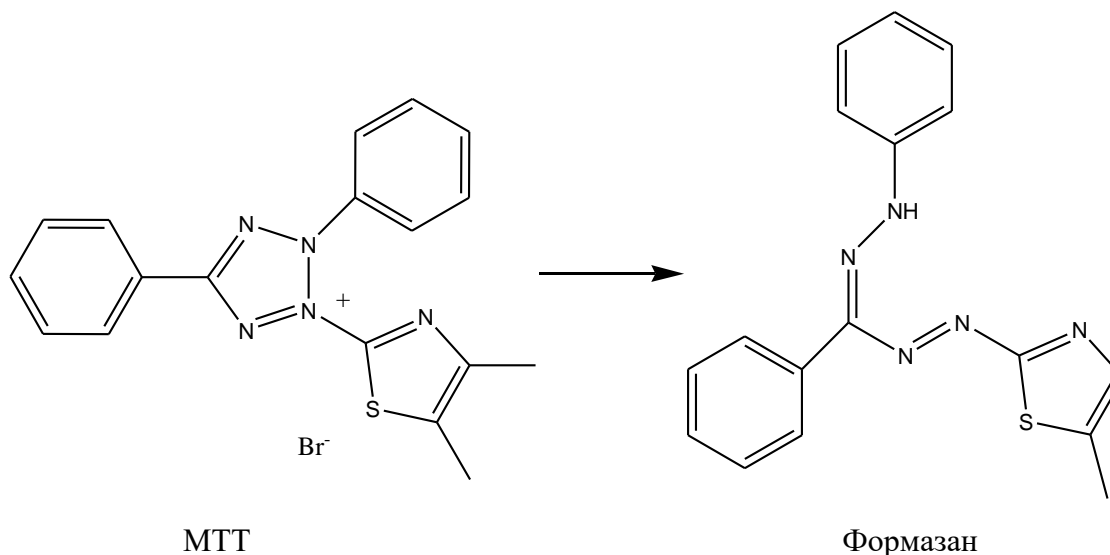
Испитивана једињења се најпре растворе у DMSO-у, до шток концентрације од (100 mg/ml). Након тога, једињења се са медијумом за култивацију ћелија разблажују до радних концентрација. Финалне концентрације испитиваних једињења биће: 200, 75, 25, и 10 µg/ml. Као контрола користи се хранљиви медијум.

Ћелије се засејавају у стерилне плоче за култивацију ћелија са 96 бунарчића. Густина ћелија по бунару у плочи за испитивање цитотоксичног ефекта екстраката лишајева била је  $2 \times 10^4$  у 100µl хранљивог медијума, док су ћелије у плочи за испитивање цитостатичног ефекта екстраката лишајева сађене у густини  $0,5 \times 10^4$  по бунару, такође у по 100µl хранљивог медијума. Ћелије су инкубиране 24 часа у атмосфери zasiћеној воденом паром на 37°C и са 5 % CO<sub>2</sub>. Након 24 h у бунарчиће је додавана одговарајућа концентрација испитиваних екстраката лишајева. 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 инкубиране са испитиваним екстрактима лишајева, као и контролама наредних 24 h а након тога је урађен МТТ тест вијабилности. У тесту пролиферације (цитостатичности) ћелије су инкубиране са испитиваним екстрактима лишајева, као и контролама 72 h, након чега је урађен МТТ тест пролиферације. Негативну контролу чиниле су ћелије које су инкубиране у хранљивом медијуму док је као позитивна контрола ћелијама додат 5-флуороурацил за HeLa ћелије и cis-диаминдихлороплатина за LS174 ћелије.

### 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, нерасторног 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 формазана

#### 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>C, обојени кристали формазана су растворени су 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:

$$\% \text{ вијабилности/пролиферације екстраката} = \frac{\text{вредности апсорбанце третираних ћелија са екстрактом или позитивне контроле}}{\text{вредност апсорбанце негативне контроле}} \times 100$$

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 лишајева. 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 екстраката, 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.

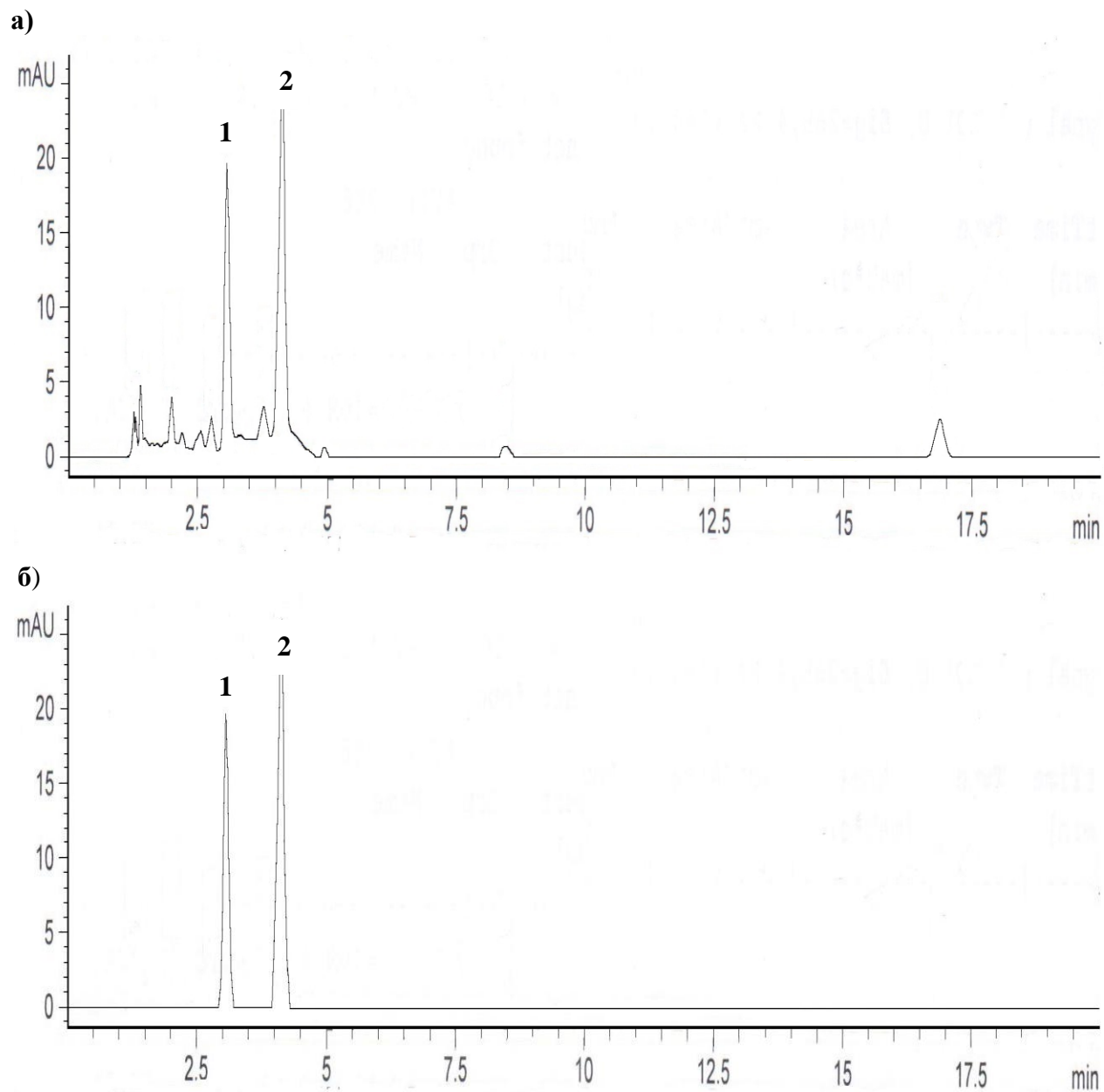
#### **4.1. *HPLC-UV* анализа екстраката лишаја *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata***

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***

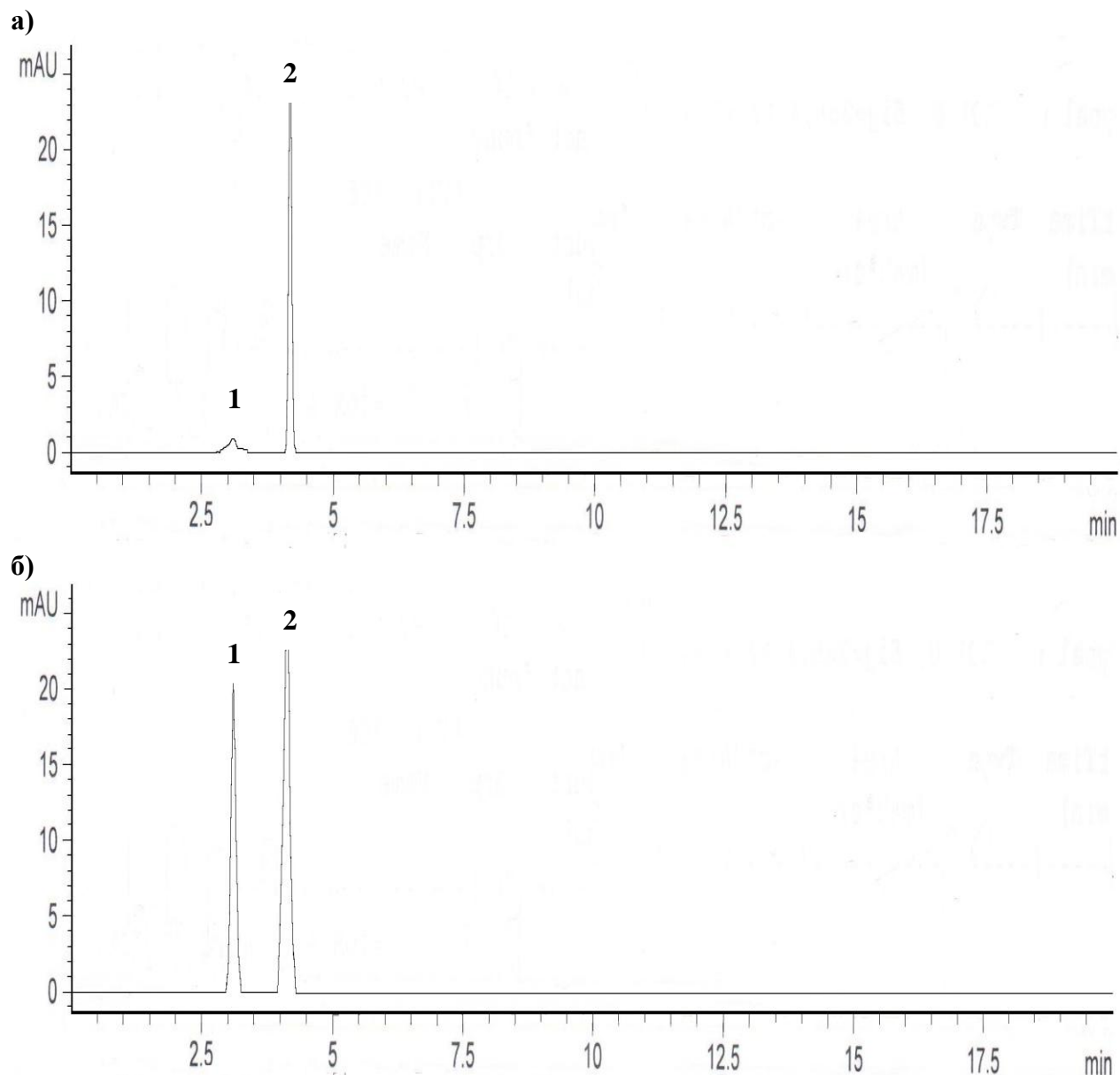
На сликама 14 и 15 приказани су *HPLC* хроматограми ацетонских и метанолских екстраката лишаја *Cladonia subulata* и стандардних супстанци снимљени на 254 nm. Резултати *HPLC* анализе ових екстраката лишаја *Cladonia subulata* указује на присуство два метаболита: хипопротоцетраринске киселине ( $t_R = 3,10 \pm 0,20$  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 интезитет 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);

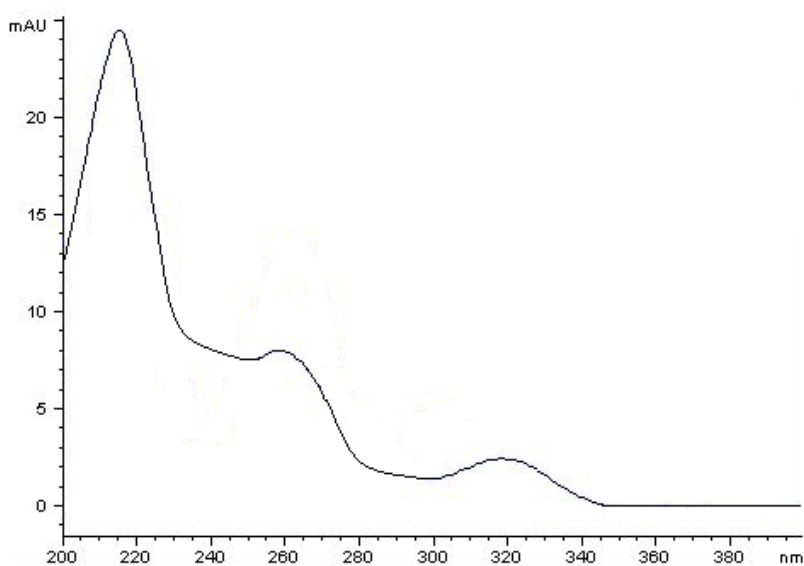




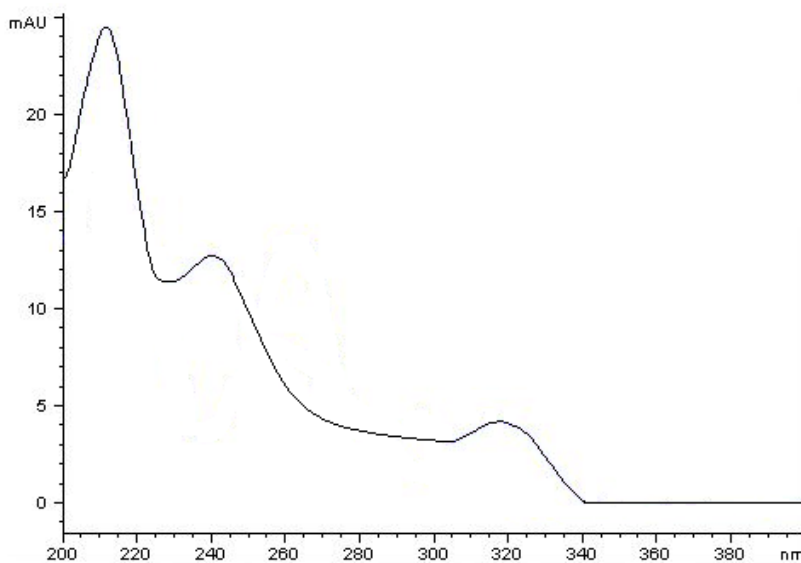
**Слика 15.** а) *HPLC* хроматограм метанолског екстракта врсте лишаја *Cladonia subulata* снимљен на 254 nm б) *HPLC* хроматограм смеше стандардних супстанци снимљен на 254 nm. 1=хипопротоцетраринска киселина ( $t_R = 3,10 \pm 0,20$  min); 2=фумаропротоцетраринска ( $t_R = 4,14 \pm 0,10$  min);

На сликама 16 и 17 приказани су *UV* спектри хипопротоцетраринске киселине и фумаропротоцетраронске киселине. Анализом *UV* спектра (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.



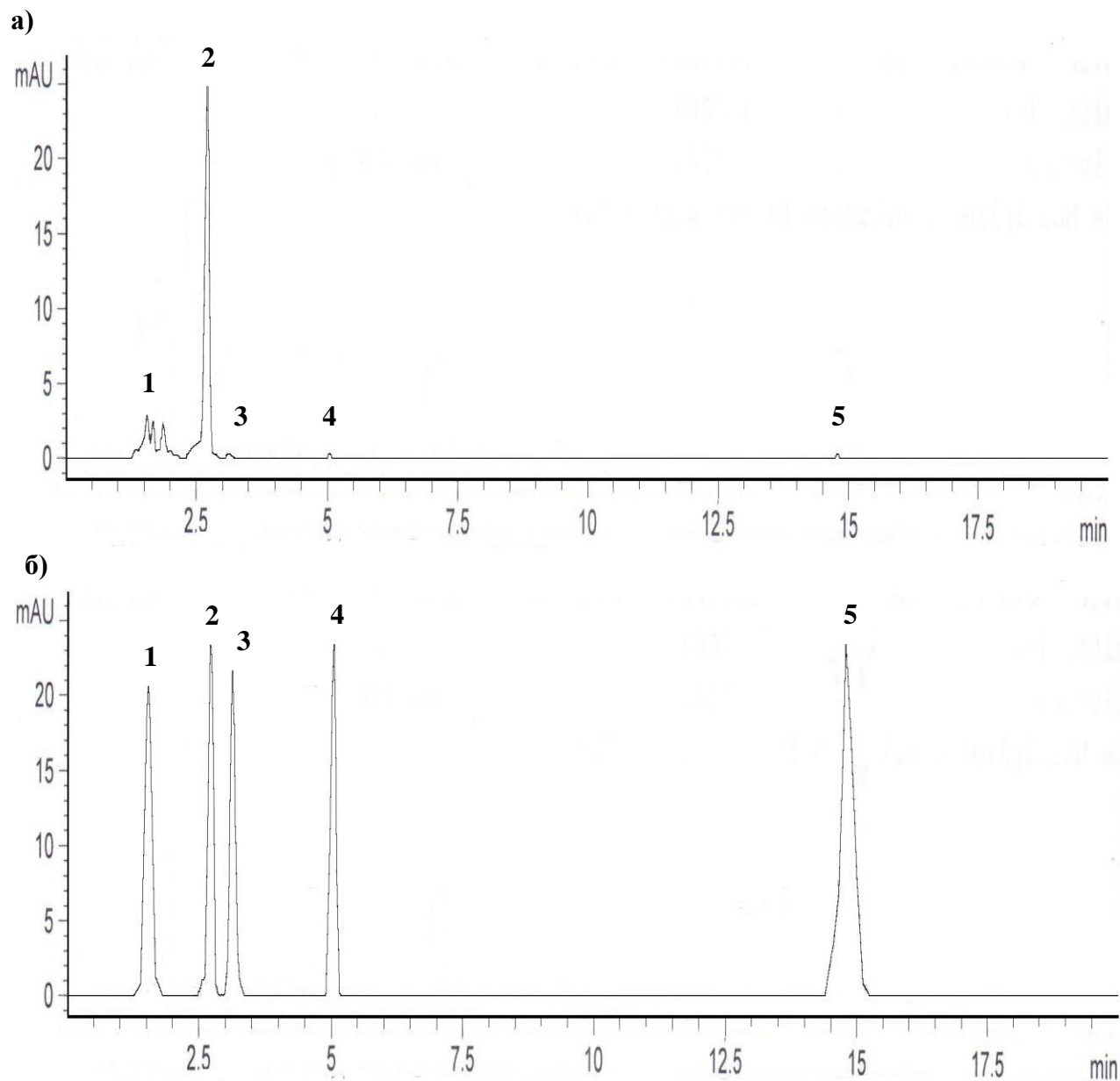
**Слика 16.** *UV* спектар хипопротоцетраринске киселине са апсорпционим максимумима на 216, 258 и 320 nm



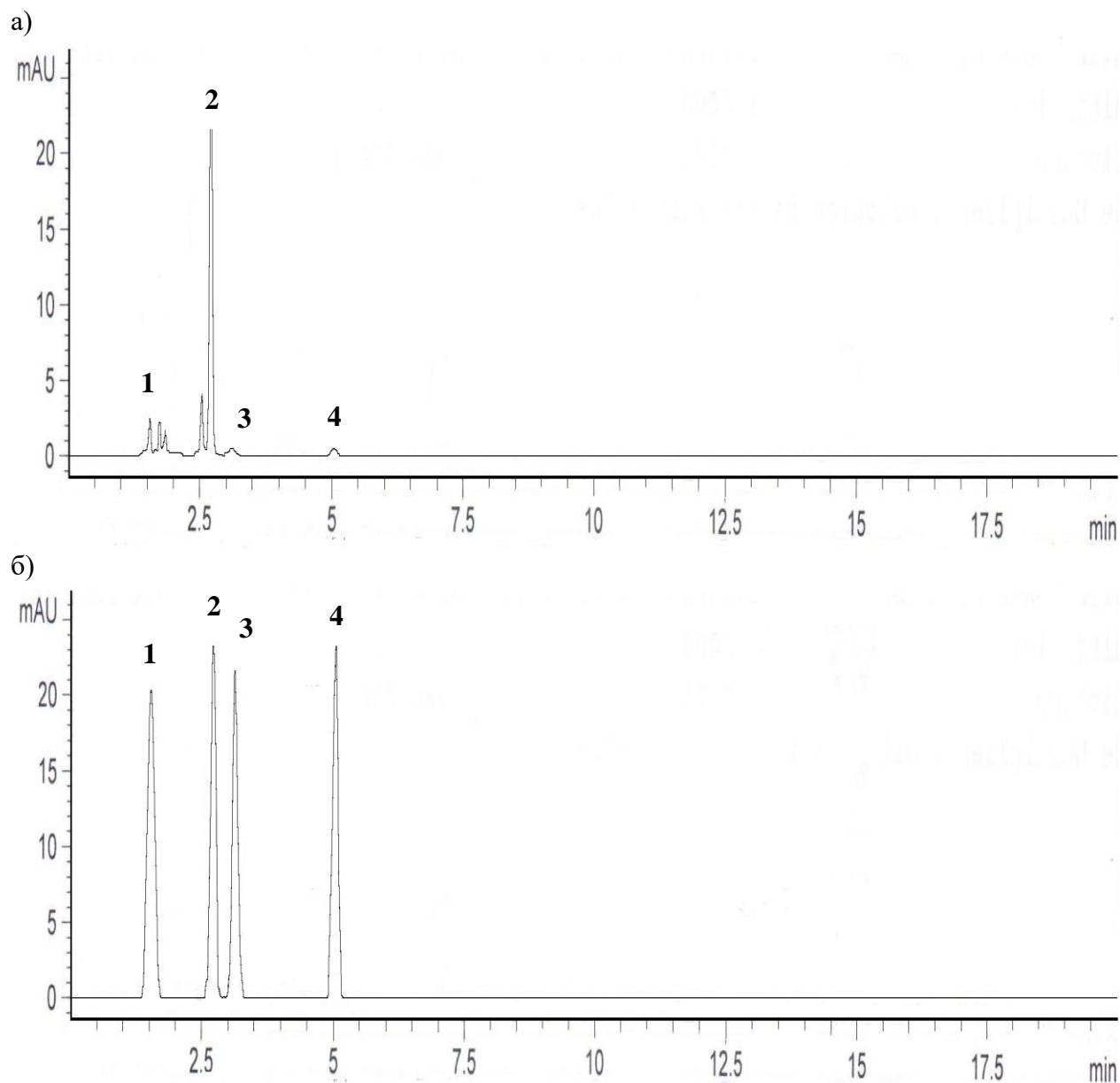
**Слика 17.** *UV* спектар фумаропротоцетраринске киселине са апсорпционим максимумима на 212, 240 и 318 nm

**4.1.2. HPLC-UV анализа екстракта 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.



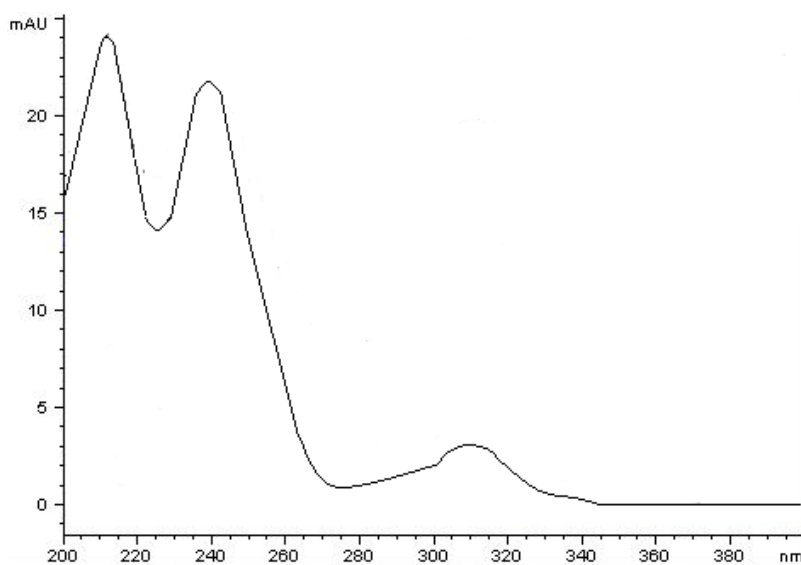
**Слика 18.** а) *HPLC* хроматограм ацетонског екстракта врсте лишаја *Pleurosticta acetabulum* снимљен на 254 nm б) *HPLC* хроматограм смеше стандардних суптанци снимљен на 254 nm, 1= салазинска киселина ( $t_R = 1,56 \pm 0,20$  min); 2= норстихнинска киселина ( $t_R = 2,70 \pm 0,10$  min); 3= протоцетраринска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



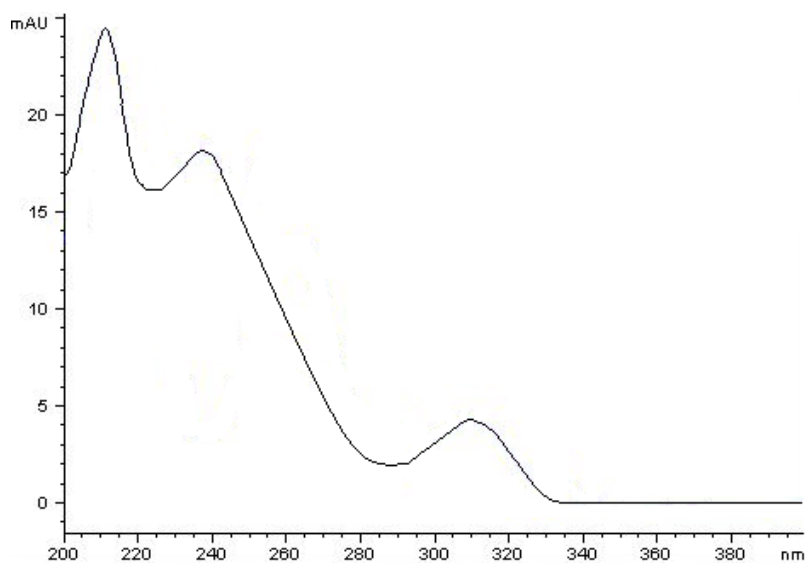
**Слика 19.** а) *HPLC* хроматограм метанолског екстракта врсте лишаја *Pleurosticta acetabulum* снимљен на 254 nm б) *HPLC* хроматограм смеше стандардних супстанци снимљен на 254 nm. 1= салазинска киселина ( $t_R = 1,56 \pm 0,20$  min); 2= норстихнинска киселина ( $t_R = 2,70 \pm 0,10$  min); 3= протоцетраринска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

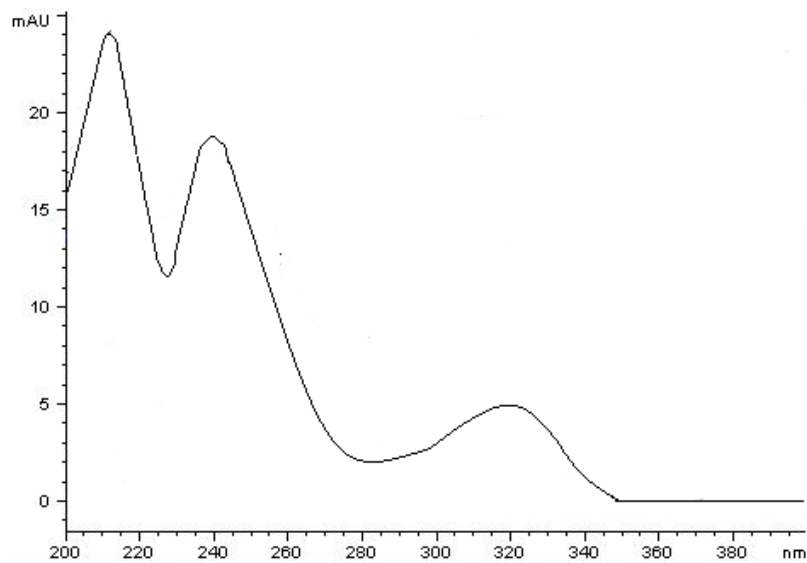
*acetabulum* (норстихнинске киселине, салазинске киселине, протоцетраринске киселине, евернијске киселине и атранорин). *UV* спектар норстихнинске киселине има три апсорпциона максимума на таласним дужинама: 212, 239 и 310 nm. *UV* спектри салазинске киселине (са апсорпционим максимумима на 213, 238 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.



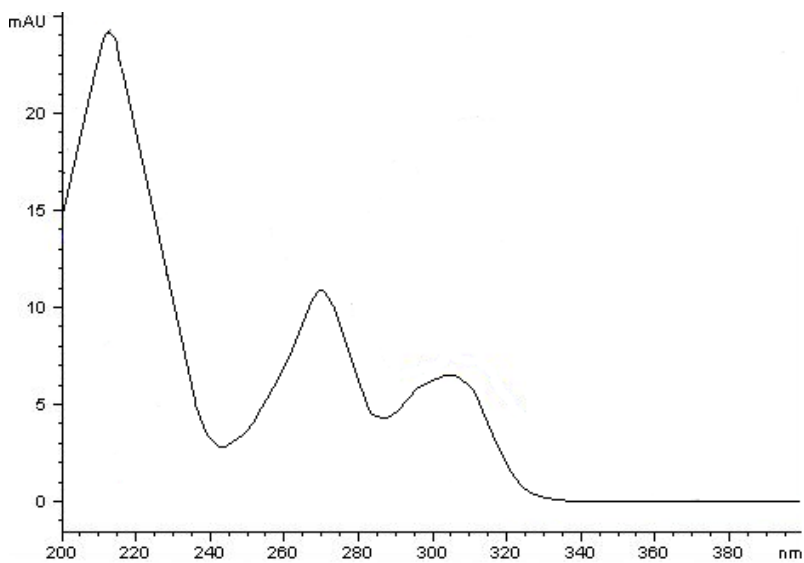
**Слика 20.** *UV* спектар норстихнинске киселине са апсорпционим максимумима на 212, 239 и 310 nm



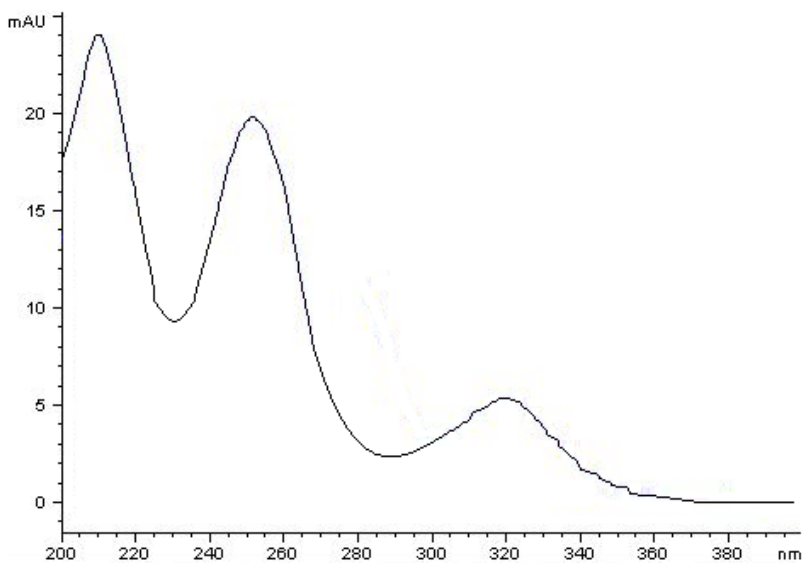
Слика 21. UV спектар салазинске киселине са апсорпционим максимумима на 213, 238 и 312 nm



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

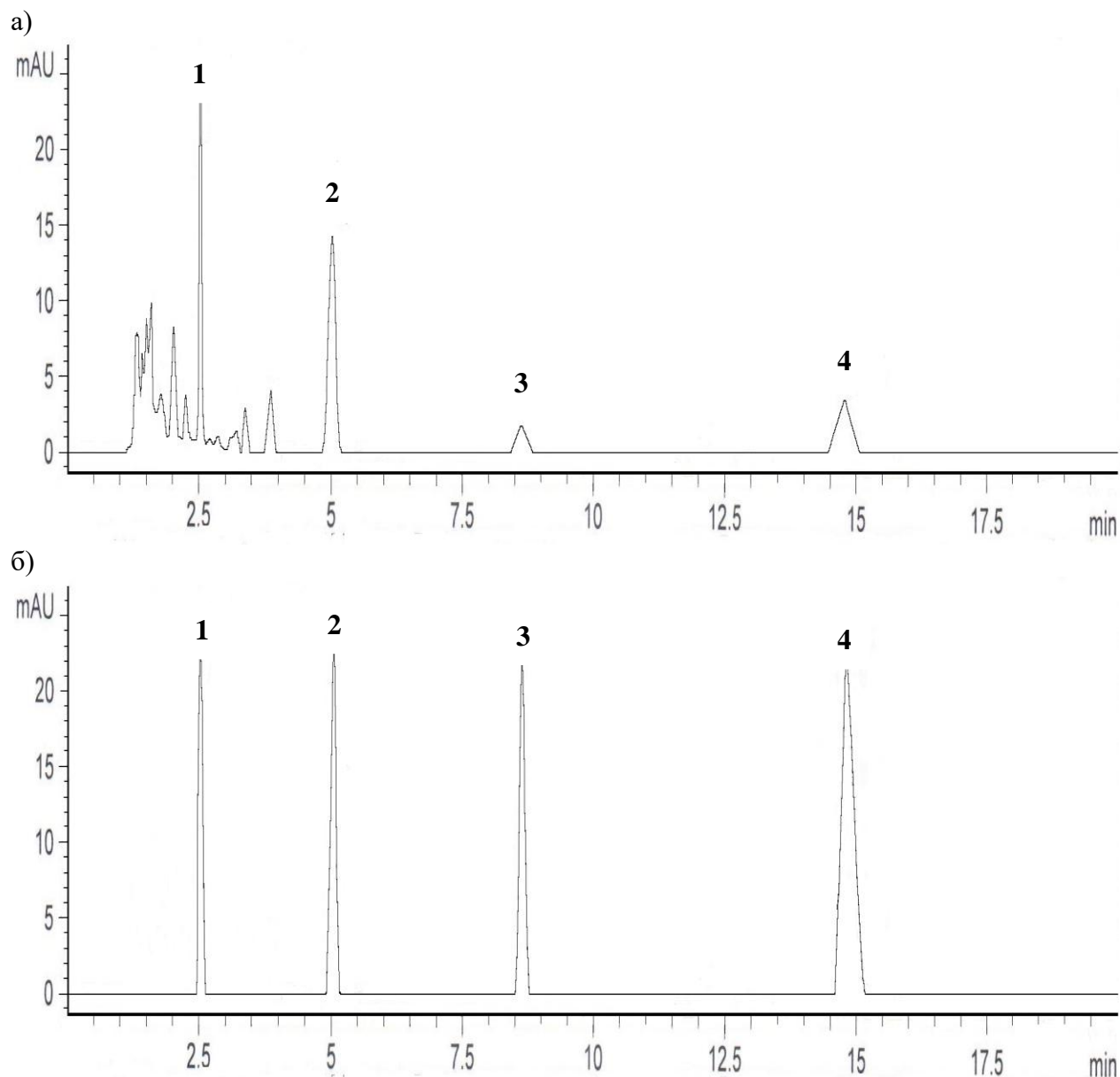


Слика 24. UV спектар атранорина са апсорпционим максимумима на 210, 252 и 321 nm

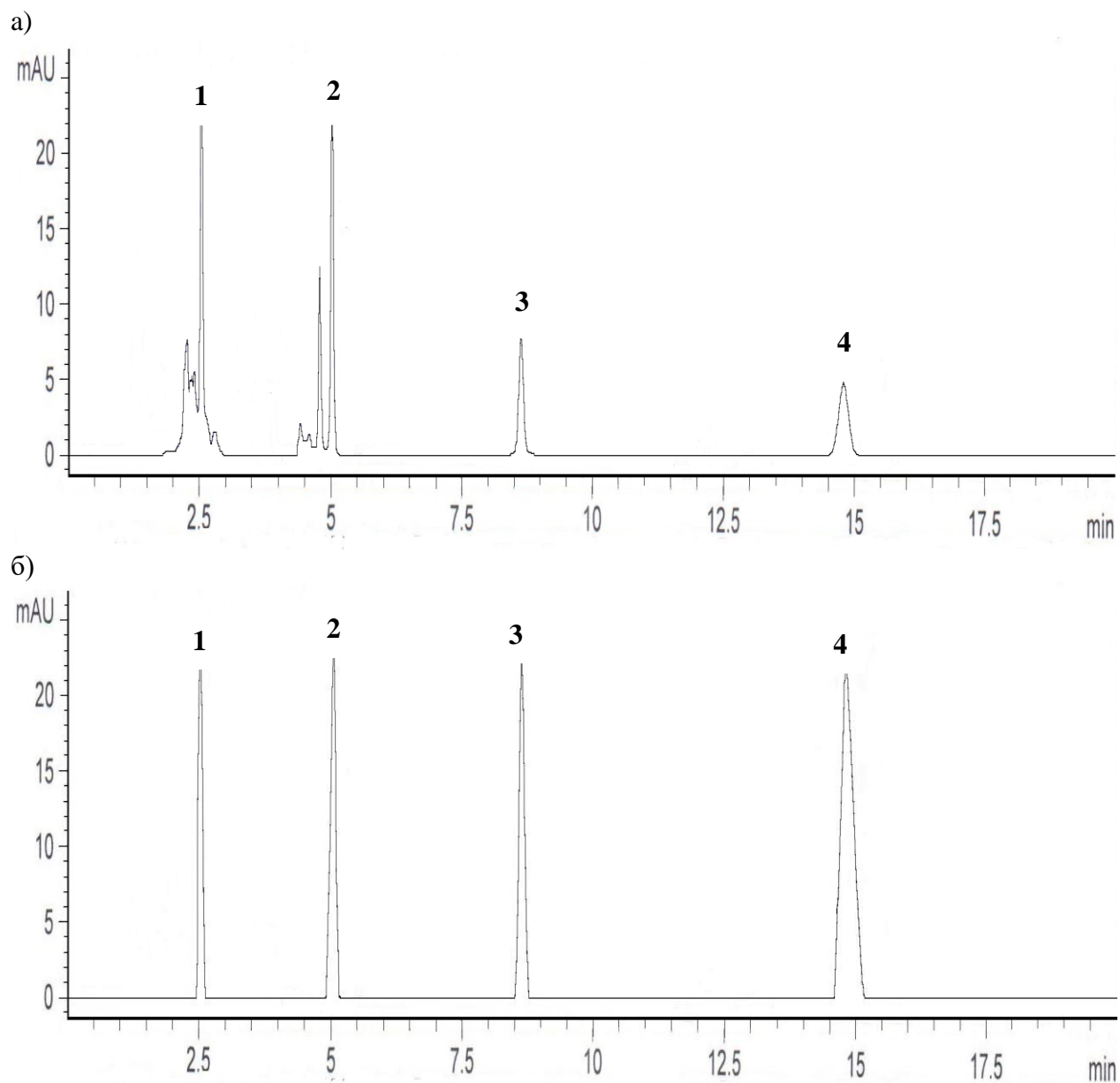


#### 4.1.3. HPLC-UV анализа екстраката врсте лишаја *Physcia semipinnata*

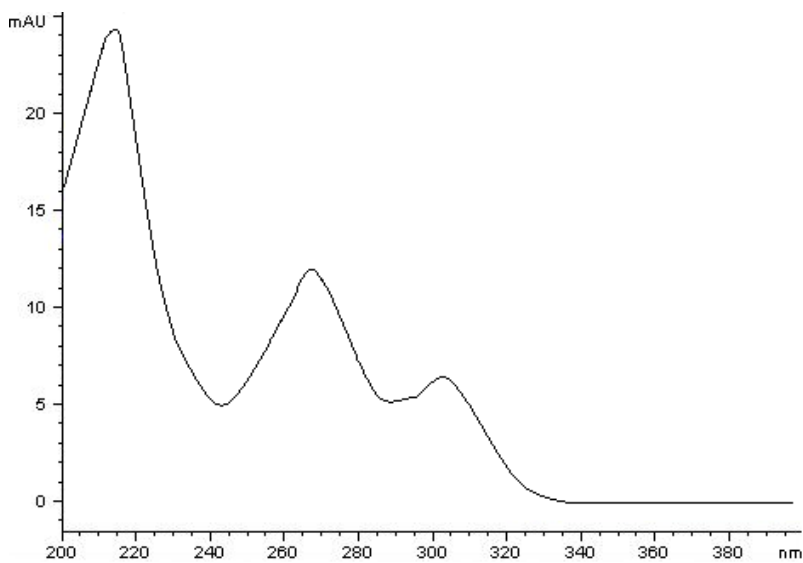
На сликама 25 и 26 приказани су HPLC хроматограми испитиваних екстраката лишаја *Physcia semipinnata* и стандардних супстанци снимљени на 254 nm. У HPLC хроматограмима и ацетонског и метанолског екстракта идентификовани су исти метаболити. Најдоминатнији пикови у ацетонском и метанолском екстракту налазе 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 овим 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 ( $\lambda = 200\text{--}400\text{nm}$ ). 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: 33,1190 %, евернијска киселина 38,8091 %, обтусинска киселина: 9,3992 %. и атранорина 14,5436 %. 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*.



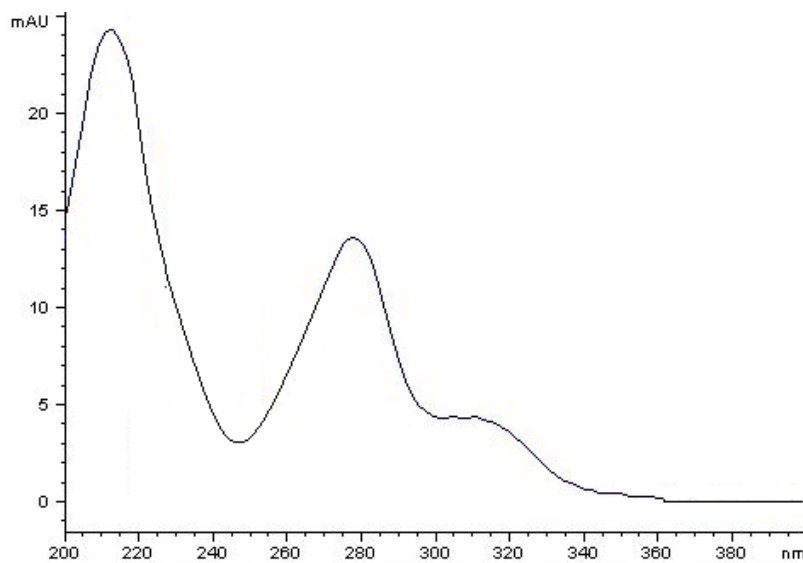
**Слика 25.** а) *HPLC* хроматограм ацетонског екстракта врсте лишаја *Phycia semipinnata* снимљен на 254 nm б) *HPLC* хроматограм смеше стандардних супстанци снимљен на 254 nm 1= леканорна киселина ( $t_R = 2,50 \pm 0,10$ ); 2= евернијска киселина ( $t_R = 5,08 \pm 0,10$ ); 3= обтусинска киселина (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

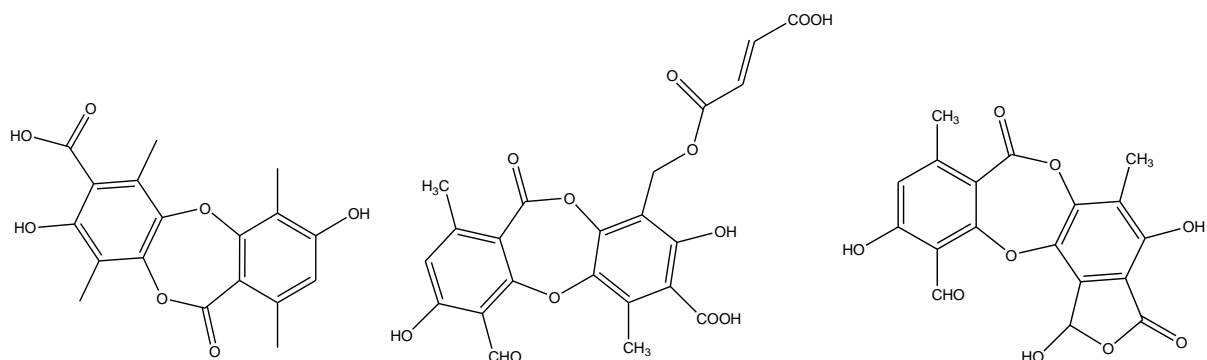


**Слика 27.** UV спектар леканорне киселине са три апсорпциона максимума на таласним дужинама 216, 268 и 308 nm



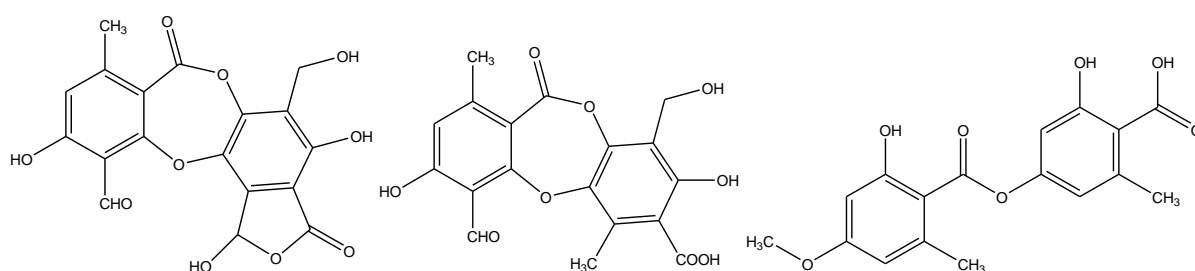
**Слика 28.** UV спектар обтусинске киселине има три апсорпциона максимума на таласним дужинама 212, 278 и 312 nm

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



Хипопротоцетаринска кис. Фумаропротоцетаринска кис.

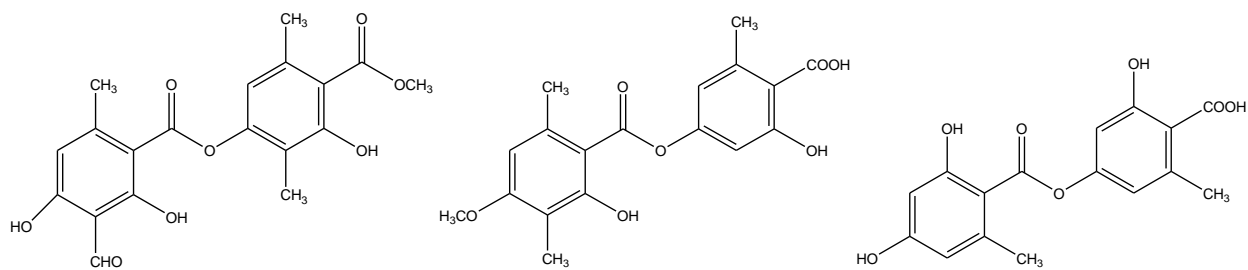
Норстихнинска кис.



Салазинска кис.

Протоцетаринска 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±0,51 mg RU/g) показао већи флавоноидни садржај од метанолског (8,48±0,57. mg RU/g).

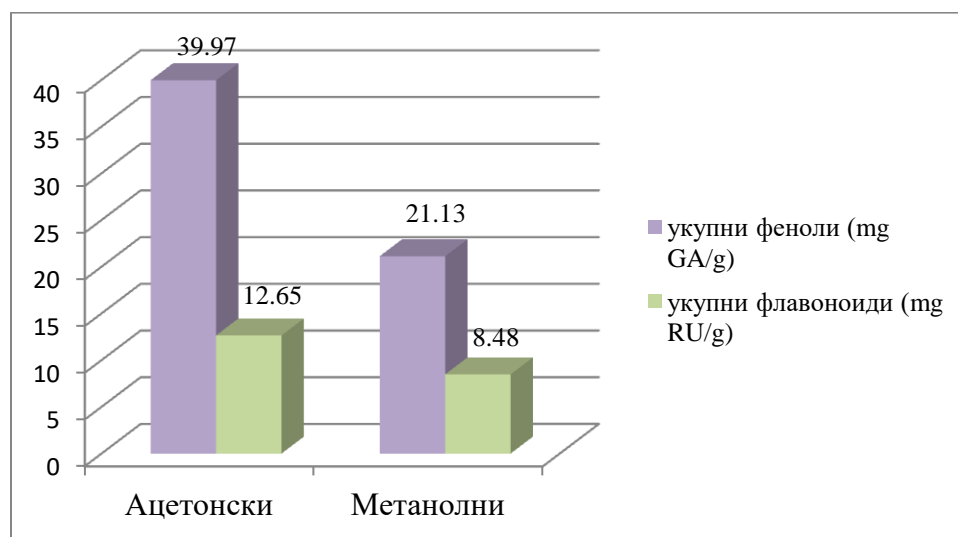
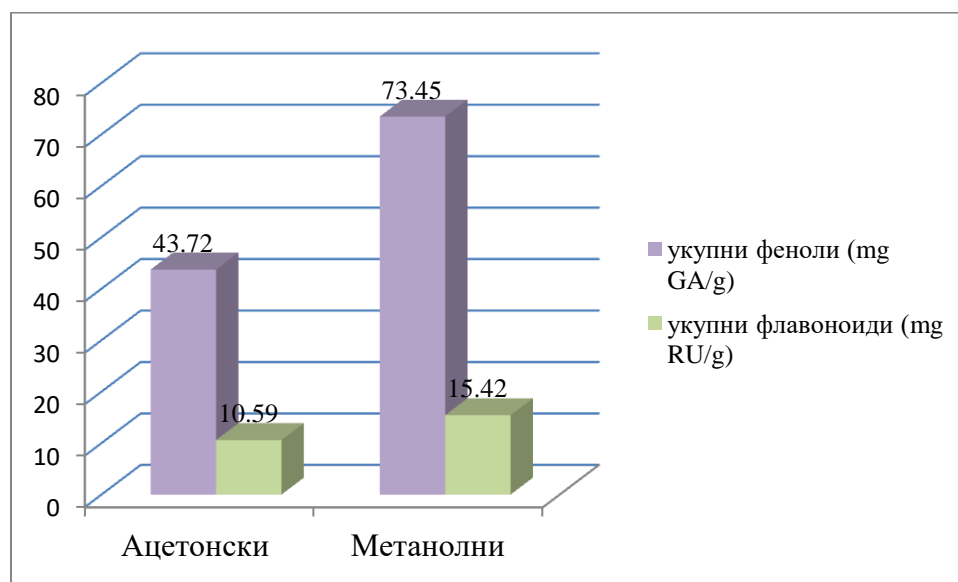


График 1. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстратима лишаја *Cladonia subulata*

#### 4.2.2. Укупни феноли и флавоноиди у испитиваним екстратима 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±0,59 mg GA/g, док код метанолског је тај број био већи и износио је 73,45±0,82 mg GA/g. Флавоноидни садржај био је већи код метанолског екстракта (15,42±0,55 mg RU/g) него код ацетонског екстракта (10,59±0,99 mg RU/g)





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

#### 4.2.3. Укупна количина фенола и флавоноида у испитиваним екстрактима лишаја *Phycia semipinnata*

Резултати укупног фенолног и флавоноидног садржаја ацетонских и метанолних екстраката врсте лишаја *Phycia 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 .

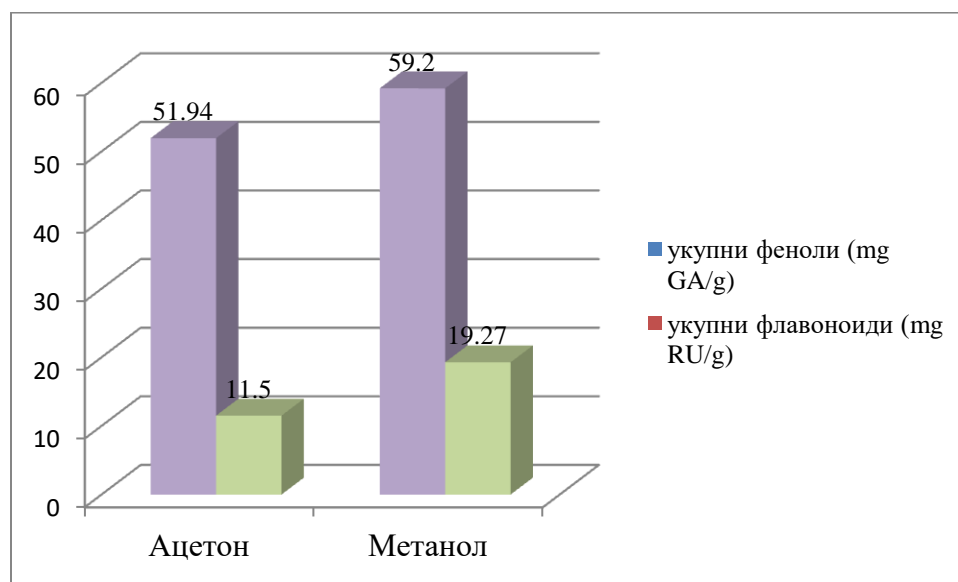


График 3. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстратима лишаја *Physcia semipinnata*

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

##### 4.3.1. Укупан антиоксидативни капацитет испитиваних екстракта

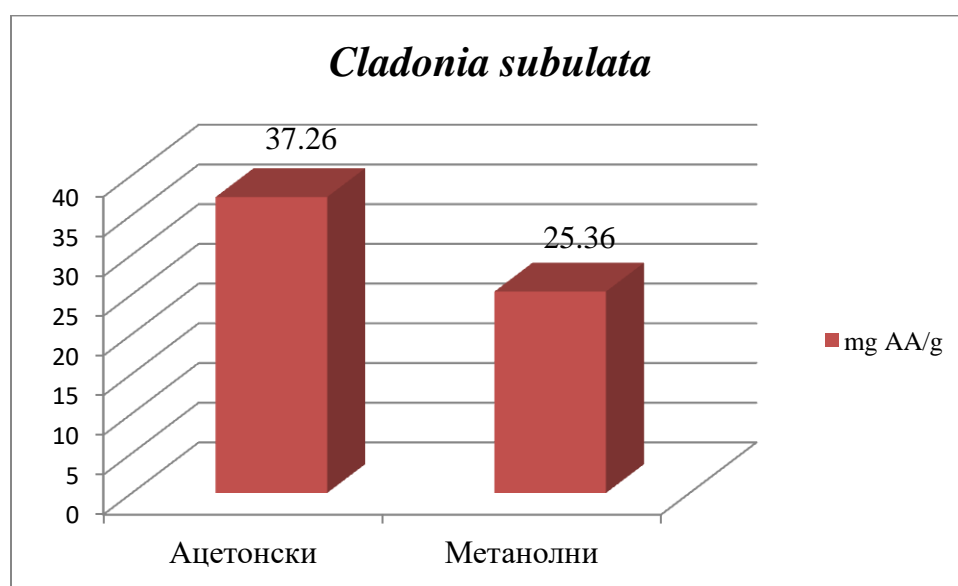
Укупан антиоксидативни капацитет (УАК) испитиваних екстракта, одређен је фосфомолибденском методом приказан је у табели 7 и на графицима од 4 до 6.

Табела 7. Укупни антиоксидативни капацитет екстракта 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

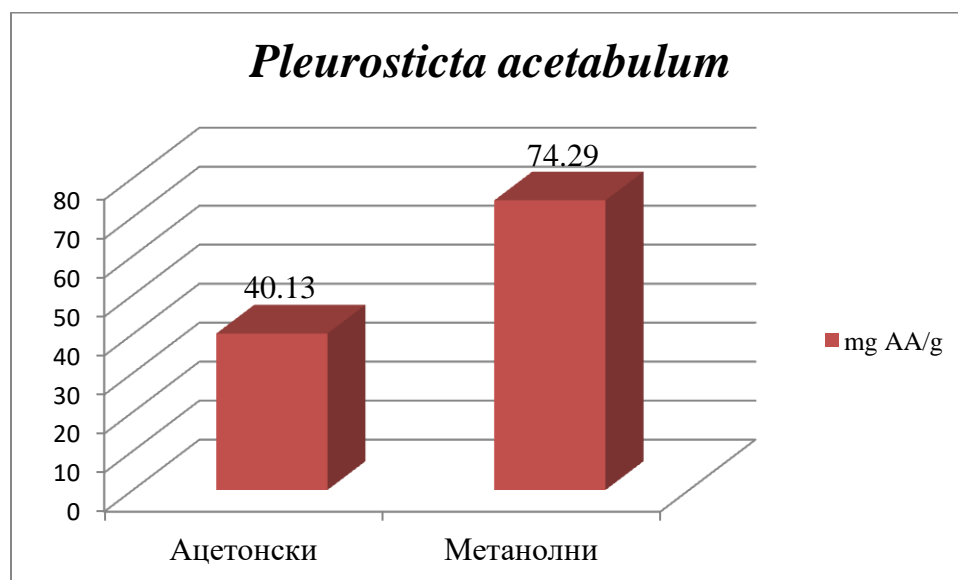
Укупни антиоксидативни капацитет испитиваних ацетонских и метанолских екстраката врста лишајева *C.subulata*, *P. acetabulum* и *P. semipinnata* кретао се у опсегу од 25,36 до 74,29 mg AA/g (mg аскорбинске киселине по g сувог екстракта), при чему највећи укупни антиоксидативни капацитет је показао метанолски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

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



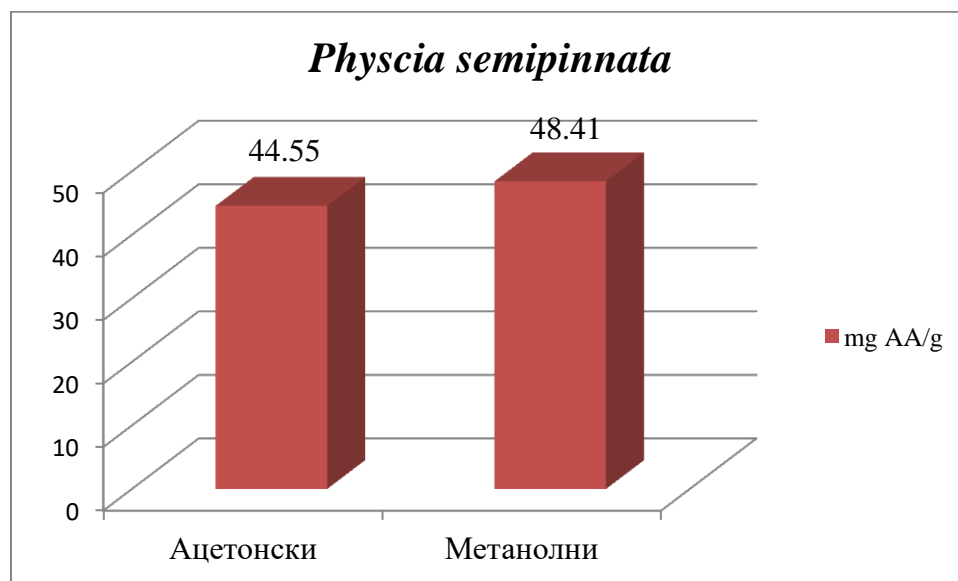
**График 4.** Укупни антиоксидативни капацитет екстраката лишаја *Cladonia subulata*

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



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

Резултати испитивања УАК лишаја *Physcia 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 екстракта лишаја *Physcia semipinnata*

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

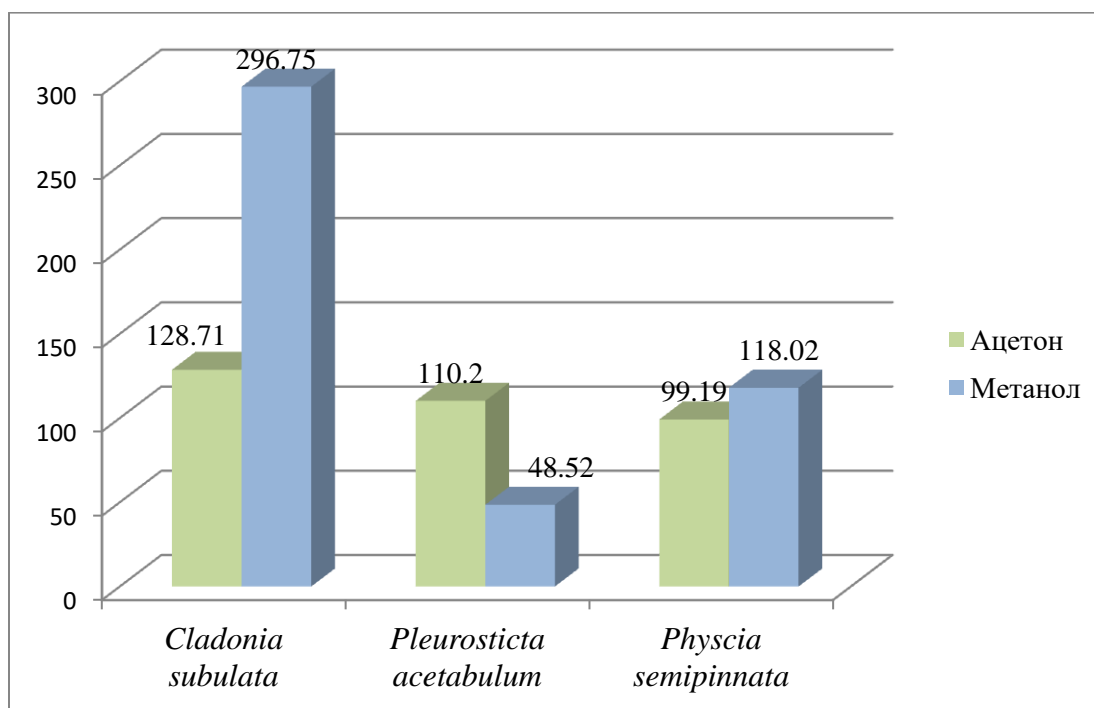
У табели 8. и на графику 7 приказани су IC<sub>50</sub> (концентрација екстракта потребна да смањи концентрацију DPPH• радикала за 50%) вредности деловања екстраката лишајева *C. subulata*, *P. acetabulum* и *P.semipinnata* на неутрализацију DPPH• радикала. IC<sub>50</sub> вредности екстраката (табела 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.**  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) вредности неутралисања  $DPPH\cdot$  радикала екстрактима лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*

Редослед антирадикалске активности испитиваних екстраката на  $DPPH\cdot$  је: метанолни екстракт *P. acetabulum* > ацетонски екстракт *P. semipinnata* > ацетонски екстракт *P. acetabulum* > метанолни екстракт *P. semipinnata* > ацетонски екстракт *C. subulata* > метанолни екстракт *C. subulata*.

#### 4.3.3. Одређивање способности неутралисања $OH\cdot$ радикала испитиваних екстраката

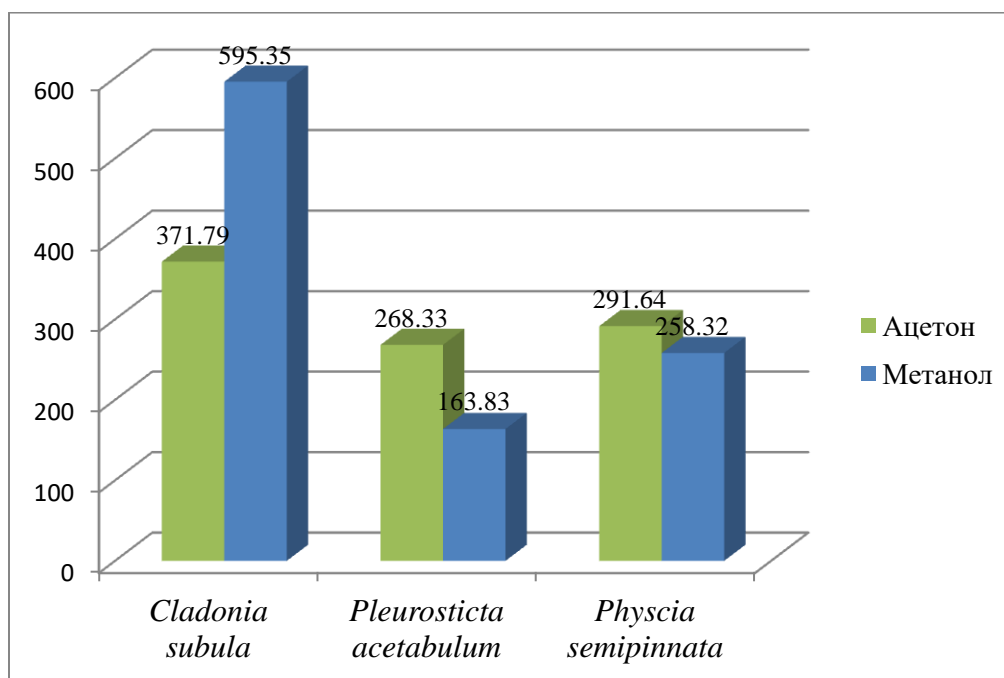
Резултати истраживања показују да екстракти испитиваних лишајева имају способност неутралисања хидроксил ( $OH\cdot$ ) радикала али мању него стандарди које су се користили за поређење. У табели број 9 приказане су  $IC_{50}$  вредности (концентрација екстракта потребна да смањи концентрацију  $OH\cdot$  радикала за 50%) деловања ацетонских и метанолских екстраката лишајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*  $\pm$  стандардна девијација три мерења.  $IC_{50}$  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 метанолни 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.

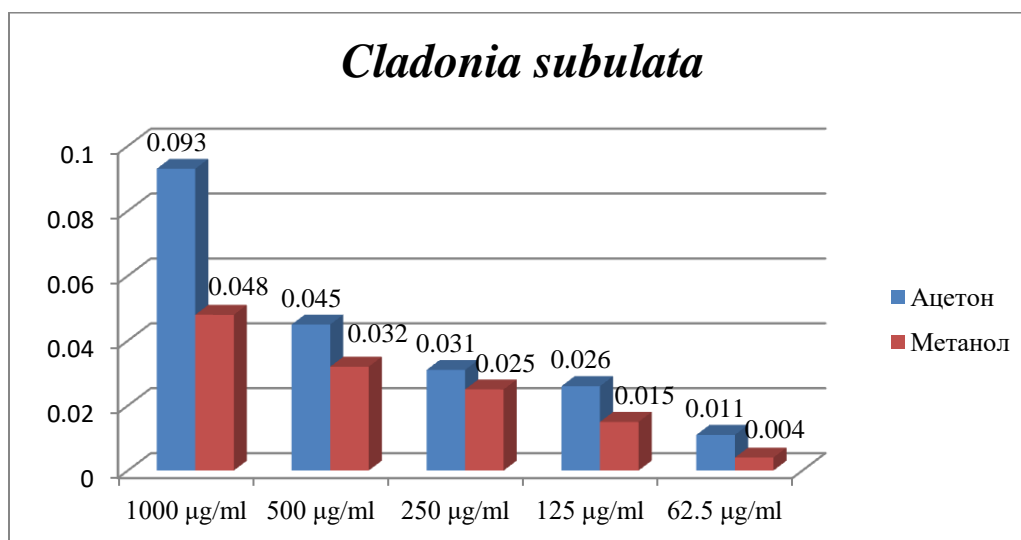


Табела 10. Редукциони капацитет испитиваних екстраката и аскорбинске киселине

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

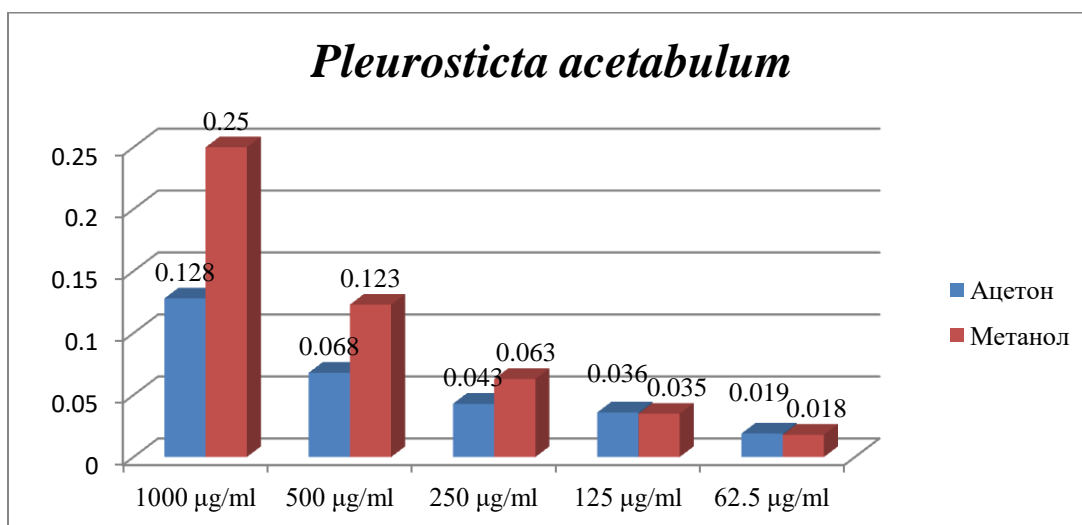
\*<sup>A</sup> – ацетонски екстракт; \*<sup>M</sup> – метанолски екстракт;

На графику 9. приказане су вредности апсорбанце редукционог капацитета ацетонског и метанолског екстракта лишаја *Cladonia subulata*. У серији концентracија 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.



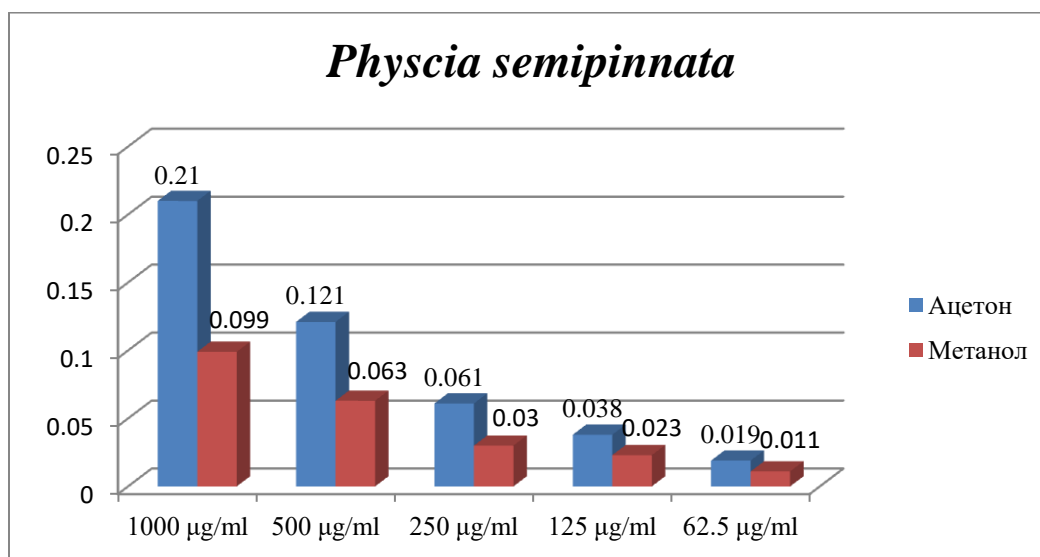
**График 9.** Редукциони капацитет (апсорбанца) екстракта лишаја *C. subulata* при опсегу концентрација од 1000-62,5 µg/ml

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.



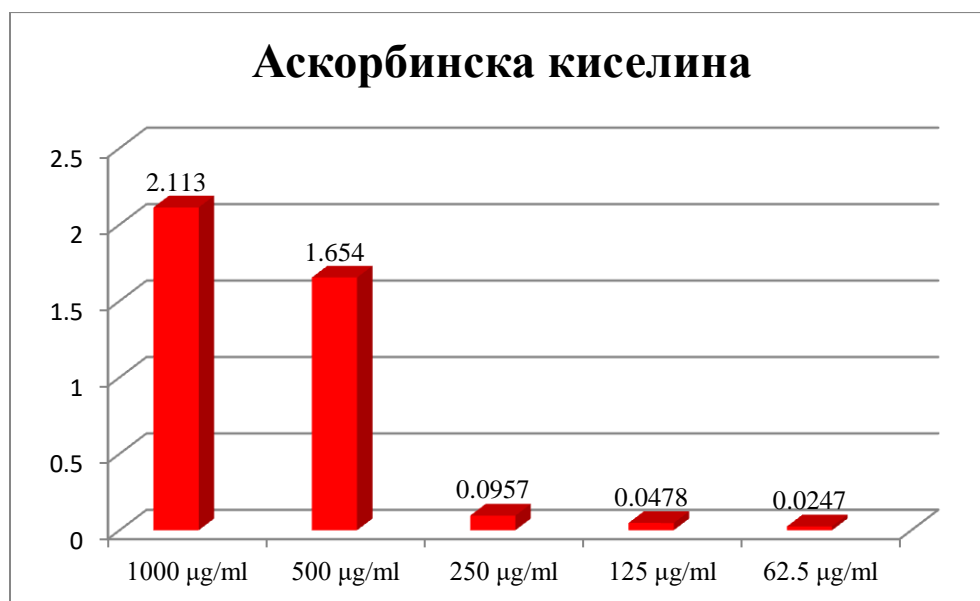
**График 10.** Редукциони капацитет (апсорбанца) екстракта лишаја *P. acetabulum* при опсегу концентрација од 1000-62.5 µg/ml

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 редукујућег 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

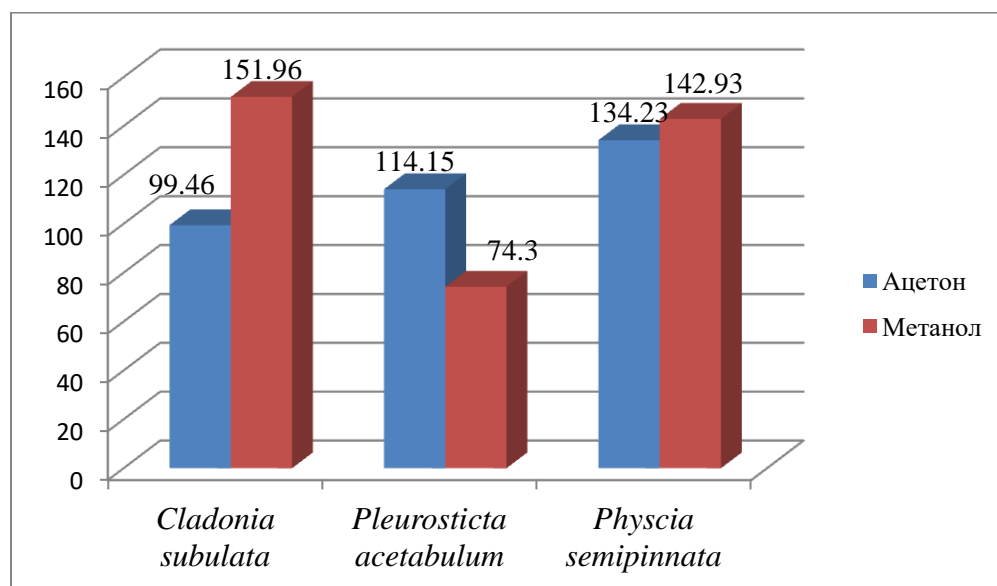
Јачина редукујућег капацитета испитиваних екстраката лишајева опадала је по редоследу: метанолски екстракт *P. acetabulum* > ацетонски екстракт *P. semipinnata* > ацетонски *P. acetabulum* > метанолски *P. semipinnata* > ацетонски *C. subulata* > метанолски *C. subulata*.

#### 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 *Phycia 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 концетрацијама, 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***

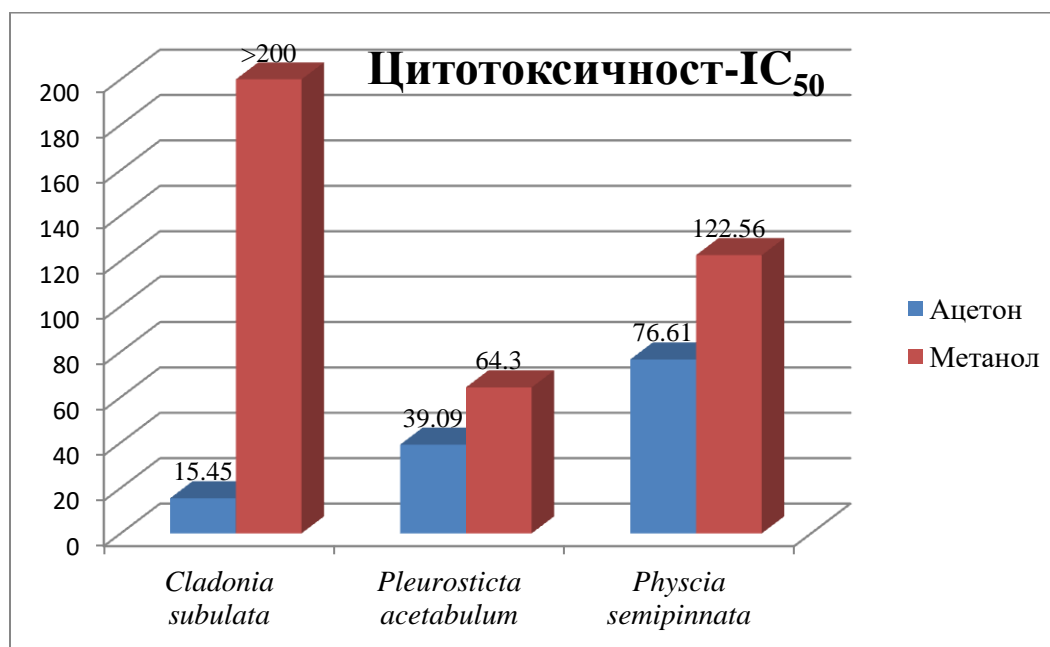
**4.4.1. Испитивање анитуморске активности екстраката на HeLa S3 ћелије**

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 метанолних 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 екстракта 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

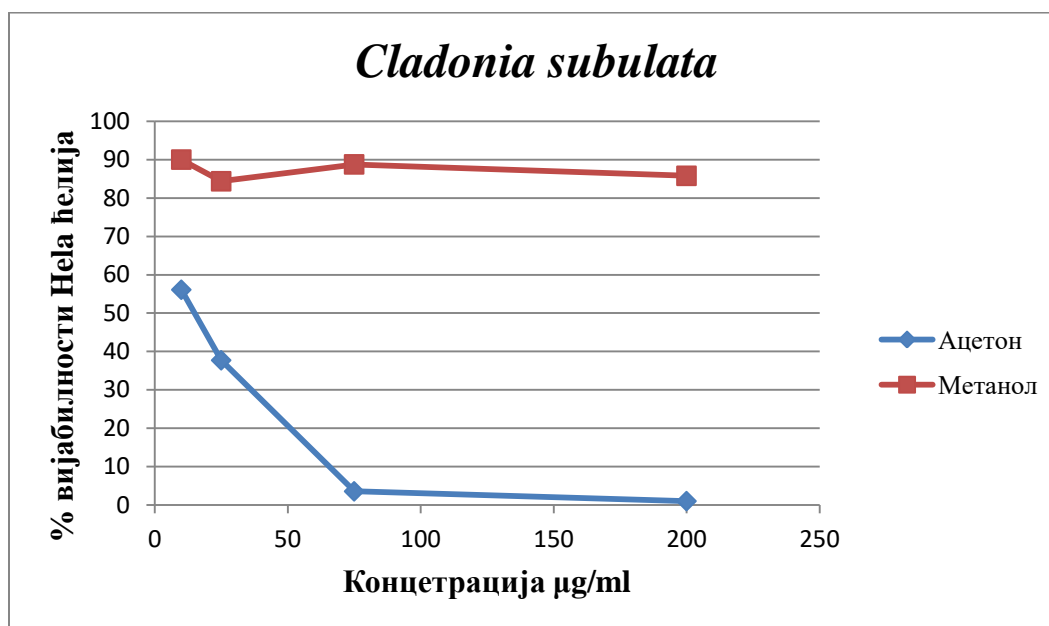




**График 14.** IC<sub>50</sub> (µg/ml) вредности цитотоксичне активности испитиваних екстраката на ћелијској линији HeLa након 24 h инкубације

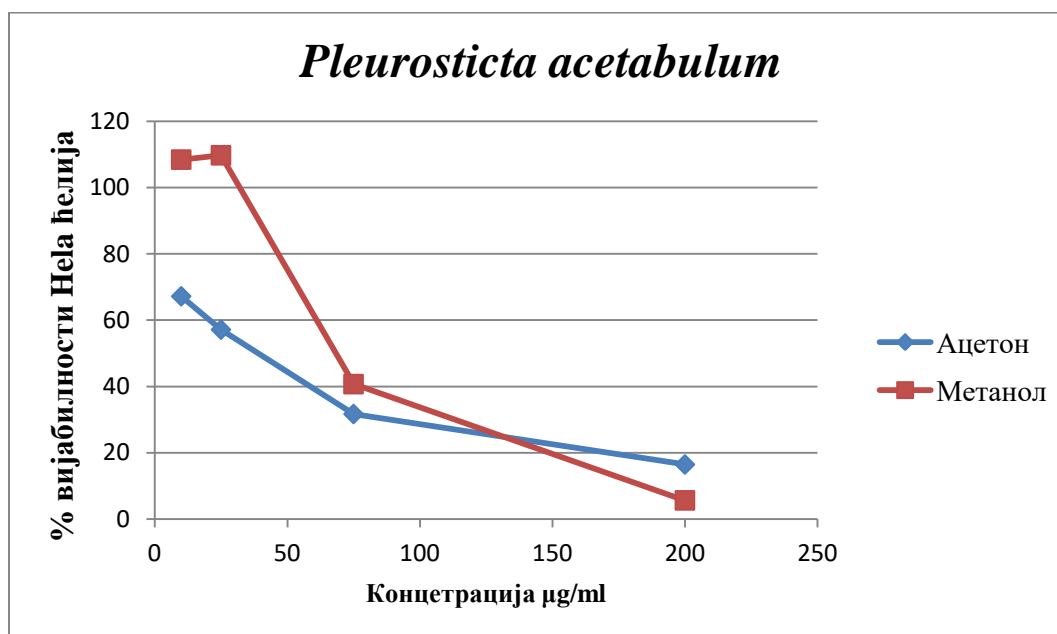
Упоредјујући антитуморске активности према HeLa ћелијама, између екстраката истих врста лишајева установљена је значајна разлика цитотоксичне активности.

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).



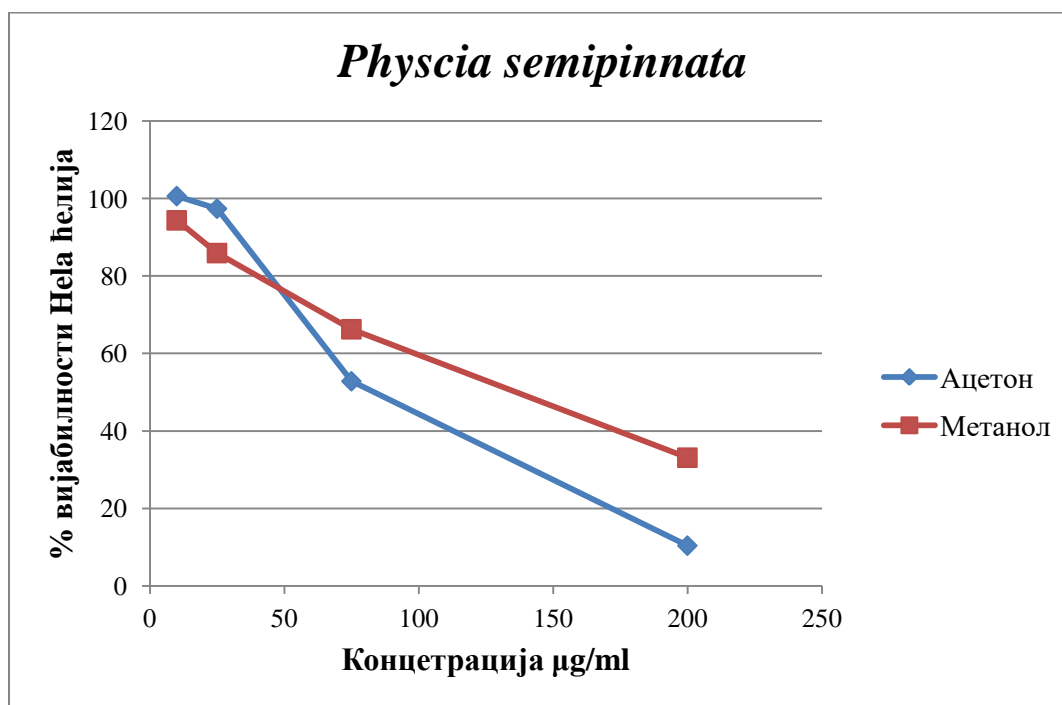
**График 15.** Цитотоксичан ефекат ацетонског и метанолског екстракта *C. subulata* на HeLa ћелија након 24 h инкубације, при опсегу концентрација од 200- 10 µg/ml

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).

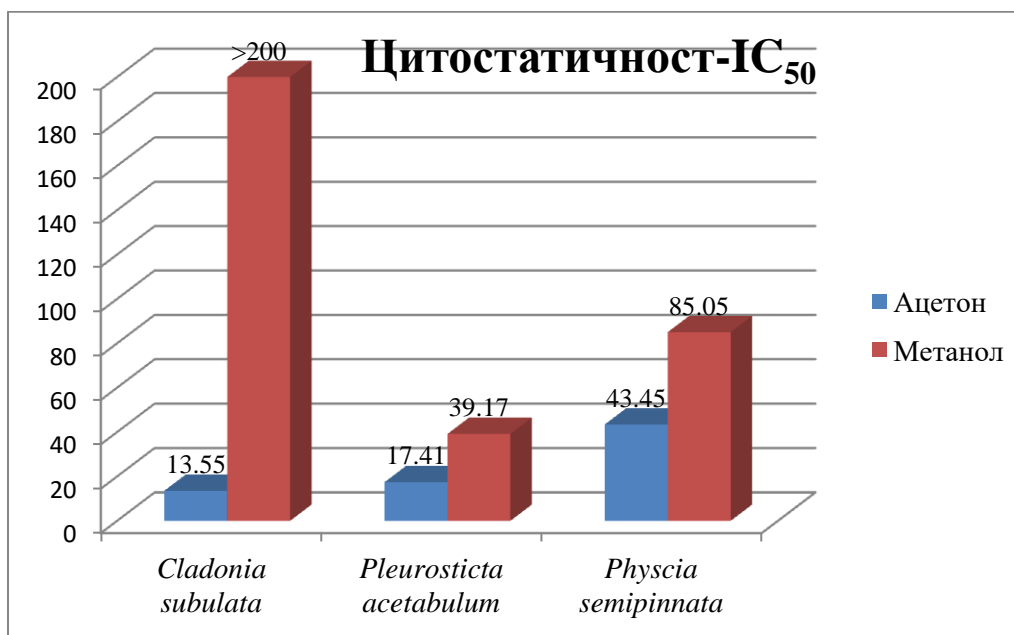


**График 17.** Цитотоксичан ефекат ацетонског и метанолског екстракта *P. semipinnata* на HeLa ћелије након 24 h инкубације, при опсегу концентрација од 200- 10 µg/ml

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  $>200$  µg/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

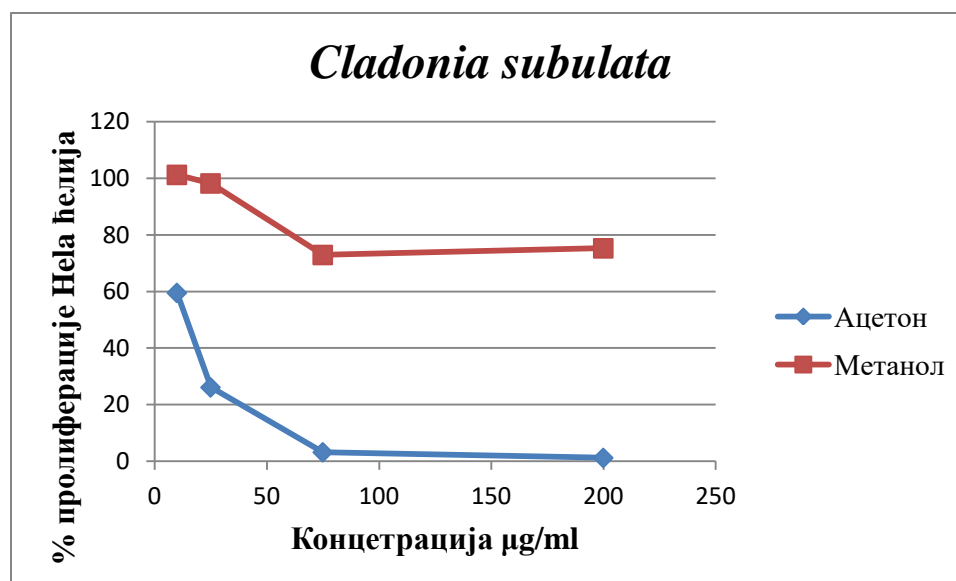
Лишај	Екстракт	IC <sub>50</sub> (µg/ml ±SD)
<i>C. subulata</i>	Ацетонски	13,55±3,17
	Метанолски	>200
<i>P. acetabulum</i>	Ацетонски	17,41±0,11
	Метанолски	39,17±5,54
<i>P. semipinnata</i>	Ацетонски	43,45±0,79
	Метанолски	85,05±5,18
5-флуороурацил (5-ФУ)		0,84±0,11



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

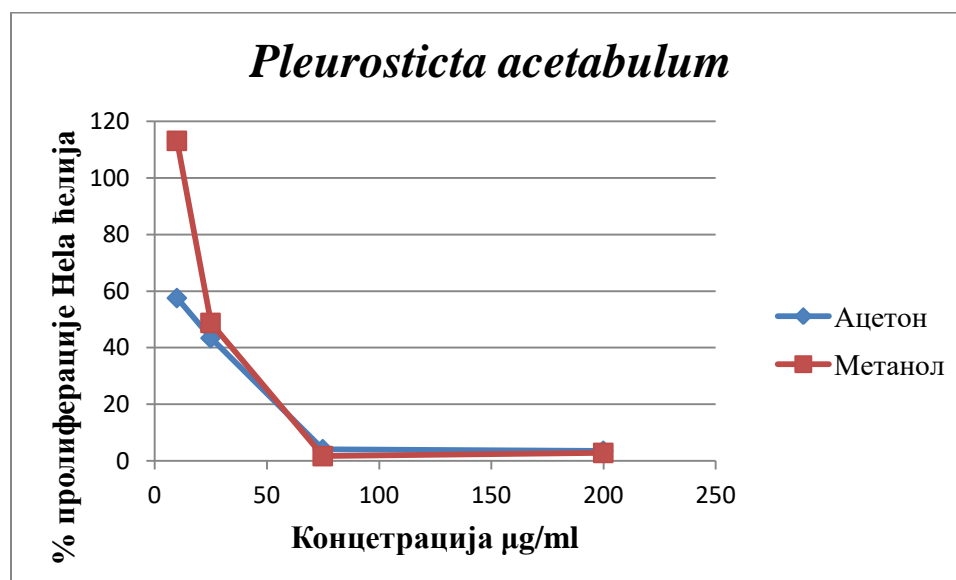
Ацетонски екстракт *C. subulata* испољио је веома јаку антипролиферативну активност према HeLa ћелијама у испитиваном опсегу концентрација. Јача активност је испољена при

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).



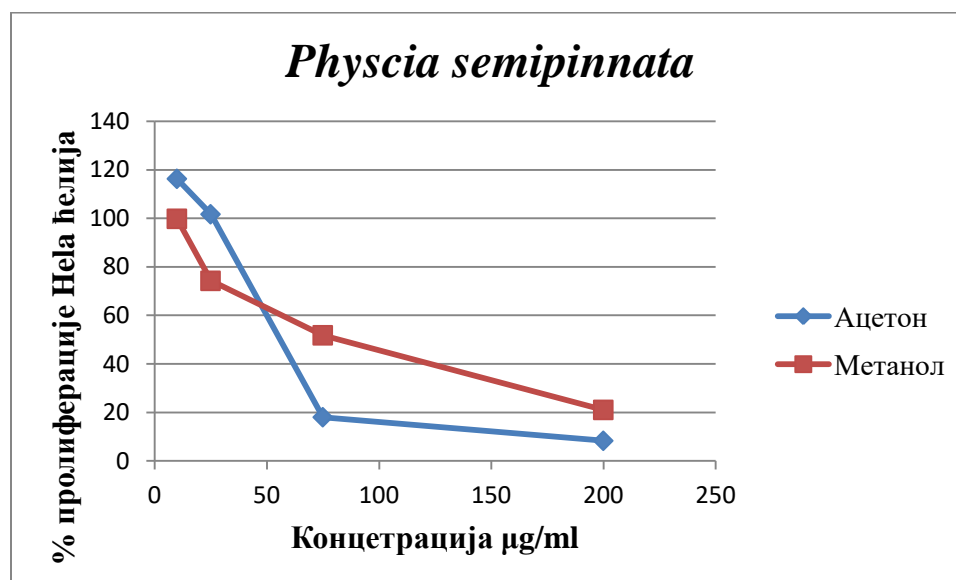
**График 19.** Антипролиферативни ефекат ацетонског и метанолског екстракта *C. subulata* на HeLa ћелије након 72 h инкубације, при опсегу концентрација од 200-10 µg/ml

Ацетонски и метанолски екстракти лишаја *P. acetabulum* испољили су значајну антипролиферативну активност према HeLa ћелијама. Најјача антипролиферативна активност испољена је при вишим концентрацији 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 µg/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 екстаркта, била је присутна озбиљна цитостатична активност, док је при нижим концентрацијама активност била знатно слабија. У случају ацетонског екстракта при концентрацији од 10 µg/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

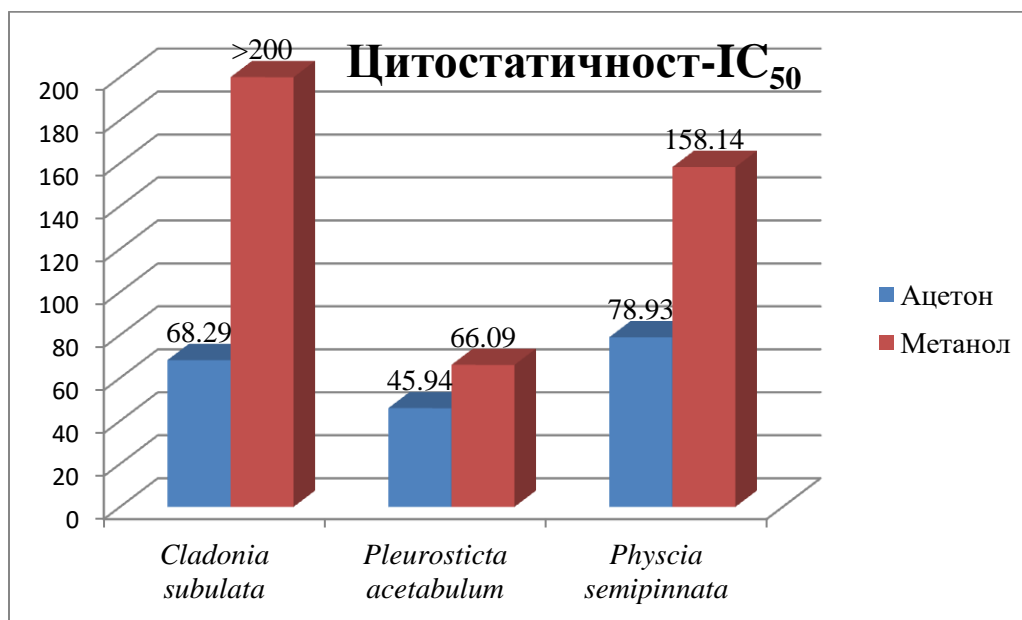
Испитивањем цитотоксичне активности екстракта лишајева према LS174 ћелиској линији након 24 h инкубације, добијене су веома високе вредности  $IC_{50}$  које су и биле ван опсега примењених концентрација за испитивање вијабилности (>200). Самим тим, ти резултати нису приказани у докторату. За разлику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

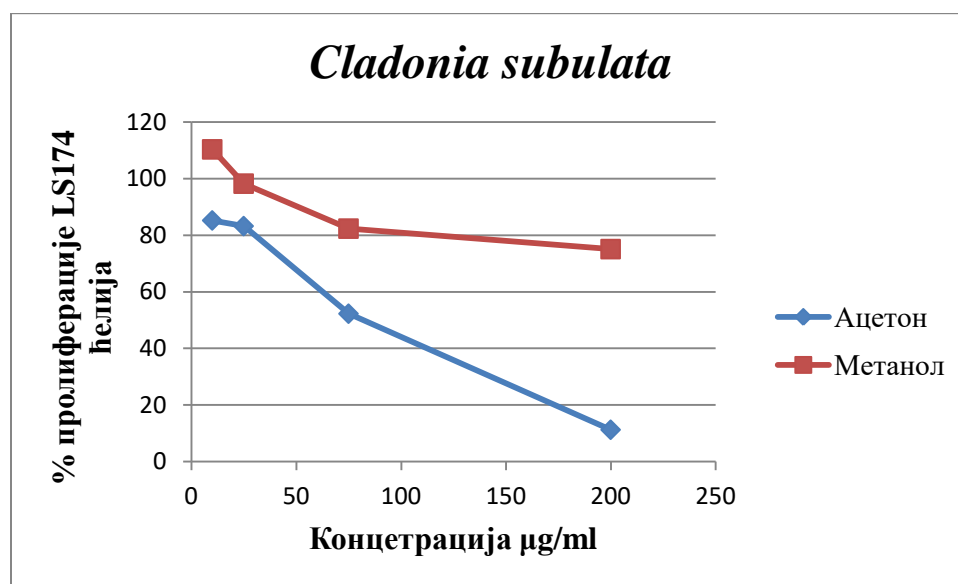
Лишај	Екстракт	IC <sub>50</sub> (µg/ml ±SD)
<i>C. subulata</i>	Ацетонски	68,29±2,43
	Метанолски	>200
<i>P. acetabulum</i>	Ацетонски	45,94±1,28
	Метанолски	66,09±1,61
<i>P. semipinnata</i>	Ацетонски	78,93±0,53
	Метанолски	158,14±4,33
cis-диаминдихлоро- платина (Cis-ДДП)		2,58±0,16



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

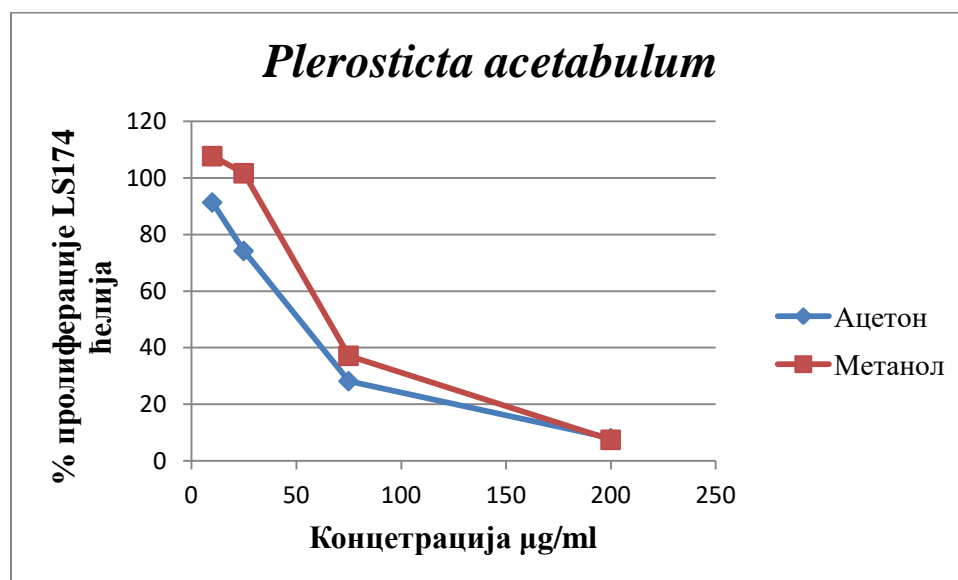
Ацетонски екстракт *C. subulata* испољио је антипролиферативну активност према LS174 ћелијама у испитиваном опсегу концентрација. Јача активност је испољена при

вишим концентрацијама, док је при нижим концентрацијама активност била слабија. Метанолни 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), док је при ниским концентрацијама (10 µg/ml) дошло до повећања пролиферације ћелија (График 23).



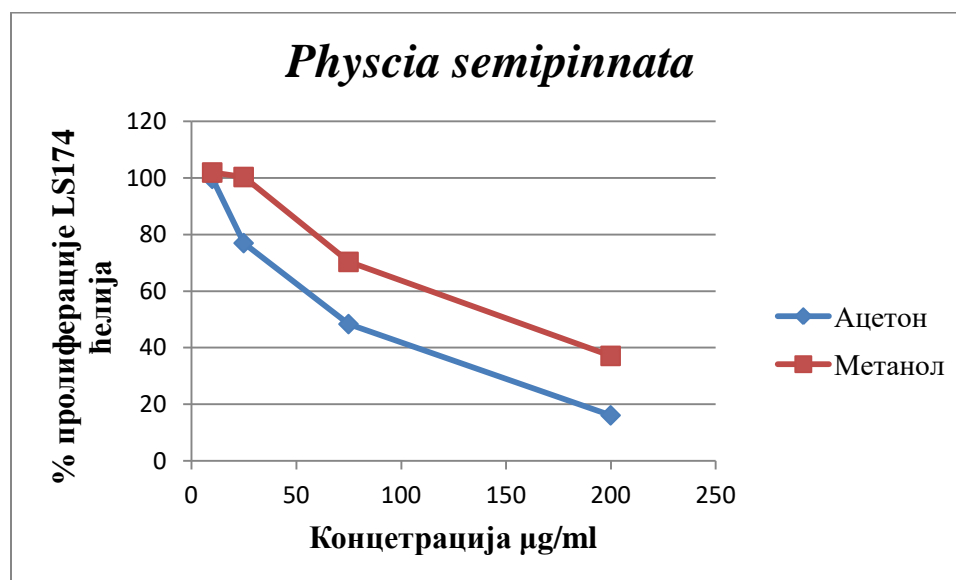
**График 23.** Антипролиферативни ефекат ацетонског и метанолског екстракта *C. subulata* на LS174 ћелије након 72 h инкубације, при опсегу концентрација од 200-10 µg/ml

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 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 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 апсорбанце (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 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.</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>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,017	<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>	0,000	<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. sem.</i> <sup>A</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>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>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	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>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 флавоноидног садржаја испитиваних екстраката**

По садржају укупних флавоноида, ацетонски екстракт лишаја *Cladonia subulata* се статистички значајно разликовао од метанолског екстракта истог лишаја. Упоређивањем 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 екстракта *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.<sup>A</sup>/C. sub.<sup>M</sup></i>	0,000	<i>C. sub.<sup>M</sup>/P. sem.<sup>M</sup></i>	0,001
<i>C. sub.<sup>A</sup>/P. acet.<sup>A</sup></i>	0,020	<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>	0,002	<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>	0,546
<i>C. sub.<sup>A</sup>/P. sem.<sup>M</sup></i>	0,315	<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>	0,018	<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 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 установљена статистички значајна разлика. Екстракти лишаја *P. acetabulum* су се по укупном антиоксидативном 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.</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>	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>A</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	0,051	<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>	0,000	<i>P. acet.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>A</sup>	0,003
<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>	0,000
<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>M</sup> / <i>P. acet.</i> <sup>A</sup>	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>M</sup>	0,000	<i>P. sem.</i> <sup>A</sup> / <i>P. sem.</i> <sup>M</sup>	0,008
<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 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\* радикала 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> /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 метанолног 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 екстракта 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 (5-флуороурацил) у антипролиферативној активности (IC<sub>50</sub> вредности) према HeLa ћелијама након 72 h инкубације. Статистичка значајна разлика је утврђена између ацетонских и метанолских екстракта 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 разлитих 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> /5ФУ	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> /5ФУ	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> /5ФУ	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> /5ФУ	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> /5ФУ	0,000
<i>C. sub.</i> <sup>M</sup> /5ФУ	0,000		

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

\*<sup>A</sup>-ацетонски екстракт; \*<sup>M</sup>- метанолски екстракт; 5ФУ- 5-флуороурацил;

**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 екстракта 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 разлитих 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; 5ФУ- 5-флуороурацил; 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 OH 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 *sar.* 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. ruxidata* 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, антиоксидативну 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. Норстихниска киселина је широко распротрањен 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 врста 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 ектраката *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, које су идентификоване 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 лишајева. 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<sup>•</sup> 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<sup>•</sup> радикала. Хидрокси радикали су кисеоничне реактивне врсте слободних радикала који настају метаболичким процесима (180). Добијене IC<sub>50</sub> вредности деловања екстракта лишајева *C. subulata*, *P. acetabulum* и *P. semipinnata* на неутрализацију DPPH<sup>•</sup> 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 лишаја *C. subulata*. Уколико се међусобно пореде екстракти добијени од исте врсте лишајева (ацетонски/метанолски) може се запазити да је у случају лишајева *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 литератирним 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).

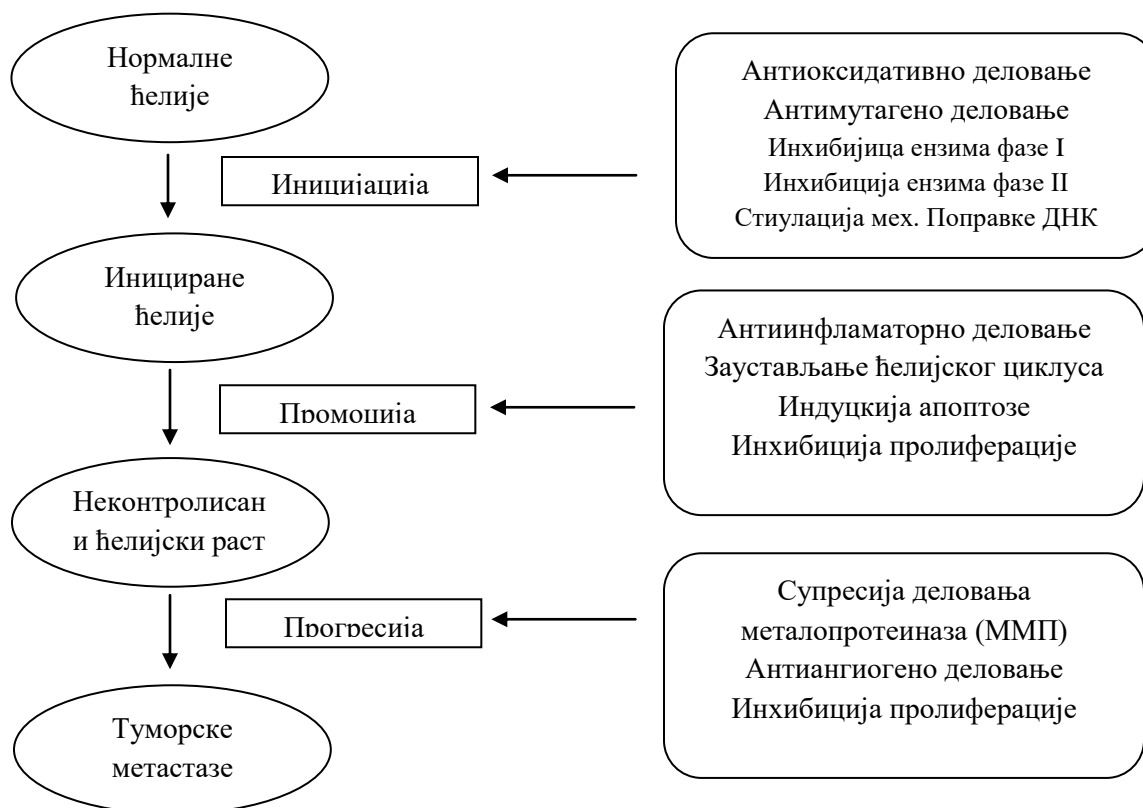
Антиоксидативна активност је била предмет проучавања и других истраживача, који су испитивали антиоксидативне ефекте неких других врста лишајева. У поређењу са њиховим резултатима, резултати ове студије показују релативу јаку антиоксидативну активност (184).

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 инхибије 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 (НТ-29 и НСТ116) 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 лишјајева *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 лишјајева *Cladonia subulata*, *Pleurosticta acetabulum* и *Physcia semipinnata*.
- *HPLC-UV* анализом испитиваних екстраката лишјајева, 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 лишјаја *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 лишјаја *P. acetabulum*, при чему атранорин није идентификован у метанолском екстракту ове врсте лишјаја. 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 лишјајева *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 лишјајева.
- 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 спобност неутралисања OH<sup>•</sup> радикала али при већим концентracијама 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 цитоксична 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. Culbertson 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. Sourì 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, M 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. (2009). 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. (2015). 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 (2001). 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 Ethnopharmacology* 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.